T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Eray ÖZGÜN

D-CARVONE'UN PALMİTAT İLE OLUŞTURULAN HÜCRESEL HEPATOTOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Büşra DİLER ZENGİNER

Referans no: 10392219

EDİRNE – 2023

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Eray ÖZGÜN

D-CARVONE'UN PALMİTAT İLE OLUŞTURULAN HÜCRESEL HEPATOTOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Büşra DİLER ZENGİNER

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2021/105

EDİRNE - 2023

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması süresince bana gösterdiği destek ve yardımından dolayı danışman hocam Sayın Doç. Dr. Eray ÖZGÜN'e teşekkürü borç bilirim. Tez izleme komitemde ve eğitim sürecimde yer alan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, tez izleme komitemde bulunan Sayın Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ'e, eğitim sürecimde yer alan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'a, Prof. Dr. İlker DIBIRDIK'a, Doç. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN'e ve emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a, çalışmalarıma yardımlarından dolayı MSc. Emine GÜZEL'e ve çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **NON ALKOLİK KARACİĞER HASTALIĞI** 3
- **OKSİDATİF STRES** 4
- **HEM OKSİJENAZ 1** 5
- **ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ** 7
- **İNFLAMAZOMLAR** 8
- **CARVONE** 9

GEREÇ VE YÖNTEMLER 11

BULGULAR 18

TARTIŞMA 29

SONUÇLAR 32

ÖZET 35

SUMMARY 37

KAYNAKLAR 39

ŞEKİLLER LİSTESİ 47

ÖZGEÇMİŞ 48

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

ATF4 **:** Aktive edici transkripsiyon faktörü 4

ER **:** Endoplazmik retikulum

HO **:** Hem oksijenaz

IL **:** Interlökin

MTT **:** 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür

NAFLD **:** Non-alcoholic fatty liver disease (Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı)

NLRP **:** NOD-like receptor family-pyrin domain containing protein (NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein)

ROT **:** Reaktif oksijen türleri

UPR **:** Unfolded protein response (Katlanmamış protein cevabı)

GİRİŞ VE AMAÇ

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), aşırı alkol tüketimi olmaksızın karaciğerde lipid birikimi ile karakterize olan bir hastalıktır (1). Plazmada serbest yağ asitlerinin artış göstermesi NAFLD patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Doymuş yağ asidi olan palmitat, plazmada serbest yağ asidi konsantrasyonunun yaklaşık %30-40'ını oluşturur. Palmitat intrahepatik trigliserid artışına katkıda bulunarak hepatotoksisiteye neden olmaktadır (2). Bu nedenle bilimsel araştırmalarda deneysel hepatotoksisiteyi indüklemek amacıyla palmitat yaygın olarak kullanılmaktadır (3–5). AML12 hücreleri, fare kaynaklı hepatositlerdir ve literatürde palmitat ile oluşturulan hepatotoksisitenin araştırılmasında sıklıkla kullanılmıştır (6–8).

Oksidatif stres, pro-oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlikten kaynaklanır ve NAFLD'nin patogenezinde rol oynayan ana faktörlerden biridir (9). Karbonilasyon geri dönüşümsüz bir protein modifikasyonudur ve protein karbonil düzeyleri oksidatif stres belirteçlerinden biridir (10). Hem oksijenaz (HO), hem katabolizmasından sorumlu enzimdir ve katabolizma sonucu serbest demir, karbon monoksit ve biliverdin açığa çıkar. HO'ın iki izoformu bulunmaktadır. Bunlardan HO1, hücresel stresler tarafından indüklenir (11).

Endoplazmik retikulum (ER), proteinlerin, lipidlerin sentezi ve kalsiyum homeostazı için önemlidir. ER, çeşitli metabolik değişikliklere adapte olabilen bir organeldir ancak, ER lümeni içinde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi ER stresine yol açar. Aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (ATF4), ER stres belirteçlerinden biridir. Doymuş yağ asitlerinin karaciğer hücrelerinde ATF4 düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir (12).

İnflamazomlar, dış veya iç tehlike sinyallerine karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkilerine aracılık eden protein kompleksleridir. NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein (NLRP) 3, patojen ve tehlike ile ilişkili moleküler kalıpları tanıyabilen hücre içi

multiprotein kompleksidir. NLRP3'ün aktivasyonu, interlökin (IL)-1β ve IL-18'in üretimine ve salgılanmasına yol açmaktadır (13,14). Yapılan çalışmalarda NLRP3'ün NAFLD patogenezinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (15–17).

Carvone doğada çoğunlukla nane, kimyon ve dereotu gibi bitkilerin esansiyel yağ ekstraktlarında bulunan, doymamış bir monoterpenoid ketondur. Carvone'un iki izomeri bulunur. Bunlardan D-Carvone'un antioksidan, anti-hiperlipidemik, anti-mikrobiyal, fungisidal, anti-kanser, anti-hipertansif, immünomodülatör ve anti-inflamatuar etkileri bulunmaktadır (18,19).

Literatürde D-Carvone'un palmitat ile oluşturulan hepatotoksisite üzerine etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, palmitat ile oluşturulan hepatotoksisitede D-Carvone'un hücre canlılığına, yağlanmaya, oksidatif strese, ER stresi ve inflamazom aktivasyonu üzerine etkisini araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI

Alkol kullanımı veya sekonder nedenler olmadan karaciğerde lipid birikiminin artışı ile karakterize olan NAFLD, dünya çapında önemli sağlık sorunlarından biridir (20). NAFLD, dünyada genel popülasyonun %20-30'unu etkilemekte olup, bu oranın yetişkinlerde %20-35, çocuklarda %15, obez bireylerde ise %80 olduğu bildirilmektedir (21).

Karaciğer yağlanması, hepatosit sitoplazmasında bulunan lipid damlacıkları içinde nötral lipidlerin birikmesini ifade eder (22). NAFLD, hepatositlerde serbest yağ asitleri ve trigliserid birikimi (>%5) artışı ile başlayan, hepatik inflamasyona ve hepatik hasara neden olan dinamik ve ilerleyici bir hastalıktır. NAFLD, basit karaciğer yağlanmasından, hepatik balonlaşma ve hepatik inflamasyon bulgularının mevcut olduğu non-alkolik steatohepatite ve ilerleyerek hepatik fibrozis ve hepatoselüler karsinoma kadar farklı şekillerde karaciğeri etkileyebilmektedir (23).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının gelişimi ve ilerlemesinin altında yatan mekanizmayı açıklamak için iki teori ortaya atılmıştır. Geleneksel "two hit" hipotezine göre; hareketsiz yaşam tarzı, yüksek yağlı diyet, obezite ve insülin direncine bağlı olarak, karaciğerde lipid birikimi ilk vuruştur. İlk vuruş, inflamatuar kaskadları ve fibrogenezi aktive ederek karaciğeri ikinci vuruşa duyarlı hale getirir. Bir diğer hipotez olan "çoklu paralel vuruş" hipotezi ise NAFLD gelişiminde ve ilerlemesinde çeşitli moleküler ve metabolik değişikliklerin sinerjik olarak gerçekleştiğini öngörür. Bu hipoteze göre lipid birikimi, insülin direnci, ER stresi ve oksidatif stresin neden olduğu mitokondriyal disfonksiyon, adipokinlerin düzensizliği, sitokinler gibi inflamatuar mediatörler, bağırsak mikrobiyotası, genetik ve

epigenetik mekanizmalar gibi çok sayıda faktör NAFLD gelişiminde rol oynamaktadır (24–26).

Özellikle yağ dokusunda lipolizin artışı ve karaciğerde de novo lipogenezin artışı karaciğerde lipid birikimini arttırmaktadır. NAFLD ilerlemesinde açıkça rol oynayan önemli olaylardan biri, karaciğerde aşırı yağ asidi birikiminden kaynaklanan lipotoksisitedir (25). Palmitat, diyette en çok bulunan doymuş yağ asididir ve bir dizi hücre tipinde hücresel işlev bozukluğunu ve hücre ölümünü indüklediği bilinmektedir (27,28). Lipotoksisite, oksidatif stresi ve ER stresini indükler ve inflamasyonu arttırır; böylelikle, karaciğer hücre hasarını artırarak, hücreyi ölüme götürür (29).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı genellikle rutin sağlık kontrolleri sırasında anormal karaciğer enzimleri ve abdominal ultrasonografi ile farkedilir. Ultrasonografi karaciğer yağlanması için kabul edilebilir bir tarama prosedürüdür. Bununla birlikte, karaciğer biyopsileri, NAFLD'nin evresini ve şiddetini belirlemek ve daha sonra izlemek için tek kesin teknik olmaya devam etmektedir (30,31).

Kardiyovasküler hastalıklar, obezite, insülin direnci ve tip 2 diabetes mellitus, hipertansiyon, hiperlipidemi vb. gibi metabolik bozukluklar NAFLD gelişimi ile ilişkilidir. NAFLD aynı zamanda multisistemik bir bozukluk olup, karaciğer dışında kronik böbrek hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar ve uyku apnesi gibi ekstrahepatik belirtilere neden olabilir (23).

Günümüzde NAFLD'yi tedavi etmeye yönelik, kilo kaybı, diyet ve egzersiz önerileri ilk adım olarak uygulanmakta olup, NAFLD tedavisi için onaylanmış bir ilaç bulunmamaktadır (32).

AML12 hücre hattı, 3 aylık erkek bir farenin sağlıklı karaciğerinden izole edilmiştir ve hücreler epitelyal morfolojiye sahiptir (33). AML12 hücreleri, farklılaşmış hepatositlerin karakteristik morfolojik ve gen ekspresyon modellerini sergiledikleri için palmitat ile oluşturulan hücresel NAFLD modeli oluşturmak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (34-37).

OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres, antioksidanlar ve pro-oksidanlar arasındaki dengenin pro-oksidanlar yönünde bozulması olarak tanımlanır. En önemli pro-oksidan enzimler ksantin oksidaz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz ve nitrik oksit sentaz iken, en önemli antioksidan enzimler ise glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz-1 ve katalazdır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise koenzim Q10, C vitamini, E vitamini, karotenoidler, flavonoidler, organosülfür bileşikler, melatonin, selenyum, bakır, çinko ve

magnezyum gibi minerallerdir. Reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif azot türleri oksidatif strese neden olmakta ve aynı zamanda birçok biyolojik süreçte önemli bir rol oynamaktadır. En yaygın ROT ve reaktif azot türleri; hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil, nitrik oksit ve peroksinitrittir (38,39).

Serbest radikaller bakterilerin, fagositler tarafından hücre içi yıkımı için gerekli olup aynı zamanda bazı hücresel sinyalleşme süreçlerinde de yer alır. Düşük ve orta miktarlarda ROT, hem homeostazın korunmasını sağlar, hem de çeşitli hücresel fonksiyonlar için gereklidir. Aşırı ROT üretimi ise, hücresel proteinlerin yapısal modifikasyonunun ve işlevlerinin değişmesine neden olarak hücresel işlev bozukluğuna ve hayati hücresel süreçlerin bozulmasına yol açar. Patolojik veya stres koşullarında, artan ROT, antioksidan sistemi bastırarak normal hücresel sinyal mekanizmalarını bozabilmenin yanı sıra, protein, karbonhidrat, lipid ve DNA gibi temel biyomoleküllerde geri dönüşü olmayan değişikliklere neden olur (40,41).

Sigara dumanı, iyonize radyasyon, ağır metal iyonları, ilaçlar, ksenobiyotikler, kirleticiler veya böcek ilaçları gibi çevresel tetikleyicilerin tümü, hücrelerde ROT üretiminin artmasına neden olur. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri, ROT'nin temel endojen kaynağı olarak kabul edilir, ancak diğer endojen kaynaklar da mevcuttur. ER, peroksizomlar, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz ve nitrik oksit sentaz, ROT üretiminin ana endojen bölgeleridir. Mitokondriyal elektron taşıma zincirinin I ve III no'lu kompleksleri süperoksit anyonu üretir. Mikrozomlar ve peroksizomlar ise hidrojen peroksit üretirler. Düzensiz ROT sinyali, oksidatif stres ile ilişkili çok sayıda hastalığa neden olur (42,43).

Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu modifikasyonlar arasında, protein karbonilasyonunun oksidatif stresin önemli bir özelliği olduğu bilinmektedir. Yapılarında aldehit ya da keton bulunduran reaktif karbonil gruplarının proteinlerin amino asit yan zincirlerine dahil edilmesi, proteinlerin oksidatif hasarı açısından önemli bir özelliktir ve protein karbonilasyonu olarak adlandırılır. Protein karbonilasyonu, farklı reaksiyon mekanizmaları yoluyla meydana gelen birçok kimyasal modifikasyonu içerir. En zararlı oksidatif protein modifikasyonlarından biri olan protein karbonilasyonu geri dönüşümsüz ve enzimatik olmayan bir modifikasyon olup, ROT'nin neden olduğu hücresel hasarı göstermede bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (44,45).

HEM OKSİJENAZ 1

Hem oksijenaz, hem katabolizmasından sorumlu enzimdir ve memeli dokularında yaygın olarak bulunur. HO, hem katabolizmasında reaksiyonun hız sınırlayıcı adımını katalize

ederek, ferröz iyonları (Fe^{2+}), karbon monoksit ve biliverdini üretir. Açığa çıkan biliverdin, biliverdin redüktaz tarafından indirgenerek bilirubin oluşur. HO aktivitesi sonucu oluşan bu metabolik ürünler, oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz gibi fizyolojik süreçlere katılır. HO, ayrıca endojen karbon monoksit üretiminin ana kaynağı olarak kabul edilir. HO'lar yaşlanmış eritrositlerden ve ekstrahematopoietik hücrelerden demirin geri dönüşümü sağlar. Bu nedenle retiküloendotelyal hücrelerden zengin dokularda aktiviteleri yüksektir (46–48).

Hem oksijenaz, tüm dokuların mikrozomlarında ve mitokondrilerinde bulunan evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş enzimlerdir. Memelilerde, HO ailesi HO1 ve HO2 olmak üzere moleküler ağırlığı sırasıyla 32 ve 36 kDa olan iki enzimden oluşur. HO1, ısı şok proteini 32 olarak da bilinmektedir. Moleküler ağırlığı 33 kDa olan üçüncü bir izoform HO3 de tespit edilmiş olup, yapılan araştırmalar sonunda, HO2 transkriptinden türetilen bir psödogen olduğu kanıtlanmıştır (49,50).

Hem oksijenaz 1 proteini, karaciğer, dalak ve kemik iliğinde yüksek oranda ifade edilir. Hem HO1 ve HO2, 24 amino asitlik bir dizi, hem grubuna bağlanmasını sağlayan "hem bağlama cebi" ve karboksil ucunda ER membranına çapalanmasını sağlayan hidrofobik bir bölge içerir. HO1 indüklenebilir formdur ve bazal koşullar altında ekspresyonu düşüktür. Ancak yaşlı eritrositlerin yıkımının yüksek olduğu dokularda ve makrofajlarda stressiz koşullar altında bile HO1 düzeyleri yüksektir. HO1, sitoprotektif, anti-apoptotik, anti-inflamatuar ve antioksidan özelliklere sahiptir. Bazal koşullar altında düşük seviyelerde ekspresyonu, ancak hızlı bir şekilde düzenlenmesi nedeniyle HO1, oksidatif stresin bir biyolojik belirteci olarak da kabul edilmiştir. HO2 ise yapısal formdur, testislerde ve beyinde yüksek oranda bulunur. Her iki izoform da antioksidan savunma, inflamatuar yanıtın düzenlenmesi ve hücre proliferasyonunda görev alsalar da, bu enzimlerin fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri farklılık göstermektedir. HO1'in ekspresyonu, doğal substratı olan hem, ısı, ağır metaller, ksenobiyotikler, tümör nekroz faktör-alfa, büyüme faktörleri, IL-1, IL-10, interferon gama, lipopolisakkaritler, nitrik oksit, hidrojen peroksit gibi birçok endojen ve eksojen uyaran tarafından düzenlenir (51-53).

Hem oksijenaz 1'in en önemli rollerinden biri hem grubu dengesinin düzenlemesidir. Hem, önemli enzimatik sistemlere ek olarak hemoglobin, miyoglobin, sitokromlar, HO1, katalazlar ve peroksidazların prostetik grubudur. Hem, hemoproteinlerden salındığında zararlı olabilir. Serbest hem toksiktir ve serbest radikal üretimini artırarak metabolizmada oksidan durumu arttırır. Açığa çıkan serbest radikaller, proteinlere, lipidlere ve DNA'ya zarar verir. Bu nedenle, HO enzim sisteminin sitoprotektif rolü biyolojik süreçte önemlidir (54,55).

Hem oksijenaz 1, ROT'ni temizleyerek ve stres koşulları sırasında hücrede apoptozu önleyerek antioksidan bir rol oynar. HO1 başta olmak üzere birçok antioksidan enzimin ekspresyonu, nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 tarafından gerçekleştirilir. Normal şartlar altında nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2, sitoplazmada Kelch-benzeri ECH-ilişkili protein 1 tarafından inaktif halde tutulmaktadır. Kelch-benzeri ECH-ilişkili protein 1, oksidatif strese yanıt olarak bir sensör gibi davranmaktadır ve hücre oksidatif veya elektrofilik strese maruz kaldığında, nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2, Kelch-benzeri ECH-ilişkili protein 1'den ayrılarak çekirdeğe geçer, burada antioksidan yanıt elemente bağlanır ve HO1 de dahil olmak üzere bir dizi proteinin ekspresyonunu indükler. Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 aracılıklı HO1 düzeyi artışı, oksidatif stresi azaltmak için önemli bir sinyal yoludur (56,57).

ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

Endoplazmik retikulum, çekirdek membranından sitoplazma boyunca uzanan, zarla çevrili tübüller ve veziküllerden oluşan bir organeldir. ER, salgılanacak olan ve transmembran proteinlerin katlandığı ve translasyon sonrası modifiye edildiği, salgı yolağının ilk bölümünü oluşturur. ER aynı zamanda ER'nin fizyolojik aktiviteleri için gerekli olan ve oksidasyon-redüksiyon potansiyelinin korunmasını sağlayan hücre içi kalsiyum iyonlarının depolandığı en önemli organeldir. Lümeninde şaperonlar, foldazlar, glikozilleyici enzimler, oksidoredüktazlar ve kofaktörler gibi bir dizi özel protein, yeni sentezlenen proteinlerin doğru katlanmasını sağlar. Şaperonlar, yeni sentezlenmiş proteinler ya da yanlış katlanmış proteinler üzerindeki hidrofobik bölgelerle etkileşime girerek, hem katlama işlemini tamamlamak hem de katlama hatalarını düzeltmekle görevlidirler. ER'deki proteinler kalite kontrol noktalarından geçtikten sonra, doğru şekilde katlanmış proteinler golgi yoluyla diğer organellere ve/veya plazma zarına geçerler. Hatalı katlanma durumunda, proteinler sitozole serbest bırakılarak burada ubikitinlenirler ve proteazom tarafından parçalanmak üzere hedeflenirler. Bu kalite kontrol sistemine ER ilişkili yıkım adı verilmiştir. Hücreler, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin neden olduğu bozulmalarla başa çıkmak amacıyla, ER'nin işlevini yeniden kazanmasını amaçlayan katlanmamış protein cevabı (UPR) adı verilen adaptif bir yanıt başlatır. Adaptif UPR, hücre hasarını en aza indirir ve hücrenin iyileşmesini ve stresli ortamda hayatta kalmasını sağlar. Hücrenin kaderi, hücresel stresin yoğunluğundan ve süresinden etkilenir. Hücre, kronik stresle baş edemezse adaptif UPR yolağından, hücre ölümü ile sonuçlanan terminal UPR programına geçer. Uzun süreli veya yoğun stres, bu terminal UPR'nın aktivasyonuna yol açar (58–61).

Memelilerde UPR, ER transmembran sensörlerinin aktivasyonu ile tetiklenir. Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz, ER membranında bulunan bir transmembran proteindir. Fosforillenerek aktive olan Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz, ökaryotik başlatma faktörü-2α'nın fosforilasyonunu katalize eder. Fosforillenen ökaryotik başlatma faktörü-2α, çoğu mRNA'nın transkripsiyonunu ve dolayısıyla protein sentezini önemli ölçüde azaltarak ER'un iş yükünü azaltır. Ökaryotik başlatma faktörü-2α'nın fosforilasyonu, çoğu mRNA'nın transkripsiyonunu azaltırken, ATF4'ün transkripsiyonunu arttırır. Translasyondan sonra ATF4 çekirdeğe geçer ve hücre ölümünü düzenleyen potansiyel bir pro-apoptotik protein olan C/EBP homolog proteininin transkripsiyonunu aktive eder. Aktive olan C/EBP homolog proteini, hücreyi apoptoza yönlendirir (62,63). ATF4, antioksidan yanıt, apoptoz, enerji homeostazı, otofaji gibi birçok önemli biyolojik süreci modüle etmektedir (64,65).

Endoplazmik retikulum stresi; diyabet, ateroskleroz, inflamatuar bozukluklar, inme, pulmoner fibroz, nörodejeneratif bozukluklar (Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalıkları) ve kanser gibi bir dizi patolojiyle ilişkilendirilmiştir (66,67).

İNFLAMAZOMLAR

İnflamazomlar, dış veya iç tehlike sinyallerine karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkilerine aracılık eden protein kompleksleridir. Hücresel enfeksiyonlar veya stresörlere yanıt olarak aktive olurlar ve çok sayıda pro-inflamatuar sitokinin ekspresyonunu, olgunlaşmasını ve salınmasını tetikleyerek bir dizi inflamatuar yanıtı başlatırlar. Kalıp tanıma reseptörleri ailesinin Toll benzeri reseptörler, NOD benzeri reseptörler başta olmak üzere birçok üyesi vardır ve inflamazomların önemli bileşenleridir. Kalıp tanıma reseptörleri sitoplazma içinde bulunurlar ve patojenle ilişkili moleküler kalıpları ve hasarla ilişkili moleküler kalıpları tanırlar (68,69). NLRP1, NLRP3, NLRP4 ve Absent-in-melanoma 2 olmak üzere bilinen dört inflamazom vardır ve hepsi NOD benzeri reseptör ailesine ait bir kalıp tanıma reseptörü içerir. Bu inflamazomlar arasında, NLRP3 inflamazomu, hem bağışıklık tepkilerinin oluşmasında hem de birçok yaygın inflamatuar hastalıkta önemli rol oynar (70).

İnflamazomlar üç ana yapısal bileşenden meydana gelmektedir. Bunlar, sensör protein, adaptör protein ve efektör proteindir. NLRP3 inflamazomu, NLRP3 proteini, kaspaz bağlayıcı bölge içeren apoptoz ilişkili benek benzeri protein ve pro-kaspaz-1'den oluşur. Prokaspaz-1, efektör proteindir. Kaspaz bağlayıcı bölge içeren apoptoz ilişkili benek benzeri protein, adaptör proteindir. Kaspaz bağlayıcı bölge içeren apoptoz ilişkili benek benzeri protein, NLRP3 sensör proteinini ve efektör pro-kaspaz-1'i birbirine bağlayarak bir köprü görevi

yapmaktadır. NLRP3'ün aktivasyonu, sensör kalıp tanıma reseptörleri tarafından tehlike veya stres faktörlerinin tanınmasıyla başlar. İnflamazom aktivasyonuna yol açan tehlike sinyalleri, patojenle ilişkili moleküler kalıplar ve hasarla ilişkili moleküler kalıplar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Patojenle ilişkili moleküler kalıplar arasında mikrobiyal nükleik asitler, bakteri salgılama sistemleri ve mikrobiyal hücre duvarlarının bileşenleri, hasarla ilişkili moleküler kalıplar arasında ise ATP, ısı şok proteinleri 70 ve ürik asit kristalleri gibi uyaranlar bulunmaktadır (71,72).

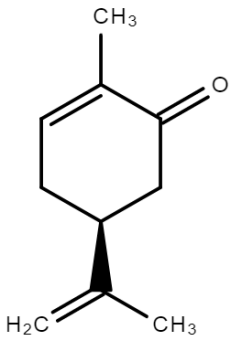
İnflamazom aktivasyonu iki adımda gerçekleşir. İlk aşama hazırlık aşamasıdır. İlk aşama, toll benzeri reseptörler tarafından patojenle ilişkili ve hasarla ilişkili moleküler kalıpların tanınmasıyla başlayan hazırlık aşamasıdır. Bu aşamada, toll benzeri reseptörler çeşitli stres faktörlerini tanır ve nükleer faktör-kappa B sinyalini aktive eder, bu da NLRP3 proteini, pro-IL-1β ve pro-IL-18 gibi öncü proteinlerin üretiminin artmasına neden olur. İkinci aşama ise aktivasyon aşamasıdır. İkinci aşamada NLRP3 proteini, kaspaz bağlayıcı bölge içeren apoptoz ilişkili benek benzeri protein ve prokaspaz-1 kompleks halinde birleşir ve daha sonra inaktif halde bulunan pro-IL-1β ve pro-IL-18 sitokinlerini biyoaktif formlarına dönüştürür. IL-1β ve IL-18, sonraki inflamatuar etkiye katılırlar (73,74)

NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3, yaygın olarak bakterilere, virüslere, mantarlara ve parazitlere karşı bağışıklık yanıtında rol oynamaktadır. Buna ek olarak, çeşitli tehlike sinyalleri, yağ asitleri, ROT üretimi, kalsiyum iyonları, nitrik oksit ve mitokondri fonksiyon bozukluğu gibi çok sayıda moleküler ve hücresel olaylar NLRP3 inflamazomu aktivasyonunu tetikleyebilir (13,75).

Yapılan çalışmalarda NLRP3'ün NAFLD patogenezinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (15–17). NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunun, karaciğer yağlanması, inflamasyon, fibroz ve kanser gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiş olup (17,76,77) NLRP3 inflamazomunun inhibisyonunun, NAFLD'de karaciğer yağlanmasını, inflamasyonu ve fibrozu iyileştirdiği bildirilmiştir (78,79).

CARVONE

Carvone çoğunlukla nane, kimyon ve dereotu gibi aromatik tıbbi bitkilerin esansiyel yağ ekstraktlarında ana fitokimyasal bileşen olarak bulunan siklik, doymamış bir monoterpenoid ketondur (Şekil 1) (80,81). Carvone'un kaynama noktası 230°C'dir (82).



Şekil 1. D-Carvone molekülünün yapısı (80)

Bu monoterpen, biyolojik özelliklerinde farklılık gösteren iki enantiyomere sahiptir. Bu enantiyomerler, kimyon tohumlarında bulunan S-(+)-Carvone (D-Carvone) ve nane yapraklarında bulunan R-(-) Carvone (L-Carvone)'dur (83). S formu kimyonda bulunan ana izomer olup, gıda ve aroma endüstrisinde kullanılmaktadır (84).

D-Carvone'un farmakolojik özellikleri arasında, antioksidan, anti-hiperlipidemik, anti-mikrobiyal, fungisidal, anti-kanser, anti-hipertansif, immünomodülatör ve anti-inflamatuar etkileri bulunmaktadır (18,84,85). Carvone'un insanlara karşı hiçbir toksik etki göstermediği bildirilmiş olup, D-Carvone için belirlenmiş kabul edilebilir günlük alım miktarı 0,6 mg/kg vücut ağırlığı/gün'dür (86).

Carvone'un non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı modeli oluşturulan ratlarda hepatik yağlanmayı azalttığı, karaciğer trigliserid ve kolesterol düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (87). Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde D-Carvone'un karaciğerde lipid sentezi ve taşınmasından sorumlu olan proteinlerin gen ifadelerini düzenleyerek lipid birikimini azalttığı bildirilmiştir (84). Ancak, D-Carvone'un palmitat ile oluşturulan hepatotoksisite üzerine etkisi bilinmemektedir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada, western blot yönteminde membranların kemilüminesans görüntülenmesi için Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden, trigliserid ölçümleri için ise Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Biyokimya Birimi'nden hizmet satın alındı. Diğer tüm deneyler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı veya Trakya Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Biyokimya Birimi'nde bulunan laboratuvarlarda yapıldı.

Kullanılan kimyasallar ve temin edilen firmalar aşağıdaki listede verilmiştir.

Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

% 0,25 Tripsin-etilendiamin tetraasetik asit solüsyonu (Thermo)
2,4-dinitrofenilhidrazin (Sigma)
2-merkaptoetanol (Sigma)
3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür (MTT) (Sigma)
Akrilamid (Merck)
Amonyum persülfat (Sigma)
Antibiyotik-antimikotik solüsyonu (100X) (Thermo)
Anti-CIAS1/NALP3/NLRP3 primer antikoru (Boster Bio)
Anti-dinitrofenol primer antikoru (Abcam)
Aseton (Merck)
ATF4 primer antikoru (Cell Signaling)

Bakır (II) sülfat pentahidrat (Sigma)

Bromofenol blue (Sigma)

D-Carvone (Sigma)

Deksametazon (Sigma)

Dimetil sülfoksit (Tekkim)

Dimetil sülfoksit- cell culture grade (Santa Cruz)

Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri-Ham's F12 besin karışımı-fenol red içeren (Wisent)

Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri-Ham's F12 besin karışımı -fenol red içermeyen (Wisent)

Etilendiamin tetraasetik asit (Sigma)

Fetal sığır serumu (Thermo)

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Merck)

Gliserol (Sigma)

Glisin (Sigma)

Hidrojen peroksit (Merck)

Hidroklorik asit (%37) (Merck)

HO1 primer antikoru (Boster Bio)

İsopropanol (Merck)

İnsulin-transferrin-selenyum çözeltisi (100X) (Wisent)

Kemilüminesans substrat (Thermo)

Metanol (Merck)

N,N,N,N-tetrametiletilendiamin (Sigma)

N,N-Metilen bis-akrilamid (Merck)

Nile red (Santa Cruz)

Poliviniliden diflorid membran (Merck)

Pre-stained protein standart (Thermo)

Sekonder antikorlar (Abcam)

Sığır serum albumini-yağ asidi içermeyen (GoldBio)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)

Sodyum hidroksit (Merck)

Sodyum karbonat (Merck)

Sodyum klorür (Sigma)

Sodyum palmitat (Sigma)

Sodyum potasyum tartarat (Merck)

Trifloroasetik asit (Carlo elba)

Tripan mavisi (Sigma)

Trizma baz (Sigma)

Tuzlu fosfat tamponu tablet (Thermo)

Tübülin primer antikoru (Santa Cruz)

Tween-20 (Santa Cruz)

Whatmann kağıdı (Sigma)

Yağsız süt tozu (BioShop)

Deneylerde Kullanılan Plastik ve Cam Laboratuvar Malzemeleri

25 cm^2 flask (Isolab)

75 cm^2 flask (Isolab)

Balon joje (Isolab)

Beher (Isolab)

Hücre kazıyıcı (Isolab)

Mezür (Isolab)

Mikroplaka (96 kuyucuklu) (Isolab)

Mikroplaka (6 kuyucuklu) (Nest)

Petri Kabı (60*15 mm) (SPL)

Petri Kabı (90*16 mm) (SPL)

Steril şırınga filtre (GVS)

Steril ve non-steril vida kapaklı santrifüj tüpü (15 ve 50 mL) (NEST)

Steril otomatik pipet uçları (20, 200 ve 1000 µL) (Isolab)

Steril serolojik pipetler (5, 10 ve 25 mL) (Isolab)

Thoma lamı (Isolab)

Steril şırınga filtre (Biosorfa)

Deneylerde, Numune Elde Etme ve Saklamada Kullanılan Cihazlar

-80 °C derin dondurucu (Heraeus HERAfreeze)

Akım-sitometre (BD FACSCanto II)

Biyogüvenlik kabini (Thermo Scientific Safe 2020)

Biyokimya Otoanalizörü (Roche C702)

Çalkalayıcı (Cleaver Scientific CW23)

Dikey elektroforez sistemi (Cleaver Scientific Omnipage Mini Vertical System)

Faz kontrast inverted mikroskop (Olympus CKX-53)

Güç kaynağı (Cleaver Scientific)

Hassas tartı (Sartorius)

Homojenizatör (Next Advance Bullet Blender Storm)

Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Daihan Scientific WiseStir)

İnkübatör (Thermo Scientific Heratherm IMC-18)

Karbondioksitli inkübatör (Thermo Scientific Forma Steri-cycle 371)

Kemilüminesans görüntüleme sistemi (Bio-rad ChemiDoc MP Imaging System)

Mikroplaka okuyucu (Biotek µQuant)

Otomatik pipetler (Eppendorf ve Capp)

pH-metre (Inolab)

Santrifüjler (Heraeus ve Nüve)

Sıvı azot tankı (Air Liquide GT21)

Su banyosu (GFL 1083)

Vorteks (Velp Scientificia)

Western blotting sistemi (Cleaver Scientific Semi Dry Blotter)

TEMEL HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI

Çalışmada Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda bulunan AML12 hücreleri kullanılmıştır. Hücreler, %10 fetal sığır serumu, %1 insülin-transferrin-selenyum çözeltisi, 40 ng/ml deksametazon ve %1 antibiyotik-antimikotik içeren Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri-Ham's F12 besin karışımı ile %5 CO_2'li ortamda 37°C'de inkübatörde yaşatıldı. Hücrelere tüm uygulamalar yatay hava akışlı biyogüvenlik kabini içerisinde steril malzemeler kullanılarak yapıldı. Deneylerde 5-25 arası hücre pasajları kullanılmıştır. Hücrelerin haftada iki kez medyumu değiştirildi ve %80-90 hücre yoğunluğuna ulaşıldığında 1:4 veya 1:6 oranında pasajlandı.

HÜCRE CANLILIĞI ÖLÇÜMLERİ

AML12 Hücrelerinde D-Carvone'un Hücre Canlılığına Etkisinin Gösterilmesi

AML12 hücrelerinde D-Carvone'un hücre canlılığına etkisi MTT hücre canlılığı testi ile gösterildi (88). 96 kuyucuklu plakalarda her bir kuyucuğa $5x10^3$ adet hücre ekildi. D-Carvone, dimetil sülfoksit ile çözüldü ve tüm deneylerde tüm grupların medyumunda % 0,2

dimetil sülfoksit vardı. Hücreler 24 saat boyunca 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µM konsantrasyonlarda D-Carvone ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 10 µl MTT (5 mg/mL, tuzlu fosfat tamponunda çözüldü) ve 100 µl fenol red içermeyen Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri-Ham's F12 besin karışımı konuldu ve 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası MTT içeren besiyeri alınarak kuyucuklarda oluşan formazan 200 µl DMSO ve 25 µl Sorenson tamponu (0,1 M glisin ve 0,1 M sodyum klorür; 0,1 M sodyum hidroksit ile pH:10,5'e ayarlandı) ile çözüldü ve oluşan renk mikroplaka okuyucuda spektrofotometrik olarak 570/630 nm'de ölçüldü (89). Her bir deney için ölçülen absorbanslar kontrol grubunun ortalamasına bölünürek sonuçlar aynı plakadaki kontrol grubunun yüzdesi olarak verildi.

AML12 Hücrelerinde Palmitatın Hücre Canlılığına Etkisinin Gösterilmesi

AML12 hücrelerine 0,25-0,5-0,75 ve 1 mM konsantrasyonlarında palmitat, 24 saat süreyle uygulandı. D-Carvone'un palmitat ile hepatotoksisite oluşturulan AML12 hücrelerinde, hücre canlılığına etkisi yukarıda anlatıldığı şekilde MTT hücre canlılık testi ile gösterildi (88,89).

Palmitat ile Hepatotoksisite Oluşturulan AML12 Hücrelerinde D-Carvone'un Hücre Canlılığına Etkisinin Gösterilmesi

AML12 hücrelerine 1 mM palmitat ile aynı anda 10, 25, 50, 100, 250 ve 500 µM D-Carvone 24 saat süreyle uygulandı. D-Carvone'un palmitat ile hepatotoksisite oluşturulan AML12 hücrelerinde, hücre canlılığına etkisi yukarıda anlatıldığı şekilde MTT hücre canlılık testi ile gösterildi (88,89).

D-CARVONE'UN YAĞLANMAYA ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

Trigliserid Ölçümü

AML12 hücrelerine 1 mM palmitat ile aynı anda 10, 25, 50, 100, 250 ve 500 µM D-Carvone 24 saat süreyle uygulandı. Deneysel prosedür sonrası PBS ile yıkanan hücreler, daha sonra %1 proteaz inhibitörü ve %0,1 Triton X-100 içeren PBS tamponu ile kazındı. Cam bilyeler kullanılarak homojenize edildikten sonra homojenat 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısımdaki süpernatant deneylerde kullanıldı. Hücre içi trigliserid düzeyleri Roche C702 marka otoanalizörün orijinal kitleri kullanılarak ölçüldü. Lowry ve ark. (90) yöntemine

göre protein ölçümü yapılarak sonuçlar proteine oranlandı ve kontrol grubunun ortalamasına oranlanarak kontrol grubunun katı olarak verildi.

Nil Red Boyama

Nile red boyama ile lipid düzeylerinin ölçümü Herms ve ark. (91) yöntemine göre yapıldı. AML12 hücrelerine 1 mM palmitat ile aynı anda 10 ve 25 μM D-Carvone 24 saat süreyle uygulandı. Deneysel prosedür sonrası hücreler tripsinle kaldırıldı, tuzlu fosfat tamponu ile yıkandı. Tuzlu fosfat tamponunda süspanse edilen hücreler, 5μg/ml asetonda çözülmüş Nile red boyası ile 5 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda numuneler akım sitometrede FL2 kanalında, 585/42nm filtre kullanılarak analiz edildi ve 10^4 hücre saydırıldı. Deneysel analiz BD Facs Canto II akım sitometresinde, FACS Diva yazılımı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama floresan yoğunluğu olarak verildi.

WESTERN BLOT ÖLÇÜMLERİ

Hem oksijenaz 1, ATF4 ve NLRP3 protein düzeyleri ölçümü için dikey elektroforez ve ardından western blot yöntemleri kullanıldı. AML12 hücrelerine 1 mM palmitat ile aynı anda 10 ve 25 μM D-Carvone 24 saat süreyle uygulandı.

Deneysel prosedür sonrası hücreler soğuk tuzlu fosfat tamponu ile iki kez yıkandı. Hücreler %1 sodyum dodesil sülfat, 0,5 M etilendiamin tetraasetik asit içeren 1 M tris tamponu (pH:8,0) ile homojenize edildi. Homojenize edildikten sonra homojenat 10000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısımdaki süpernatant deneylerde kullanıldı. Protein ölçümü Lowry ve ark. (90) yöntemine göre yapıldı. Laemmli yöntemine (92) göre %4-8 poliakrilamid jel hazırlanarak, eşit miktarda protein dikey sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıldı. Jeller yarı ıslak aktarım sistemi ile poliviniliden diflorid membrana aktarıldı. Membranlar %5 yağsız süt tozu ile 1 saat bloklandı, primer antikorlar (tümü için 1:1000 dilüsyon) ile gece boyu +4°C'de inkübe edildi. Ardından 1 saat sekonder antikorlar ile inkübe edilen membranlardaki spesifik proteinler, kemilüminesans substrat kullanılarak görüntülendi. Membranlarda stripping Sennepin ve ark. (93) göre yapıldı. Elde edilen bantlara ait yoğunluklar Image-J programı kullanılarak hesaplandı (94) ve her bir proteine ait sonuç aynı numunenin α-tübülin sonucuna oranlandı ve sonuçlar aynı membrandaki kontrol grubuna oranlanarak kontrolün katı olarak verildi.

PROTEİN KARBONİL ÖLÇÜMÜ

Protein karbonil ölçümü Levine ve ark. (95) metoduna göre yapıldı. Yukarıda western blot yöntemi bölümünde anlatıldığı şekilde elde edilen numuneler kullanıldı. Her bir numune için 10 µg protein, homojenizasyon için kullanılan tampon ile eşit hacime ayarlandı. Üzerine numune hacmi kadar %12 sodyum dodesil sülfat ve ardından numune hacminin iki katı kadar %10 trifloroasetik asit içinde çözünen 20 mM 2,4 dinitrofenilhidrazin eklendi. Karanlıkta 20 dakika inkübasyon sonrası karışıma, nötralizasyon çözeltisi (2M Tris/ %30 gliserol/ %16 2-merkaptoetanol) eklendi ve ardından yukarıda western blot yöntemi bölümünde anlatıldığı şekilde dikey elektroforez ve western blot yöntemleri ile ve anti-dinitrofenol primer antikoru (1:5000 dilüsyon) kullanılarak gerçekleştirildi. Membranlarda stripping Sennepin ve ark. (93) göre yapıldı. Elde edilen bantlara ait yoğunluklar Image-J programı kullanılarak hesaplandı (94) ve her bir proteine ait sonuç aynı numunenin α-tübülin sonucuna oranlandı. Her bir grup için sonuçlar aynı deneydeki ve membrandaki kontrol grubuna oranlanarak kontrol grubunun katı olarak verildi.

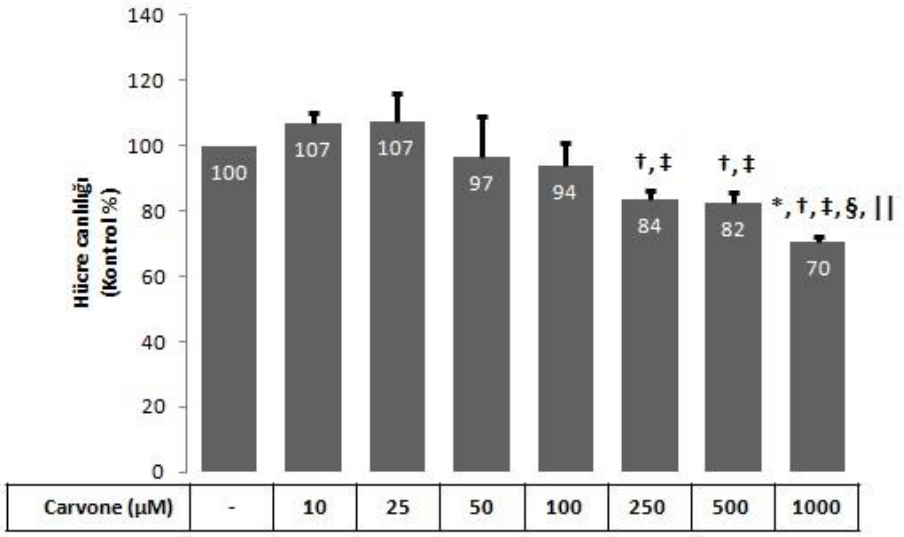
İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler SPSS 20 programı (Lisans no:10240642) kullanılarak gerçekleştirildi. Deney parametrelerinin karşılaştırılması için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edildi ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Şekil 2'de D-Carvone'un AML12 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi gösterilmiştir. 24 saat boyunca D-Carvone uygulanan AML12 hücrelerinde hücre canlılıkları kontrole göre; 10 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde %107±4, 25 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde %107±9, 50 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde %97±13, 100 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde %94±7, 250 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde %84±2, 500 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde %82±4 ve 1000 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde %70±2 bulundu.

1000 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde hücre canlılığı kontrole, 10 µM D-Carvone, 25 µM D-Carvone, 50 µM D-Carvone ve 100 µM D-Carvone uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü (tümü için $p<0,05$). 250 µM D-Carvone ve 500 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde hücre canlılığı, 10 µM D-Carvone ve 25 µM D-Carvone uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü (tümü için $p<0,05$).

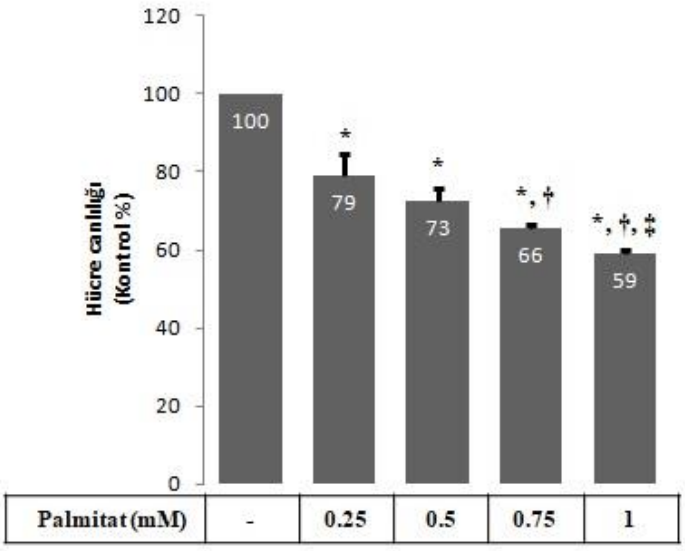


Sonuçlar 3 bağımsız tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
†: 10 µM carvone ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
‡: 25 µM carvone ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
§: 50 µM carvone ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
||: 100 µM carvone ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

Şekil 2. D-Carvone'un AML12 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi

Şekil 3'de palmitatın AML12 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi gösterilmiştir. 24 saat boyunca palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde hücre canlılıkları kontrole göre; 0,25 mM palmitat uygulanan hücrelerde %79±5, 0,5 mM palmitat uygulanan hücrelerde %73±3, 0,75 mM palmitat uygulanan hücrelerde %66±1, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde %59±1 bulundu.

Hücre canlılığı palmitat uygulanan tüm gruplarda kontrole göre anlamlı olarak azaldı (tümü için $p<0,05$). 0,75 mM palmitat uygulanan hücrelerde hücre canlılığı 0,25 mM palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü ($p<0,05$). 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde hücre canlılığı 0,25 ve 0,5 mM palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü (her ikisi için $p<0,05$).

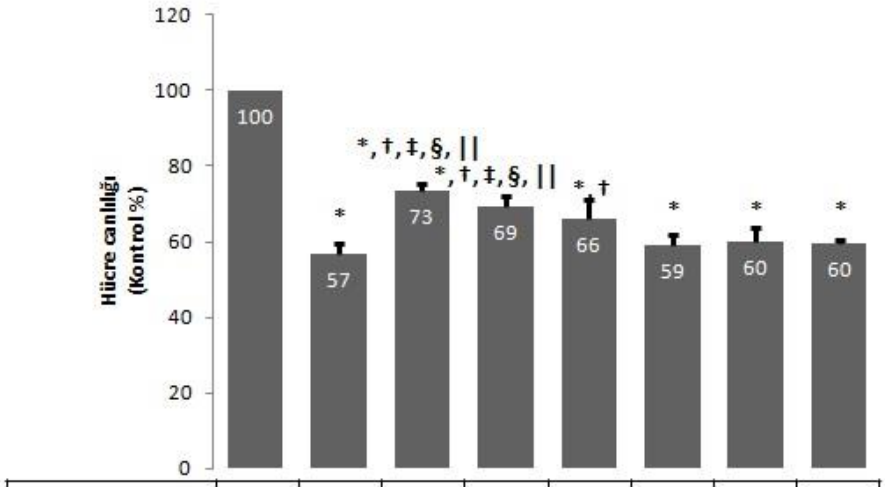


Sonuçlar 3 bağımsız tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
***: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.**
†: 0.25 mM palmitat ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
‡: 0.5 mM palmitat ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

Şekil 3. Palmitatın AML12 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi

Şekil 4'de D-Carvone ve 1 mM palmitatın AML12 hücrelerine birlikte uygulandığında hücre canlılığına etkisi gösterilmiştir. D-Carvone konsantrasyonlarından AML12 hücrelerine tek başına uygulandığında toksik olduğu görülen 1000 µM hariç diğer konsantrasyonlar AML12 hücrelerine, 1 mM palmitat ile aynı anda uygulandı. 24 saat boyunca D-Carvone ve 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde kontrole göre hücre canlılıkları 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde %57±3; 1 mM palmitat ile birlikte 10 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde %73±2, 25 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde %69±3, 50 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde %66±5, 100 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde %59±3, 250 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde %60±4 ve 500 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde %60±1 bulundu.

Hücre canlılığı palmitat uygulanan tüm gruplarda kontrole göre anlamlı olarak azaldı (tümü için $p<0,05$). 1 mM palmitat ile birlikte uygulanan 10 µM, 25 µM ve 50 µM D-Carvone hücre canlılığını, 1 mM palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak arttırdı (tümü için $p<0,05$). 1 mM palmitat ile birlikte uygulanan 10 ve 25 µM D-Carvone hücre canlılığını, 1 mM palmitat ile birlikte 100 µM, 250 µM ve 500 µM D-Carvone uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak arttırdı (tümü için $p<0,05$).



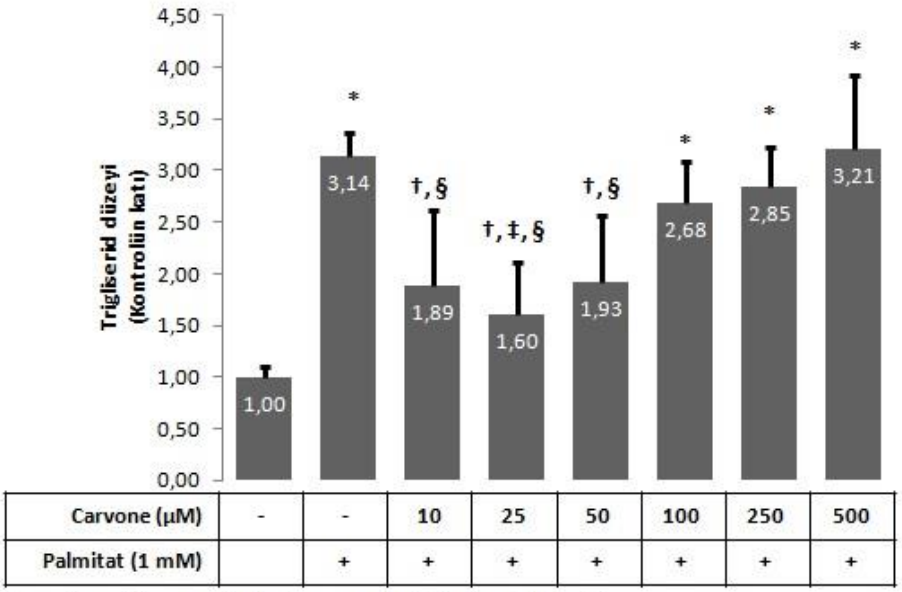
Sonuçlar 3 bağımsız tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
†: 1 mM palmitat ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
‡: 1 mM palmitat + 100 µM carvone ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
§: 1 mM palmitat + 250 µM carvone ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
||: 1 mM palmitat + 500 µM carvone ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

Şekil 4. D-Carvone'un palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi

Şekil 5'de D-Carvone'un palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde trigliserid düzeylerine etkisi görülmektedir. 24 saat boyunca D-Carvone ve 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde trigliserid düzeyleri; kontrol grubunda 1,00±0,11 olup, sadece 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrolün ortalamasının 3,14±0,22 katı, 1 mM palmitat ile birlikte 10 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde kontrolün ortalamasının 1,89±0,72 katı, 25 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde kontrolün ortalamasının 1,60±0,52 katı, 50 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde kontrolün ortalamasının 1,93±0,63 katı, 100 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde kontrolün ortalamasının 2,68±0,41 katı, 250 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde kontrolün ortalamasının 2,85±0,37 katı ve 500 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde kontrolün ortalamasının 3,21±0,72 katı olarak bulundu.

1 mM palmitat ve 1 mM palmitat ile birlikte 100 µM D-Carvone, 250 µM D-Carvone ve 500 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde trigliserid düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı (tümü için $p<0,05$). AML12 hücrelerinde 1 mM palmitat ile aynı anda 10 µM D-Carvone, 25 µM D-Carvone ve 50 µM D-Carvone uygulamaları, trigliserid düzeylerini 1 mM palmitat ve 1 mM palmitat ile birlikte 500 µM D-Carvone uygulamalarına göre anlamlı olarak azalttı (tümü için $p<0,05$). Aynı zamanda, 1 mM palmitat ile birlikte 25 µM D-Carvone

uygulanan hücrelerde trigliserid düzeyi, 1 mM palmitat ile birlikte 250 µM D-Carvone uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azdı ($p<0,05$).



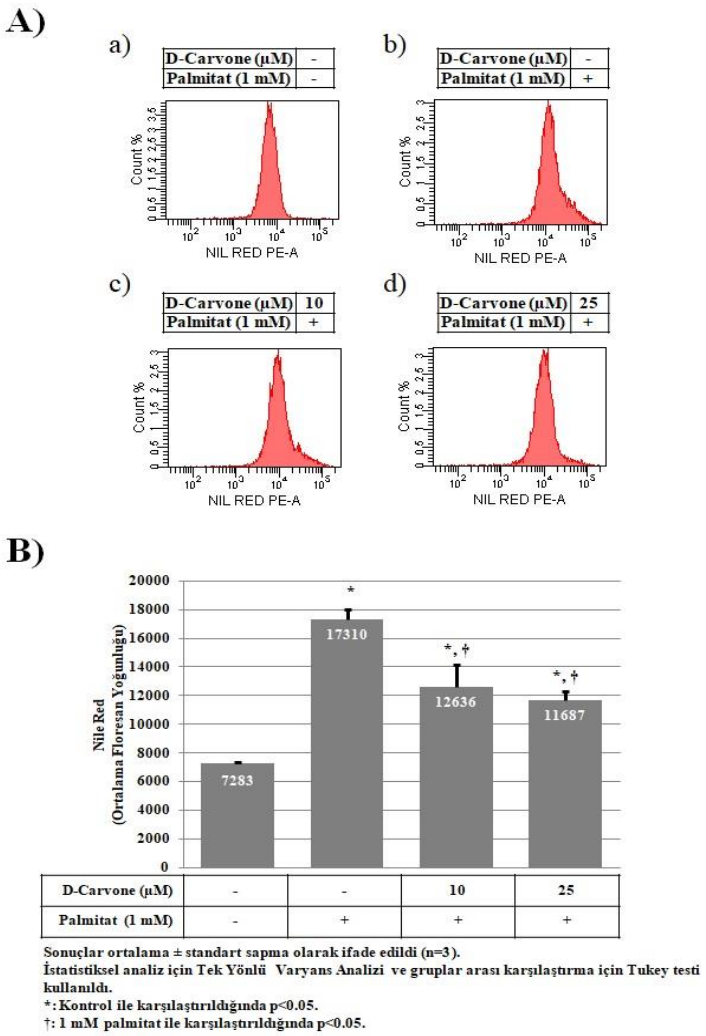
Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=4).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
†: 1 mM palmitat ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
‡: 1 mM palmitat + 250 µM carvone ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
§: 1 mM palmitat + 500 µM carvone ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

Şekil 5. D-Carvone'un palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde trigliserid düzeylerine etkisi

Hücre canlılığı ve trigliserid düzeyleri ölçümleri sonrasında palmitat ile oluşturulan hepatoksisitede en etkili olduğunu gördüğümüz 10 µM ve 25 µM D-Carvone ilerleyen deneylerde kullanıldı.

Şekil 6'da D-Carvone'un palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde Nile red ile boyanma üzerine etkisi görülmektedir. 24 saat boyunca D-Carvone ve 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde Nile red ile yapılan boyama sonrası ortalama floresan yoğunlukları; kontrol grubunda 7283±37, sadece 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde 17310±737; 1 mM palmitat ile birlikte 10 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde 12636±1506 ve 25 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde 11687±640 olarak bulundu.

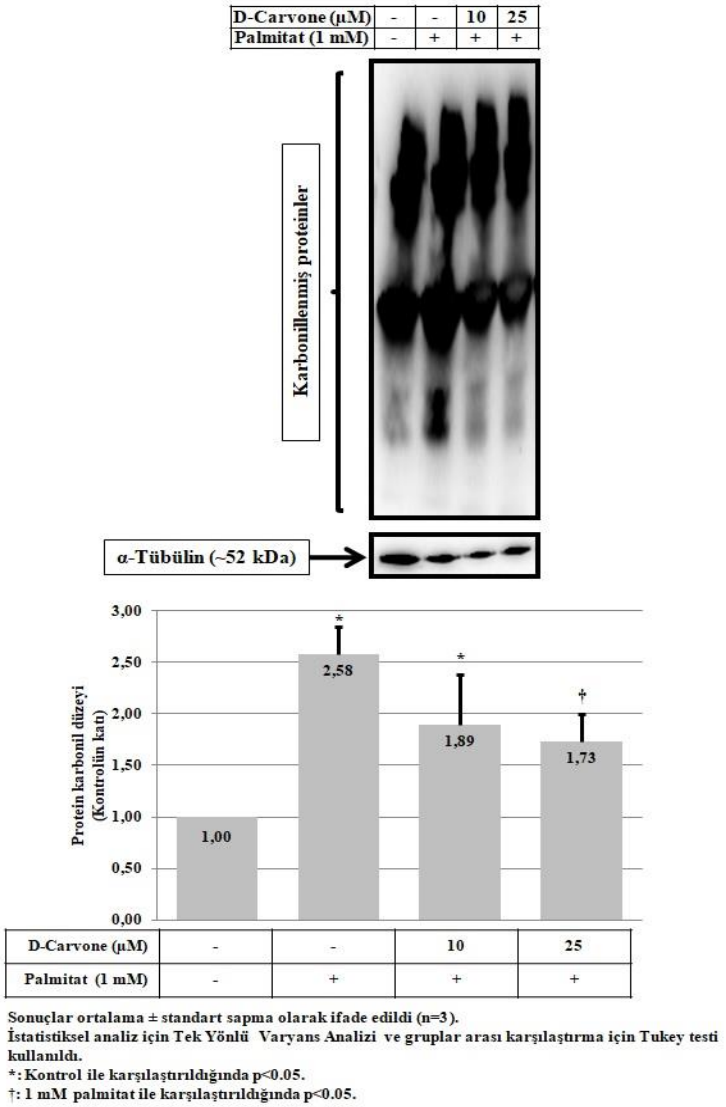
1 mM palmitat uygulaması tüm gruplarda Nile red ile boyanmayı kontrole göre anlamlı olarak arttırdı (tümü için $p<0,05$). 10 µM D-Carvone ve 25 µM D-Carvone uygulaması 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde Nile red ile boyanmada anlamlı azalmaya yol açtı (her ikisi için $p<0,05$).



Şekil 6. D-Carvone'un palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde Nile red ile boyanma üzerine etkisi

Şekil 7'de D-Carvone'un 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde protein karbonil düzeylerine etkisi gösterilmiştir. 24 saat süreyle D-Carvone ve 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde kontrole göre protein karbonil düzeyleri; 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrolün 2,58±0,26 katı, 1 mM palmitat ile birlikte 10 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde kontrolün 1,89±0,49 katı, 1 mM palmitat ile birlikte 25 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde kontrolün 1,73±0,27 katı olarak bulundu.

Protein karbonil düzeylerini, 1 mM palmitat ve 1 mM palmitat ile birlikte 10 µM D-Carvone uygulamaları kontrole göre anlamlı olarak arttırdı (her ikisi için $p<0,05$). 1 mM palmitat ile birlikte 25 µM D-Carvone uygulaması protein karbonil düzeylerini 1 mM palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı ($p<0,05$).

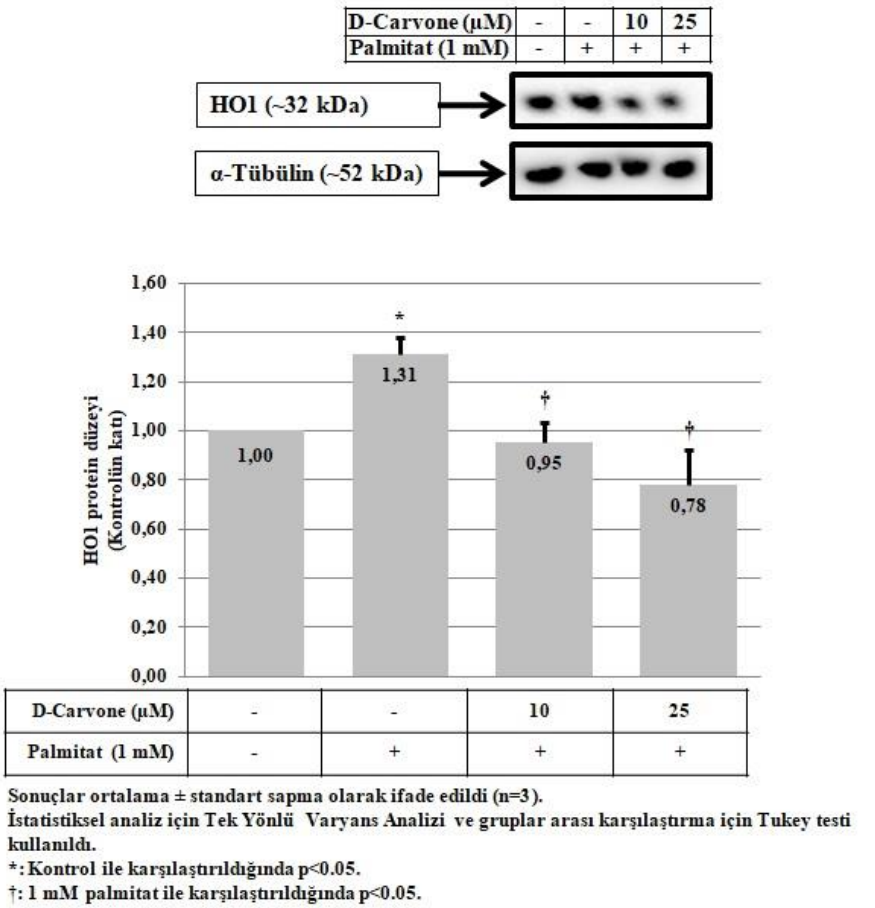


Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
†: 1 mM palmitat ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

Şekil 7. D-Carvone'un palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde protein karbonil düzeyleri üzerine etkisi

Şekil 8'de D-Carvone'un 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde HO1 protein düzeylerine etkisi gösterilmiştir. 24 saat süreyle D-Carvone ve 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde HO1 protein düzeyleri; 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrolün 1,31±0,07 katı, 1 mM palmitat ile birlikte 10 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde kontrolün 0,95±0,08 katı ve 1 mM palmitat ile birlikte 25 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde kontrolün 0,78±0,14 katı olarak bulundu.

Hem oksijenaz 1 protein düzeyleri, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrole göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$). 10 µM D-Carvone ve 25 µM D-Carvone uygulaması 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde HO1 protein düzeylerinde anlamlı azalmaya yol açtı (her ikisi için $p<0,05$).



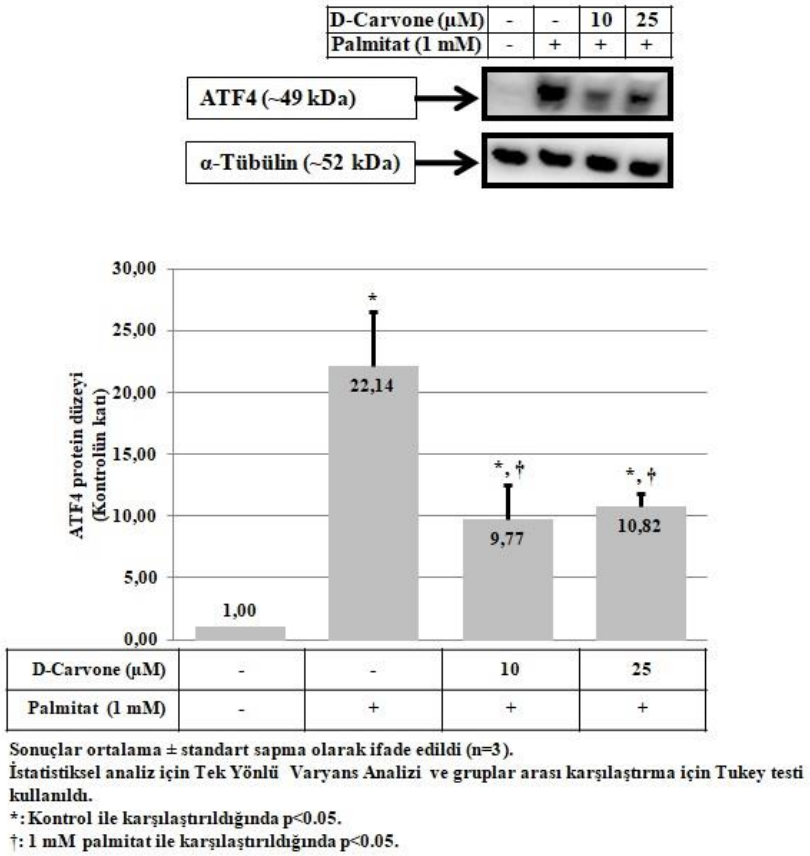
Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
†: 1 mM palmitat ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

HO1: Hem oksijenaz 1

Şekil 8. D-Carvone'un palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde hem oksijenaz 1 protein düzeyleri üzerine etkisi

Şekil 9'da D-Carvone'un 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde ATF4 protein düzeylerine etkisi gösterilmiştir. 24 saat süreyle D-Carvone ve 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde ATF4 düzeyleri; 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrolün 22,14±4,36 katı, 10 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde kontrolün 9,77±2,81 katı ve 25 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde kontrolün 10,82±0,99 katı olarak bulundu.

Aktive edici transkripsiyon faktörü 4 protein düzeyleri, 1 mM palmitat uygulanan tüm gruplarda kontrole göre anlamlı olarak arttı (tümü için $p<0,05$). 10 µM D-Carvone ve 25 µM D-Carvone uygulaması 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde ATF4 protein düzeylerinde anlamlı azalmaya yol açtı (her ikisi için $p<0,05$).



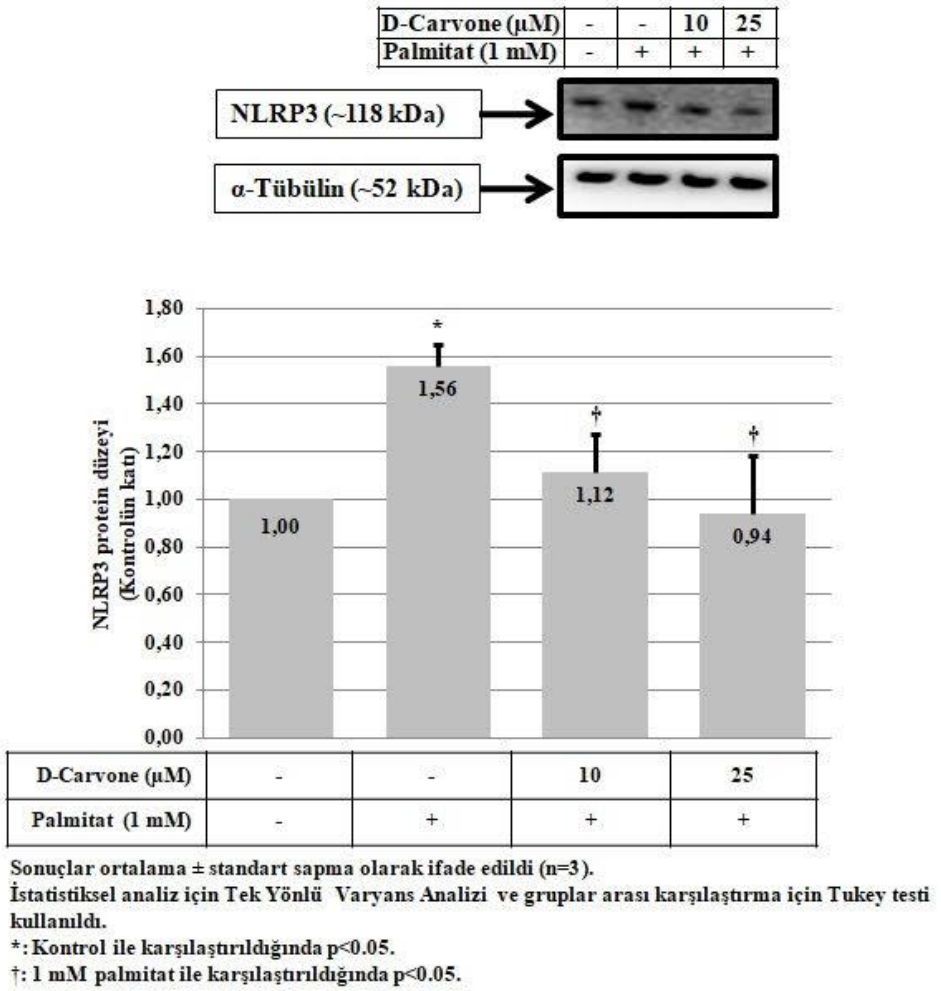
Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
†: 1 mM palmitat ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

ATF4: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4

Şekil 9. D-Carvone'un palmitat ile hepatotoksisite oluşturulan AML12 hücrelerinde aktive edici transkripsiyon faktörü 4 düzeyleri üzerine etkisi

Şekil 10'da D-Carvone'un 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde NLRP3 protein düzeylerine etkisi gösterilmiştir. 24 saat süreyle D-Carvone ve 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde NLRP3 düzeyleri; 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrolün 1,56±0,09 katı, 1 mM palmitat ile birlikte 10 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde kontrolün 1,12±0,16 katı ve 1 mM palmitat ile birlikte 25 µM D-Carvone uygulanan hücrelerde kontrolün 0,94±0,24 katı olarak bulundu.

NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3 düzeyleri, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrole göre anlamlı olarak arttı (tümü için $p<0,05$). 10 µM D-Carvone ve 25 µM D-Carvone uygulaması 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde NLRP3 protein düzeylerinde anlamlı azalmaya yol açtı (her ikisi için $p<0,05$).



Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
†: 1 mM palmitat ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

NLRP3: NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3

Şekil 10. D-Carvone'un palmitat ile hepatotoksisite oluşturulan AML12 hücrelerinde NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3 düzeyleri üzerine etkisi

Tablo 1'de çalışmamıza ait hücre canlılığı, yağlanma, protein karbonil, HO1, ATF4, NLRP3 protein düzeyleri ölçümlerine ait sonuçlar görülmektedir.

Tablo 1. Çalışmamıza ait tüm sonuçlar

HÜCRE CANLILIĞI (% Kontrol)	**D-Carvone'un hücre canlılığına etkisi**								
		Kontrol	10 µM D-Carvone	25 µM D-Carvone	50 µM D-Carvone	100 µM D-Carvone	250 µM D-Carvone	500 µM D-Carvone	1000 µM D-Carvone
	1.tekrar	100	110,78	114,76	97,26	90,27	85,76	86,22	71,00
	2.tekrar	100	104,34	109,48	108,97	102,24	84,08	81,77	71,78
	3.tekrar	100	104,97	97,48	83,80	89,48	81,15	79,02	68,37
	Palmitatın hücre canlılığına etkisi								
		Kontrol	0.25 mM palmitat	0.5 mM palmitat	0.75 mM palmitat	1 mM palmitat			
	1.tekrar	100	80,98	71,41	64,37	59,28			
	2.tekrar	100	83,18	76,24	66,48	57,75			
	3.tekrar	100	73,06	70,29	65,89	59,74			
	D-Carvone'un palmitat ile birlikte uygulandığında hücre canlılığına etkisi								
		Kontrol	1 mM palmitat	1 mM palmitat+ 10 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 25 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 50 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 100 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 250 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 500 µM D-Carvone
	1. tekrar	100	53,51	72,34	66,50	61,65	56,91	57,40	60,34
	2. tekrar	100	57,80	75,55	72,17	64,90	57,87	58,14	58,71
	3. tekrar	100	58,57	72,26	68,77	71,69	62,36	64,05	60,13

TRİGLİSERİD DÜZEYLERİ (Kontrolün katı)	Kontrol	1 mM palmitat	1 mM palmitat+ 10 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 25 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 50 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 100 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 250 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 500 µM D-Carvone
1. tekrar	0,85	3,03	2,01	2,12	2,02	2,55	3,35	3,52
2. tekrar	1,08	2,92	2,26	1,96	1,18	2,92	2,56	4,07
3.tekrar	1,06	3,18	2,45	1,07	2,71	2,16	2,90	2,71
4. tekrar	1,01	3,44	0,84	1,24	1,80	3,09	2,58	2,54

NILE RED BOYAMA (Ortalama floresan yoğunluğu)	Kontrol	1 mM palmitat	1 mM palmitat+ 10 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 25 µM D-Carvone
1.tekrar	7276	18053	13848	12302
2.tekrar	7251	17299	13111	11734
3.tekrar	7323	16579	10950	11025

PROTEİN KARBONİL (Kontrolün katı)	**D-Carvone'un palmitat ile birlikte uygulandığında protein karbonil düzeyine etkisi**					**HO1 (Kontrolün katı)**	**D-Carvone'un palmitat ile birlikte uygulandığında HO1 düzeyine etkisi**				
		Kontrol	1 mM palmitat	1 mM palmitat+ 10 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 25 µM D-Carvone			Kontrol	1 mM palmitat	1 mM palmitat+ 10 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 25 µM D-Carvone
	1.tekrar	1,00	2,76	2,28	1,83		1.tekrar	1,00	1,38	1,02	0,93
	2.tekrar	1,00	2,70	2,04	1,94		2.tekrar	1,00	1,23	0,97	0,65
	3.tekrar	1,00	2,28	1,35	1,42		3.tekrar	1,00	1,32	0,86	0,76

ATF4 (Kontrolün katı)	**D-Carvone'un palmitat ile birlikte uygulandığında ATF4 düzeyine etkisi**					**NLRP3 (Kontrolün katı)**	**D-Carvone'un palmitat ile birlikte uygulandığında NLRP3 düzeyine etkisi**				
		Kontrol	1 mM palmitat	1 mM palmitat+ 10 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 25 µM D-Carvone			Kontrol	1 mM palmitat	1 mM palmitat+ 10 µM D-Carvone	1 mM palmitat+ 25 µM D-Carvone
	1.tekrar	1,00	23,05	8,04	11,52		1.tekrar	1,00	1,48	0,93	0,73
	2.tekrar	1,00	17,40	8,24	9,69		2.tekrar	1,00	1,53	1,20	0,89
	3.tekrar	1,00	25,98	13,02	11,27		3.tekrar	1,00	1,66	1,21	1,20

HO1: Hem oksijenaz 1; **ATF4:** Aktive edici transkripsiyon faktörü 4;. **NLRP3**: NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3.

TARTIŞMA

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, alkol tüketimi veya sekonder nedenler olmaksızın hepatositlerde ektopik yağ birikimi ile karakterizedir. NAFLD, dünya çapında en yaygın görülen kronik karaciğer hastalıklarından biridir ve görülme sıklığı gittikçe artmaktadır. NAFLD, basit yağlanma, siroz ve hepatoselüler karsinom gibi önemli komplikasyonlarla ilişkilendirilebilen ilerleyici bir hastalık olduğu için bu artış endişe vericidir. Günümüzde, NAFLD'nin tedavisi için onaylanmış bir ilaç bulunmamakta olup, NAFLD için potansiyel terapötik hedeflerin bulunması bir öncelik haline gelmiştir (96,97).

Carvone, çoğunlukla kimyon, nane ve dereotu gibi aromatik tıbbi bitkilerin esansiyel yağ ekstraktlarında bulunan doymamış bir monoterpenoid ketondur. Carvone'un iki izomeri bulunur. Bunlardan D-Carvone'un farmakolojik özellikleri arasında, antioksidan, anti-hiperlipidemik, anti-mikrobiyal, fungisidal, anti-kanser, anti-hipertansif, immünomodülatör ve anti-inflamatuar etkileri bulunmaktadır (18,84,85).

Doymuş yağ asitlerinin neden olduğu hepatotoksisite, NAFLD'nin oluşumunda ve patolojik gelişiminde çok önemli bir rol oynamaktadır. Hepatotoksisitenin oluşumunda oksidatif stres ve ER stresi temel rol oynayan hücre içi sinyal yolaklarıdır. Hepatositlerin doymuş yağ asitlerine maruz kalması, oksidatif stres ve ER stresini indükler ve inflamasyonu arttırır böylelikle, karaciğer hücre hasarını artırarak, hücreyi ölüme götürmektedir. Aynı zamanda doymuş yağ asitlerinin, NLRP3'ü aktive ettiği de bildirilmiştir (98-99). Palmitat, gıdalarda ve insan vücudunda en fazla bulunan doğal doymuş yağ asitidir ve deneysel hepatotoksisiteyi indüklemek için yaygın olarak kullanılır (3). Literatürde hepatotoksisitenin moleküler düzeyde araştırıldığı çalışmalarda fare kaynaklı hepatosit hücreleri olan AML12 hücreleri sıklıkla kullanılmıştır (6–8).

Palmitata bağlı hepatotoksisitede D-Carvone'un etkisi bilinmemektedir. Çalışmamızda palmitat ile oluşturulan hepatotoksisitede D-Carvone'un hücre canlılığına, yağlanmaya, oksidatif strese, ER stresi ve inflamazom aktivasyonu üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

Literatürde D-Carvone'un AML12 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlamadık. Bununla birlikte, HepG2 hücre hattında yapılan bir çalışmada D-Carvone'un çalışmadaki en yüksek doz olan 332 μM'da dahi toksik olmadığı (100), insan epitelyoma Tip 2 hücrelerinde, 620 μM D-Carvone'un hücrelerin %50'sinde ölüme yol açtığı (101), AGS mide kanseri hücre hattında ise 35 μM D-Carvone'un hücrelerin %50'sinde ölüme yol açtığı (85) bildirilmiştir. Literatürdeki farklı hücre hatlarındaki farklı sonuçlar sebebiyle öncelikle çalışmamızda 0-1000 μM aralığındaki D-Carvone konsantrasyonları, AML12 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanarak D-Carvone'un hücre canlılığı üzerine etkisi araştırıldı. D-Carvone hücre canlılığını 1000 μM konsantrasyonda anlamlı olarak azalttı.

AML12 hücrelerinde palmitat uygulamasının hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir (37,102). Literatürle uyumlu olarak çalışmamızda da 0,25-0,5-0,75 ve 1 mM palmitat uygulamaları hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı. Bununla birlikte, D-Carvone'un palmitat ile oluşturulan hücresel hepatotoksisite üzerine etkisi bilinmemekte olup çalışmamızda 10, 25 ve 50 μM D-Carvone 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde, hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdı. Bu bulgumuz ile D-Carvone'un, AML12 hücrelerinde palmitatın neden olduğu sitotoksisiteyi önlemede etkili olduğunu ilk kez gösterdik.

Palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde yağlanmanın arttığı bilinmektedir (102,103). Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak palmitat uygulaması hücre içi trigliserid düzeyini anlamlı olarak arttırdı. Literatürde D-Carvone'un palmitat ile oluşturulan yağlanma üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamakla birlikte Alsanae ve ark. (84), yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde D-Carvone'un hepatik trigliserid birikimini azalttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda 10, 25 ve 50 μM D-Carvone, palmitatın sebep olduğu trigliserid düzeylerindeki artışı anlamlı olarak azalttı. Aynı zamanda palmitat ile oluşturulan sitotoksisite ve yağlanmayı en fazla azaltan 10 ve 25 μM D-Carvone'un yağlanmaya etkisini Nile red boyama ile de gösterdik. Trigliserid sonuçları ile benzer şekilde palmitat uygulaması AML12 hücrelerinin Nile red ile boyanmasını anlamlı olarak arttırdı, 10 ve 25 μM D-Carvone palmitata bağlı Nile red ile boyanmayı anlamlı olarak azalttı. Trigliserid ve Nile red ile boyanma sonuçlarımız, D-Carvone'un AML12 hücrelerinde palmitat ile oluşturulan yağlanmayı azalttığını göstermektedir.

Literatürde palmitat uygulanan hepatositlerde oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir (34,37,104). Noriyoshi Ogino ve ark (105), hem palmitat enjekte edilen farelerde hem de yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde karaciğer HO1 protein düzeylerinin arttığını bildirmiştir. Literatürle uyumlu olarak çalışmamızda 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde protein karbonil ve HO1 düzeyleri anlamlı olarak arttı. Bununla birlikte çalışmamızda, D-Carvone, palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde 25 μM konsantrasyonda protein karbonil düzeyini, 10 ve 25 μM konsantrasyonlarda da HO1 düzeylerini anlamlı olarak azalttı. Bu bulgularımız ışığında, D-Carvone'un palmitata bağlı oluşan oksidatif stresi azalttığını, HO1'deki artışı oksidatif stresi azaltarak engellediğini söyleyebiliriz.

Palmitat ile oluşturulan hepatotoksisitede palmitatın ATF4 ve NLRP3 düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir (36,98,102,104,106). Literatürle uyumlu olarak çalışmamızda 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde ATF4 ve NLRP3 düzeyleri anlamlı olarak arttı. Bununla birlikte çalışmamızda, 1 mM palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde 10 ve 25 μM D-Carvone, ATF4 ve NLRP3 düzeylerini anlamlı olarak azalttı. ATF4 ve NLRP3 sonuçlarımız, D-Carvone'un AML12 hücrelerinde ER stresi ve inflamazom aktivasyonuna karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamız, D-Carvone'un AML12 hücrelerinde palmitat uygulamasına bağlı olarak artan sitotoksisiteyi, yağlanmayı, oksidatif stresi, ER stresini ve inflamazom aktivasyonunu azalttığını gösterdi. Bu çalışma ile, D-Carvone'un palmitata bağlı hepatotoksisite üzerine faydalı etkileri olduğu ilk kez in-vitro olarak gösterilmiştir.

SONUÇLAR

Palmitat ile hepatotoksisite oluşturulan AML12 hücrelerinde D-Carvone'un hücre canlılığına, yağlanmaya, oksidatif strese, ER stresine ve inflamazom aktivasyonu üzerine etkisini araştırmayı amaçladığımız bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar şunlardır:

1. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM ve 500 µM D-Carvone hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak değiştirmedi.
2. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan 250 µM ve 500 µM D-Carvone, hücre canlılığını 10 µM ve 25 µM D-Carvone uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
3. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan 1000 µM D-Carvone hücre canlılığını kontrole, 10 µM, 25 µM, 50 µM ve 100 µM D-Carvone uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
4. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan tüm palmitat konsantrasyonları, hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak azalttı.
5. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan 0,75 mM palmitat hücre canlılığını 0,25 mM palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
6. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan 1 mM palmitat hücre canlılığını 0,25 ve 0,5 mM palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
7. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan 1 mM palmitat, tüm gruplarda hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak azalttı.
8. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine 1 mM palmitatla birlikte uygulanan 10 µM, 25 µM ve 50 µM D-Carvone, 1 mM palmitat uygulanan hücrelere göre hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdı.

9. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine 1 mM palmitatla birlikte uygulanan 10 µM ve 25 µM D-Carvone, 1 mM palmitat ile birlikte 100 µM, 250 µM ve 500 µM D-Carvone uygulanan hücrelere göre hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdı.
10. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan 1 mM palmitat ve 1 mM palmitatla birlikte uygulanan 100 µM, 250 µM, 500 µM D-Carvone trigliserid düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
11. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine 1 mM palmitatla birlikte uygulanan 10 µM, 25 µM ve 50 µM D-Carvone trigliserid düzeylerini 1 mM palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
12. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine 1 mM palmitatla birlikte uygulanan 25 µM D-Carvone trigliserid düzeylerini 1 mM palmitatla birlikte 250 µM D-Carvone uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
13. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine 1 mM palmitatla birlikte uygulanan 10 µM, 25 µM ve 50 µM D-Carvone trigliserid düzeylerini 1 mM palmitatla birlikte 500 µM D-Carvone uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
14. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan 1 mM palmitat, tüm gruplarda Nile red ile boyanmayı kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
15. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine 1 mM palmitatla birlikte uygulanan 10 µM ve 25 µM D-Carvone Nile red ile boyanmayı 1 mM palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
16. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan 1 mM palmitat ve 1 mM palmitatla birlikte uygulanan 10 µM D-Carvone, protein karbonil düzeyini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
17. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine 1 mM palmitatla birlikte uygulanan 25 µM D-Carvone, protein karbonil düzeylerini 1 mM palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
18. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan 1 mM palmitat, HO1 düzeyini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
19. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan 1 mM palmitatla birlikte uygulanan 10 µM ve 25 µM D-Carvone, HO1 düzeylerini 1 mM palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
20. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan 1 mM palmitat, tüm gruplarda ATF4 düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.

21. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine 1 mM palmitatla birlikte uygulanan 10 µM ve 25 µM D-Carvone, ATF4 düzeylerini 1 mM palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
22. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan 1 mM palmitat, NLRP3 düzeyini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
23. 24 saat boyunca AML12 hücrelerine uygulanan 1 mM palmitatla birlikte uygulanan 10 µM ve 25 µM D-Carvone, NLRP3 düzeylerini 1 mM palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.

Bu çalışma ile palmitat ile hepatotoksisite oluşturulan AML12 hücrelerinde D-Carvone'un, hücre canlılığını arttırırken, lipid birikimini, oksidatif stresi, endoplazmik retikulum stresini ve inflamazom aktivasyonunu azalttığını gösterdik.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, palmitat ile hepatotoksisite oluşturulan AML12 hücrelerinde D-Carvone'un hücre canlılığına, yağlanmaya, oksidatif strese, endoplazmik retikulum stresine ve inflamazom aktivasyonu üzerine etkisini araştırmaktır.

AML12 hücrelerine 24 saat süreyle tek başına D-Carvone ve palmitat ve 1 mM palmitat ile birlikte D-Carvone uygulandı. Hücre canlılığı 3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür testi ile ölçüldü. Hücre içi lipid birikimi trigliserid düzeyi ölçümü ile spektrofotometrik olarak ve Nile red boyama ile akım sitometrede ölçüldü. Protein karbonil, hem oksijenaz 1, aktive edici transkripsiyon faktör 4 ve NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3 düzeyleri western blot yöntemiyle ölçüldü.

1 mM palmitat hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya ve trigliserid düzeylerinde anlamlı bir artışa yol açtı. 10 μM, 25 μM ve 50 μM D-Carvone, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde, hücre canlılığını anlamlı olarak arttırken, trigliserid düzeylerini anlamlı olarak azalttı. Bundan sonraki deneylerde, palmitata bağlı hepatotoksisitede en etkili olduğu gösterilen 10 μM ve 25 μM D-Carvone kullanıldı. 1 mM palmitat AML12 hücrelerinde Nile red ile boyanmayı, protein karbonil, hem oksijenaz 1, aktive edici transkripsiyon faktör 4 ve NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3 düzeylerini anlamlı olarak arttırdı. 10 μM ve 25 μM D-Carvone, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde Nile red ile boyanmayı, hem oksijenaz 1, aktive edici transkripsiyon faktör 4 ve NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3 düzeylerini anlamlı olarak azalttı. Aynı zamanda 25 μM D-Carvone, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde protein karbonil düzeylerini de anlamlı olarak azalttı.

Sonuç olarak çalışmamız, palmitat ile hepatotoksisite oluşturulan AML12 hücrelerinde D-Carvone'un, hücre canlılığını arttırırken, lipid birikimini, oksidatif stresi, endoplazmik retikulum stresini ve inflamazom aktivasyonunu azalttığını gösterdi.

Anahtar Kelimeler: palmitat, D-carvone, AML12, protein karbonil, oksidatif stres, hem oksijenaz 1, endoplazmik retikulum stresi, inflamazom

EFFECT OF D-CARVONE ON PALMITATE-INDUCED CELLULAR HEPATOTOXICITY

SUMMARY

The aim of this study is to investigate the effect of D-Carvone on cell viability, steatosis, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and inflammasome activation in palmitate-induced hepatotoxicity in AML12 cells.

AML12 cells were treated with D-Carvone alone, palmitate alone and in combination D-Carvone with 1 mM palmitate for 24 hours. Cell viability was measured by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide test. Intracellular lipid accumulation was measured spectrophotometrically with triglyceride levels measurement, and by flow cytometry with Nile red staining. Protein carbonyl, heme oxygenase 1, activating transcription factor 4 and NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 levels were measured by western blot method.

1 mM palmitate caused a significant decrease in cell viability and a significant increase in triglyceride levels. 10 μM, 25 μM and 50 μM D-Carvone significantly decreased triglyceride levels while increasing cell viability significantly in 1 mM palmitate-treated cells. In subsequent experiments, 10 μM and 25 μM D-Carvone were used, which were shown to be most effective in palmitate-induced hepatotoxicity. 1 mM palmitate significantly increased staining with Nile red, protein carbonyl, heme oxygenase 1, activating transcription factor 4 and NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 in AML12 cells. 10 μM and 25 μM D-Carvone significantly reduced staining with Nile red, heme oxygenase 1, activating

transcription factor 4 and NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 in 1 mM palmitate-treated cells. At the same time, 25 μM D-Carvone significantly reduced protein carbonyl levels in cells treated with 1 mM palmitate.

In conclusion, our study showed that D-Carvone decreased lipid accumulation, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and inflammasome activation while increasing cell viability in palmitate-induced hepatotoxicity in AML12 cells.

Keywords: palmitate, D-carvone, AML12, protein carbonyl, oxidative stress, heme oxygenase 1, endoplasmic reticulum stress, inflammasome

KAYNAKLAR

1. Hu H, Han Y, Cao C, He Y. The triglyceride glucose-body mass index: a non-invasive index that identifies non-alcoholic fatty liver disease in the general Japanese population. J Transl Med 2022;20(1):398.

2. Zhao NQ, Li XY, Wang L, Feng ZL, Li XF, Wen YF, et al. Palmitate induces fat accumulation by activating C/EBPβmediated G0S2 expression in HepG2 cells. World J Gastroenterol 2021;23(43):7705–15.

3. Ogawa Y, Imajo K, Honda Y, Kessoku T, Tomeno W, Kato S, et al. Palmitate-induced lipotoxicity is crucial for the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in cooperation with gut-derived endotoxin. Sci Rep 2018;8(1):11365.

4. Liu J, Zhang T, Zhu J, Ruan S, Li R, Guo B, et al. Honokiol attenuates lipotoxicity in hepatocytes via activating SIRT3-AMPK mediated lipophagy. Chin Med 2021;16(1):115.

5. Chen W, Lu Y, Hu D, Mo J, Ni J. Black mulberry (Morus nigra L.) polysaccharide ameliorates palmitate-induced lipotoxicity in hepatocytes by activating Nrf2 signaling pathway. Int J Biol Macromol 2021;172:394–407.

6. Mushtaq A, Ashraf NU, Altaf M. The mTORC1–G9a–H3K9me2 axis negatively regulates autophagy in fatty acid–induced hepatocellular lipotoxicity. J Biol Chem 2023;299(3):102937.

7. Park NW, Lee ES, Ha KB, Jo SH, Kim HM, Kwon MH, et al. Umbelliferone ameliorates hepatic steatosis and lipid-induced ER stress in high-fat diet-induced Obese Mice. Yonsei Med J 2023;64(4):243–50.

8. Xu T, Song Q, Zhou L, Yang W, Wu X, Qian Q, et al. Ferulic acid alleviates lipotoxicity-induced hepatocellular death through the SIRT1-regulated autophagy pathway and independently of AMPK and Akt in AML-12 hepatocytes. Nutr Metab 2021;18(1):1–13.

9. Hwang YJ, Wi HR, Kim HR, Park KW, Hwang KA. Pinus densiflora Sieb. et Zucc. alleviates lipogenesis and oxidative stress during oleic acid-induced steatosis in HepG2 Cells. Nutrients 2014;6(7):2956–72.

10. Li BB, Zhang SB, Lv YY, Wei S, Hu Y Sen. Reactive oxygen species-induced protein carbonylation promotes deterioration of physiological activity of wheat seeds. PLoS One 2022;17(3):1–14.

11. Feng XE, Liang TG, Gao J, Kong DP, Ge R, Li QS. Heme oxygenase-1, a key enzyme for the cytoprotective actions of halophenols by upregulating Nrf2 expression via activating Erk1/2 and PI3K/Akt in EA.hy926 cells. Oxid Med Cell Longev 2017;2017:7028478.

12. Cao J, Dai DL, Yao L, Yu HH, Ning B, Zhang Q, et al. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. Mol Cell Biochem 2012;364(1–2):115–29.

13. Wang Z, Zhang S, Xiao Y, Zhang W, Wu S, Qin T, et al. NLRP3 inflammasome and inflammatory diseases. Oxid Med Cell Longev 2020;2020:4063562.

14. Lavoie PM, Levy O. Mononuclear phagocyte system. In: Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW (Eds.). Fetal and neonatal physiology 5th ed. Elsevier; 2017.p. 1208-1216.

15. Cai C, Zhu X, Li P, Li J, Gong J, Shen W, et al. NLRP3 deletion inhibits the non-alcoholic steatohepatitis development and inflammation in kupffer cells induced by palmitic acid. Inflammation 2017;40(6):1875-83.

16. Wang YG, Fang WL, Wei J, Wang T, Wang N, Ma JL, et al. The involvement of NLRX1 and NLRP3 in the development of nonalcoholic steatohepatitis in mice. J Chinese Med Assoc 2013;76(12):686–92.

17. Ganz M, Bukong TN, Csak T, Saha B, Park JK, Ambade A, et al. Progression of non-alcoholic steatosis to steatohepatitis and fibrosis parallels cumulative accumulation of danger signals that promote inflammation and liver tumors in a high fat-cholesterol-sugar diet model in mice. J Transl Med 2015;13(1):1–14.

18. Zhao M, Du J. Anti-inflammatory and protective effects of d-carvone on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury in mice. J King Saud Univ - Sci 2020;32(2):1592–6.

19. Vinothkumar R, Nalini N. Supplementation with d-carvone induces cytotoxicity and mitochondrial mediated apoptosis in human colon cancer cell lines HT-29 and SW480. Int J Pharm Biol Arch 2013;4(2):502–10.

20. Geng Y, Nico K, Meijer VE De, Blokzijl H, Moshage H. How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease ? Hepatol Int 2021;15(1):21–35.

21. Abe RAM, Masroor A, Khorochkov A, Prieto J, Singh KB, Nnadozie MC, et al. The role of vitamins in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. Cureus 2021;13(8):e16855.

22. Ramos VM, Kowaltowski AJ, Kakimoto PA. Autophagy in hepatic steatosis: A structured review. Front Cell Dev Biol 2021;9:657389.

23. Sodum N, Kumar G, Bojja SL, Kumar N, Rao CM. Epigenetics in NAFLD/NASH: Targets and therapy. Pharmacol Res 2021;167:105484.

24. Ao N, Ma Z, Yang J, Jin S, Zhang K, Luo E, et al. Liraglutide ameliorates lipotoxicity-induced inflammation through the mTORC1 signalling pathway. Peptides 2020;133:170375.

25. Rada P, González-Rodríguez Á, García-Monzón C, Valverde ÁM. Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver? Cell Death Dis 2020;11:802.

26. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Metabolism 2016;65(8):1038–48.

27. Youn Y, Kim YS. Inhibitory effects of Citrus unshiu pericarpium extracts on palmitate-induced lipotoxicity in HepG2 cells. Food Sci Biotechnol 2016;25(6):1709–17.

28. Kadegowda AKG, Yu L. Effects of dietary lipid intake on diabetes. Functional dietary lipids. In: Sanders T (Ed.). Cambridge: Elsevier; 2016.p.151–176.

29. Kumar S, Duan Q, Wu R, Harris EN, Su Q. Pathophysiological communication between hepatocytes and non-parenchymal cells in liver injury from NAFLD to liver fibrosis. Adv Drug Deliv Rev 2021;176:113869.

30. Cariou B, Byrne CD, Loomba R, Sanyal AJ. Nonalcoholic fatty liver disease as a metabolic disease in humans: A literature review. Diabetes Obes Metab 2021;23(5):1069–83.

31. Ahmed M. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015. World J Hepatol 2015;7(11):1450–9.

32. Campbell P, Symonds A, Barritt AS. Therapy for nonalcoholic fatty liver disease: Current options and future directions. Clin Ther 2021;43(3):500–17.

33. AML12 cell line https://www.atcc.org/products/crl-2254 Erişim tarihi: 25.04.23

34. Demirel T, Batirel S. Palmitic acid induces endoplasmic reticulum stress in AML12 liver cells. Marmara Med J 2018;31(1):40–6.

35. Ramos MJ, Bandiera L, Menolascina F, Fallowfield JA. In vitro models for non-alcoholic fatty liver disease: Emerging platforms and their applications. iScience 2022;25(1):103549.

36. Peng Z, Li X, Xing D, Du X, Wang Z, Liu G, et al. Nobiletin alleviates palmitic acid-induced NLRP3 inflammasome activation in a sirtuin 1-dependent manner in AML-12 cells. Mol Med Rep 2018;18(6):5815–22.

37. Yang L, Wei J, Sheng F, Li P. Attenuation of palmitic acid–induced lipotoxicity by chlorogenic acid through activation of SIRT1 in hepatocytes. Mol Nutr Food Res

2019;63(14): e1801432.

38. Varesi A, Chirumbolo S, Campagnoli LIM, Pierella E, Piccini GB, Carrara A, et al. The role of antioxidants in the interplay between oxidative stress and senescence. Antioxidants 2022;11(7):1224.

39. Morvaridzadeh M, Agah S, Dulce Estêvão M, Hosseini AS, Heydari H, Toupchian O, et al. Effect of saffron supplementation on oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. Food Sci Nutr 2021;9(10):5809–19.

40. Zhang D, Xu ZC, Su W, Yang YH, Lv H, Yang H, et al. ICarPS: A computational tool for identifying protein carbonylation sites by novel encoded features. Bioinformatics 2021;37(2):171–7.

41. Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, et al. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. Front Physiol 2020;11:694.

42. Aranda-Rivera AK, Cruz-Gregorio A, Arancibia-Hernández YL, Hernández-Cruz EY, Pedraza-Chaverri J. RONS and oxidative stress: An overview of basic concepts. Oxygen 2022;2(4):437–78.

43. Juan CA, de la Lastra JMP, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. Int J Mol Sci 2021;22(9):4642.

44. Akagawa M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. Free Radic Res 2021;55(4):307–20.

45. Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. Mass Spectrom Rev 2014;33(2):79–97.

46. Consoli V, Sorrenti V, Grosso S, Vanella L. Heme oxygenase-1 signaling and redox homeostasis in physiopathological conditions. Biomolecules 2021;11(4):589.

47. Stec DE, Hinds TD. Natural product heme oxygenase inducers as treatment for nonalcoholic fatty liver disease. Int J Mol Sci 2020;21(24):1–16.

48. Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. Pharmacol Rev 2008;60(1):79–127.

49. Wu J, Li S, Li C, Cui L, Ma J, Hui Y. The non-canonical effects of heme oxygenase-1, a classical fighter against oxidative stress. Redox Biol 2021;47:102170.

50. Waza AA, Hamid Z, Ali S, Bhat SA, Bhat MA. A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil. Inflamm Res 2018;67(7):579–88.

51. Martínez-Casales M, Hernanz R, Alonso MJ. Vascular and macrophage heme oxygenase-1 in hypertension: A mini-review. Front Physiol 2021;12:1–7.

52. Hahn D, Shin SH. Natural antioxidant and anti-inflammatory compounds in foodstuff or medicinal herbs inducing heme oxygenase-1 expression. Antioxidants 2020;9(12):1191.

53. Chen S, Wang X, Nisar MF, Lin M, Zhong JL. Heme oxygenases: Cellular multifunctional and protective molecules against UV-induced oxidative stress. Oxid Med Cell Longev 2019;2019:5416728.

54. Gáll T, Balla G, Balla J. Heme, heme oxygenase, and endoplasmic reticulum stress—a new insight into the pathophysiology of vascular diseases. Int J Mol Sci 2019;20(15):1–24.

55. Duvigneau JC, Esterbauer H, Kozlov A V. Role of heme oxygenase as a modulator of heme-mediated pathways. Antioxidants 2019;8(10):1–26.

56. Campbell NK, Fitzgerald HK, Dunne A. Regulation of inflammation by the antioxidant haem oxygenase 1. Nat Rev Immunol 2021;21(7):411–25.

57. Carota G, Raffaele M, Sorrenti V, Salerno L, Pittalà V, Intagliata S. Ginseng and heme oxygenase-1: The link between an old herb and a new protective system. Fitoterapia 2019;139:104370.

58. Ajoolabady A, Kaplowitz N, Lebeaupin C, Kroemer G, Kaufman RJ, Malhi H, et al. Endoplasmic reticulum stress in liver diseases. Hepatology 2023:77(2):619-39.

59. Yap KN, Yamada KL, Zikeli S, Kiaris H, Hood WR. Evaluating endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response through the lens of ecology and evolution. Biol Rev 2021;96(2):541–56.

60. Féral K, Jaud M, Philippe C, Di Bella D, Pyronnet S, Rouault-Pierre K, et al. ER stress and unfolded protein response in leukemia: Friend, foe, or both? Biomolecules 2021;11(2):1–31.

61. Song MJ, Malhi H. The unfolded protein response and hepatic lipid metabolism in non alcoholic fatty liver disease. Pharmacol Ther 2019;203:107401.

62. Zhu H, Zhou H. Novel insight into the role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury. Oxid Med Cell Longev 2021;2021: 5529810.

63. Lebeaupin C, Vallée D, Hazari Y, Hetz C, Chevet E, Bailly-Maitre B. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. J Hepatol 2018;69(4):927–47.

64. Flessa CM, Kyrou I, Nasiri-Ansari N, Kaltsas G, Papavassiliou AG, Kassi E, et al. Endoplasmic reticulum stress and autophagy in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Current evidence and perspectives. Curr Obes Rep 2021;10(2):134–61.

65. Kasai S, Yamazaki H, Tanji K, Engler MJ, Matsumiya T, Itoh K. Role of the ISRATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control. J Clin Biochem Nutr 2019;64(1):1–12.

66. Scott A. Oakes FRP. The Role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. Annu Rev Pathol 2015;10(1):173–94.

67. Hetz C, Chevet E, Harding HP. Targeting the unfolded protein response in disease. Nat Rev Drug Discov 2013;12(9):703–19.

68. Wicherska-pawłowska K, Wróbel T, Rybka J. Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs) and rig-i-like receptors (RLRs) in innate immunity. TLRs, NLRs and RLRs ligands as immunotherapeutic agents for hematopoietic diseases. Int J Mol Sci 2021;22(24): 13397.

69. Swanson KV, Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. Nat Rev Immunol 2019;19(8):477–89.

70. Torres S, Segalés P, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondria and the NLRP3 inflammasome in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. Cells 2022;11(9):1475.

71. Benameur T, Frota Gaban SV, Giacomucci G, Filannino FM, Trotta T, Polito R, et al. The effects of curcumin on inflammasome: Latest update. Molecules 2023;28(2):1–19.

72. Song N, Li T. Regulation of NLRP3 inflammasome by phosphorylation. Front Immunol 2018;9:1–9.

73. Lu X, Huang H, Fu X, Chen C, Liu H, Wang H, et al. The role of endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome in liver disorders. Int J Mol Sci 2022;23(7):3528.

74. Huang Q, Xin X, Sun QM, An Z, Gou X, Feng Q. Plant-derived bioactive compounds regulate the NLRP3 inflammasome to treat NAFLD. Front Pharmacol 2022;13.

75. Knorr J, Wree A, Tacke F, Feldstein AE. The NLRP3 inflammasome in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. Semin Liver Dis 2020;40(3):298–306.

76. Wree A, McGeough MD, Peña CA, Schlattjan M, Li H, Inzaugarat ME, et al. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. J Mol Med 2014;92(10):1069-1082.

77. Wree A, Eguchi A, Mcgeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. Hepatology 2014;59(3):898–910.

78. Mridha AR, Wree A, Robertson AAB, Yeh MM, Johnson CD, Van Rooyen DM, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. J Hepatol 2017;66(5):1037–46.

79. Yang G, Lee HE, Lee JY. A pharmacological inhibitor of NLRP3 inflammasome prevents non-alcoholic fatty liver disease in a mouse model induced by high fat diet. Sci Rep 2016;6:1–10.

80. Gopalakrishnan T, Ganapathy S, Veeran V, Namasivayam N. Preventive effect of d-carvone during DMBA induced mouse skin tumorigenesis by modulating xenobiotic metabolism and induction of apoptotic events. Biomed Pharmacother 2019;111:178–

87.

81. Abbas BW, Kathem SH. Carvone Attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis and diarrhea in mice. Iraqi J Pharm Sci 2021;30(2):58–63.

82. Bouyahya A, Mechchate H, Benali T, Ghchime R, Charfi S, Balahbib A. Health benefits and pharmacological properties of carvone. Biomolecules 2021;11(12):1–26.

83. Abbas MM, Kandil Yİ, Abbas MA. R-(-)-carvone attenuated doxorubicin induced cardiotoxicity in vivo and potentiated its anticancer toxicity in vitro. Balkan Med J 2020;37(2):98–103.

84. Alsanea S, Liu D. BITC and S-carvone restrain high-fat diet-induced obesity and ameliorate hepatic steatosis and insulin resistance. Pharm Res 2017;34(11):2241–9.

85. Lv L, Yang N, Cao Y, Dang J, Cheng L, El-Sheikh MA, et al. D-carvone inhibits the JAK/STAT3 signaling pathway and induced the apoptotic cell death in the human gastric cancer AGS cells. J Biochem Mol Toxicol 2021;35(5):1–7.

86. Mahboubi M. Caraway as important medicinal plants in management of diseases. Nat Products Bioprospect 2019;9(1):1–11.

87. Günther J, Schneider I, Krämer A. Carvone prevents and alleviates hepatic steatosis in rat model with nonalcoholic fatty liver disease. GMJ Med 2019;3(1):118–24.

88. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65 (1-2)(80):55–63.

89. Ahmadian S, Barar J, Saei AA, Fakhree MAA, Omidi Y. Cellular toxicity of nanogenomedicine in MCF-7 cell line: MTT assay. J Vis Exp 2009;(26):1191.

90. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193(1):265–75.

91. Herms A, Bosch M, Ariotti N, Reddy BJN, Fajardo A, Fernández-Vidal A, et al. Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity. Curr Biol 2013;23(15):1489–96.

92. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227 (5259):680-5.

93. Sennepin AD, Charpentier S, Normand T, Sarré C, Legrand A, Mollet LM. Multiple reprobing of western blots after inactivation of peroxidase activity by its substrate, hydrogen peroxide. Anal Biochem 2009;393(1):129–31.

94. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 2012;9(7):671–5.

95. Levine RL, Williams JA, Stadtman EP, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods Enzymol 1994;233:346–57.

96. Zhu X, Bian H, Wang L, Sun X, Xu X, Yan H, et al. Berberine attenuates nonalcoholic

hepatic steatosis through the AMPK-SREBP-1c-SCD1 pathway. Free Radic Biol Med 2019;141:192–204.

97. Salvoza N, Giraudi PJ, Tiribelli C, Rosso N. Natural compounds for counteracting nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Advantages and limitations of the suggested candidates. Int J Mol Sci 2022;23(5):2764.

98. Zhang J, Zhang H, Deng X, Zhang Y, Xu K. Baicalin protects AML-12 cells from lipotoxicity via the suppression of ER stress and TXNIP/NLRP3 inflammasome activation. Chem Biol Interact 2017;278:189–96.

99. Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. Hepatology 2011;54(1):133–44.

100. Moro IJ, Gondo GDGA, Pierri EG, Pietro RCLR, Soares CP, de Sousa DP, et al. Evaluation of antimicrobial, cytotoxic and chemopreventive activities of carvone and its derivatives. Brazilian J Pharm Sci 2017;53(4):e00076.

101. Stammati A, Bonsi P, Zucco F, Moezelaar R, Alakomi HL, Von Wright A. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. Food Chem Toxicol 1999;37(8):813–23.

102. Sharma L, Lone NA, Knott RM, Hassan A, Abdullah T. Trigonelline prevents high cholesterol and high fat diet induced hepatic lipid accumulation and lipo-toxicity in C57BL/6J mice, via restoration of hepatic autophagy. Food Chem Toxicol 2018;121:283–96.

103. Ji JF, Jiao WZ, Cheng Y, Yan H, Su F, Chi LL. ShenFu preparation protects AML12 cells against palmitic acid-induced injury through inhibition of both JNK/Nox4 and JNK/NFκB pathways. Cell Physiol Biochem 2018;45(4):1617–30.

104. Kuo NC, Huang SY, Yang CY, Shen HH, Lee YM. Involvement of HO-1 and autophagy in the protective effect of magnolol in hepatic steatosis-induced NLRP3 inflammasome activation in vivo and in vitro. Antioxidants 2020;9(10):924.

105. Ogino N, Miyagawa K, Nagaoka K, Matsuura-Harada Y, Ogino S, Kusanaga M, et al. Role of HO-1 against saturated fatty acid-induced oxidative stress in hepatocytes. Nutrients 2021;13(3):993.

106. Griffiths A, Wang J, Song Q, Iyamu ID, Liu L, Park J, et al. Nicotinamide N-methyltransferase upregulation via the mTORC1-ATF4 pathway activation contributes to palmitate-induced lipotoxicity in hepatocytes. Am J Physiol Cell Physiol 2021;321(3):585–95.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa no

Şekil 1. D-Carvone molekülünün yapısı 10
Şekil 2. D-Carvone'un AML12 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi 19
Şekil 3. Palmitatın AML12 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi 20
Şekil 4. D-Carvone'un palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi ….. 21
Şekil 5. D-Carvone'un palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde trigliserid düzeylerine etkisi 22
Şekil 6. D-Carvone'un palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde Nile red ile boyanma üzerine etkisi 23
Şekil 7. D-Carvone'un palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde protein karbonil düzeyleri üzerine etkisi 24
Şekil 8. D-Carvone'un palmitat uygulanan AML12 hücrelerinde hem oksijenaz 1 protein düzeyleri üzerine etkisi 25
Şekil 9. D-Carvone'un palmitat ile hepatotoksisite oluşturulan AML12 hücrelerinde aktive edici transkripsiyon faktörü 4 düzeyleri üzerine etkisi 26
Şekil 10. D-Carvone'un palmitat ile hepatotoksisite oluşturulan AML12 hücrelerinde NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3 düzeyleri üzerine etkisi 27

ÖZGEÇMİŞ