

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI



***İN VİTRO* LİPOPOLİSAKKARİT UYARIMLI KARACİĞER YANGI
MODELİNDE ALFA-TERPİNEOL'ÜN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ayşe Pınar TUNÇER

Danışman
Doç. Dr. ALTUĞ KÜÇÜKGÜL

HATAY/2020

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

***İN VİTRO* LİPOPOLİSAKKARİT UYARIMLI KARACİĞER YANGI
MODELİNDE ALFA-TERPİNEOL'ÜN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ayşe Pınar TUNÇER

Danışman
Doç. Dr. ALTUĞ KÜÇÜKGÜL

HATAY/2020

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA(VET) ANABİLİM DALI

***İN VİTRO* LİPOPOLİSAKKARİT UYARIMLI KARACİĞER YANGI
MODELİNDE ALFA-TERPİNEOL'ÜN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
AYŞE PINAR TUNÇER

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 12/08/2020 günü sözlü olarak tez savunma sınavında oy birliğiyle kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:

Doç. Dr. Altuğ KÜÇÜKGÜL.....

Dr. Öğr. Üy. Filiz KAZAK.....

Dr. Öğr. Üy. Sinan VICİL.....

Bu tez enstitümüz Biyokimya (VET) Anabilim dalında hazırlanmıştır.

.....
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezım süresince bilgilerini ve deneyimini benden esirgemeyen I. Danışmanım Doç. Dr. Altuğ KÜÇÜKGÜL'e , II. Danışmanım Prof. Dr. Mine ERİŞİR'e ve tezime yapmış olduğu değerli katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üye. Mehmet Mustafa İŞGÖR'e, ayrıca gösterdikleri maddi ve manevi tüm desteklerden dolayı aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
GRAFİKLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ.....	IX
KISALTMALAR DİZİNİ	X
ÖZET.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAFLD).....	3
2.2. Yangı.....	4
2.3. Apoptoz.....	6
2.4. Terpeneol.....	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
3.1. Hücre Kültürü.....	10
3.2. Uygulamada Kullanılan Etkin Maddeler.....	11
3.3. MTT Viabilite Testi	11
3.4. RNA İzolasyonu ve qRT-PCR.....	11
3.5. İstatistiksel Metot.....	12
4.BULGULAR.....	13
4.1. Hücre Canlılığı Test Sonuçları.....	13
4.1.1. Farklı Konsantrasyonlarda α -Terpeneol'ün Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Sonuçları.....	13
4.1.2. Farklı Konsantrasyonlarda LPS 'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Sonuçları.....	14
4.1.3 .Etkin Konsantrasyonlarda α -Terpeneol ve LPS 'in Hücre Viyabilitesine Etkilerinin Sonuçları.....	15
4.2. Gen Ekspresyon Analiz Sonuçları.....	16
4.2.1. Kaspaz 3 Gen Ekspresyon Sonuçları.....	16
4.2.2. Bax Gen Ekspresyonu Sonuçları.....	17
4.2.3. Bcl-2 Gen Ekspresyon Sonuçları.....	18

4.2.4. IL-1 β Gen Ekspresyonu Sonuçları.....	19
4.2.5. IL-10 Gen Ekspresyon Sonuçları.....	20
4.2.6. TNF- α Gen Ekspresyonu Sonuçları.....	21
4.3. Hücre Görüntüleri.....	22
4.3.1.Kontrol Grubu Hücre Görüntüleri.....	22
4.3.2. LPS Grubu Hücre Görüntüleri.....	23
4.3.3. α -Terpineol Grubu Hücre Görüntüleri.....	24
4.3.4.LPS + α -Terpineol Grubu Hücre Görüntüleri.....	25
5. TARTIŞMA.....	26
6. SONUÇ.....	30
7. KAYNAKLAR.....	31
8. ÖZGEÇMİŞ.....	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. NAFDL oluşum sürecinde inflamasyon gibi uyarıcı faktörler.....	4
Şekil 2. LPS-TLR4-CD14 sinyal iletim yolağı.....	5
Şekil 3. İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz sinyal yolağı ve üyeleri.....	7
Şekil 4. Terpineol türevleri ve kimyasal yapıları.....	8



GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa No

Grafik 1. Değişik konsantrasyonlardaki α -terpineol 'ün hücre viyabilitesine etkisi.....	13
Grafik 2. Değişik yoğunluklardaki LPS'in hücre canlılığı üzerine etkileri.....	14
Grafik 3. Etkin konsantrasyonlardaki LPS ve α -terpineolün hücre canlılığı üzerine etkileri.....	15
Grafik 4. Deneme gruplarındaki kaspaz 3 gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).....	16
Grafik 5. Deneme gruplarındaki Bax gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).....	17
Grafik 6. Deneme gruplarındaki BCl-2 ekspresyonu düzeyleri (24 saat)	18
Grafik 7. Deneme gruplarındaki IL-I β gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).....	19
Grafik 8. Deneme gruplarındaki IL-I0 gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).....	20
Grafik 9. Deneme gruplarındaki TNF- α gen ekspresyonu düzeylerim(24 saat).....	21

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1. Hücre kültürü çalışma grupları.....	10
Çizelge 2. Araştırmada kullanılan spesifik gen dizgeleri.....	12



FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Sayfa No

Fotoğraf 1. Kontrol grubu fotoğrafı.....	22
Fotoğraf 2. LPS grubu fotoğrafı.....	23
Fotoğraf 3. α -terpineol grubu fotoğrafı.....	24
Fotoğraf 4. LPS + α -terpineol grubu fotoğrafı.....	25



KISALTMALAR DİZİNİ

qRT-PCR: Gerçek zamanlı kuantatif polimeraz zincir reaksiyonu

TLR4: Toll benzeri reseptör

PPR: Patern tanımlayıcı reseptör

NAFLD: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı

NF-kB: Nükleer faktör kappa B

LPS: Lipopolisakkaritler

TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa

MTT: Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

IL-6: interlökin 6

IL-12: interlökin 12

IL-1 β : interlökin 1 beta

NASH: Non-alkolik steatohepatitis

ER: Endoplazmik retikulum

TLR: Toll benzeri reseptörler

NLR: Nod benzeri reseptörleri

FBS: Fötal sığır serumu

DMEM: Dulbecco's modified eagle's

mRNA: Mesajcı Ribonükleik asit

cDNA: Tamamlayıcı DNA

VLDL: Lipoprotein

ÖZET

***In Vitro* Lipopolisakkarit Uyarımlı Karaciğer Yangı Modelinde Alfa-terpineol'ün Etkinliğinin Araştırılması**

Terpinollerin birçok çalışmada antioksidan özelliklerinden dolayı antikanser, antikonvülsant ve antiülser gibi biyolojik etkileri ortaya konulmuştur. Araştırmanın amacını *E. coli*'den izole edilen LPS (lipopolisakkarit)'in karaciğer hücrelerine etkin konsantrasyonda uygulanarak oluşturulan yangı modelinde α -terpineol'ün anti-inflamatuar ve anti-apoptotik gibi biyofonksiyonları araştırılması oluşturdur.

Bu amaçla deneme materyali olarak sürekli hücre hatlarından insan orijinli HepG2 hücreleri materyal olarak seçildi. Etkin madde olarak seçilen LPS ve α -terpineol, ticari olarak temin edildi ve hücrelere farklı konsantrasyonlarda 24 saat uygulandı. Her iki etken maddenin etkin konsantrasyonları, hücre canlılık testleriyle gerçekleştirildi. Süre sonunda alınan mRNA örneklerinden ise, TNF- α , IL-1 β ve IL-10, Kaspaz 3, Bax ve Bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı kuantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) araştırıldı.

Araştırmada elde edilen sonuçlara göre LPS'in farklı konsantrasyonları hücrelere uygulanarak kontrol grubuna göre %11.5 oranında hücre kayıplarına neden olan 50 ng/ml konsantrasyonu modelleme için seçildi. Ancak α -terpineolün LPS ile birlikte kullanıldığında 10 μ M konsantrasyonunda hücre kayıplarını % 2.12 oranında önlediği bulundu. Çalışmada gen analizleri değerlendirildiğinde LPS'in TNF- α ve IL-1 β gen ekspresyonlarını arttırdığı, α -terpineol uygulamasının ise bu durumu tersine çevirdiği tespit edildi. Yine IL-10 gen ekspresyonu LPS tarafından baskılanırken, α -terpineol tarafından anlamlı düzeyde uyarıldığı da ortaya konuldu. Bununla birlikte çalışmada LPS'in kaspaz 3 ve Bax gen ekspresyonlarını arttırdığı, ancak α -terpineol'ün bu stimülasyonu baskıladığı tespit edildi. Ayrıca buna ilaveten anti-apoptotik Bcl-2 gen ekspresyonları LPS tarafından baskılanırken, α -terpineol tarafından uyarıldığı bulundu.

Araştırmadan elde edilen verilerle, monoterpen α -terpineol'ün kısa süreli ve düşük olan proliferatif konsantrasyonunun özellikle patojen kaynaklı karaciğer rahatsızlıklarında alternatif bir tedavi ajanı olabileceği görüldü. Bununla birlikte konunun tam aydınlatılabilmesi için *in vivo* ve daha ileri düzey araştırmalara ihtiyaç duyulduğu kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Lipopolisakkarit, inflamasyon, α -terpineol, apoptoz.



ABSTRACT

Investigation of the Effectiveness of Alpha-terpineol in the *In Vitro* lipopolysaccharide Stimulated Liver Inflammation Model

Due to the antioxidant properties of terpineols, biological effects such as anticancer, anticonvulsant and antiulcer have been revealed in many studies. The aim of the research was to investigate the biofunctions of α -terpineol such as anti-inflammatory and antiapoptotic in the inflammatory model created by applying LPS isolated from Ecoli to liver cells at an effective concentration.

For this purpose, HepG2 cells of human origin from continuous cell lines were selected as the test material. LPS and α -terpineol, selected as the active ingredient, were commercially available and applied to the cells at different concentrations for 24 hours. Effective concentrations of both active ingredients were carried out by cell viability tests. TNF- α , IL-1 β and IL-10, caspase 3, Bax and Bcl-2 gene expression levels were investigated by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR).

According to the results obtained in the study, different concentrations of LPS were applied to the cells and 50 ng / ml concentration that caused 11.5 % cell loss compared to the control group was selected for modeling. However, when used together with LPS, α -terpineol was found to prevent cell loss at a concentration of 10 μ M at a rate of 2.12%. When gene analysis was evaluated in the study, it was found that LPS increased gene expressions of TNF α and IL-1 β , and α -terpineol application reversed this situation. The other IL-10 gene expression was also suppressed by LPS and it was significantly stimulated by α -terpineol. Besides, in the study, it was found that LPS increased caspase 3 and Bax gene expressions, while α -terpineol significantly suppressed this stimulation. In addition, Bcl-2 gene expressions were found to be suppressed by LPS and α -terpineol application stimulated this gene expression.

With the data obtained from the study, it was seen that the short-term and low proliferative concentration of monoterpene α -terpineol may be an alternative treatment agent especially in pathogen-induced liver disorders. However, it was concluded that in vivo and more advanced studies are needed to fully illuminate the subject.

Keywords: Lipopolysaccharide, inflammation, α -terpineol, apoptosis.

1. GİRİŞ

Günümüzde özellikle bakteriyel enfeksiyonlara bağlı karaciğer yangısı gerek primer gereksede sekonder olarak diğer enfektif hastalıkların komplikasyonu olarak gelişebilmektedir. Obezite ve insülin direnci, Tip 2 diyabet, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli kanser türleri komorbiditelere başlıca yatkınlık faktörleridir. Ayrıca diyetle indüklenen obezitenin bağırsak mikrobiyotasına bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla insülin direncini arttırdığı da bilinmektedir. Bağırsak florası bakterilerinden gelen LPS, TLR4 (Toll benzeri reseptör) aktivasyonu ile insülin direncine yol açan kronik subklinik inflamatuvar süreci başlatmakta ve obeziteye sebep olmaktadır.

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı en yaygın görülen karaciğer hastalığıdır ve dünya nüfusunun yaklaşık % 25'inde görülmektedir. Hastalığın gelişiminde obezite ve hareketsiz bir yaşam tarzı, besin alımının bileşimi (örn. Mısır şurubundaki fruktoz), diyabet, insülin direnci, disbiyoz ve genetik yatkınlıklar gibi çeşitli faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir. Hastaların çoğunda, izole hepatik steatoz patojenik bir durum değildir ve basit steatoz olarak adlandırılır. Fakat izole hepatik steatozu olan hastalar neoplastik ve kardiyovasküler hastalıklar için risk grubundadırlar. Buna karşılık, hastaların bir kısmında hepatosellüler hasar, hepatik inflamasyon ve karaciğer fibrozu gelişimi gibi patolojik bulgularla karakterize alkolsüz steatohepatit (NASH) oluşumu gözlemlenebilir.

Terpineoller, doğal olarak bulunabilen doymamış monosiklik mono-terpenoid alkollerdir. Bu bileşikler nergis ve frezya gibi çiçeklerde, mercanköşk, kekik, biberiye ve limon gibi bitkilerde yaygın olarak bulunurlar. Terpeneoller, özellikle α -Terpineol ve Terpinen-4-ol olarak en sık kullanılan bileşikler olup, insanlar, hayvanlar ve ayrıca bitkiler üzerinde çok çeşitli farklı biyolojik etkiler göstermektedirler. Sadece parfüm, kozmetik ve ev temizlik ürünlerinde değil aynı zamanda yiyecek ve içeceklerin tatlandırılmasında da kullanılan popüler koku bileşenleridir. Aynı zamanda çeşitli önemli biyolojik ve tıbbi özelliklere de sahiptirler (Sales ve ark., 2020). Son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında, bu bileşiğin anti-hipertansif, anti-proliferatif, anti-enflamatuvar, anti-oksidan, anti-ülser, ve anti-karsinojenik gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu görülmüştür.

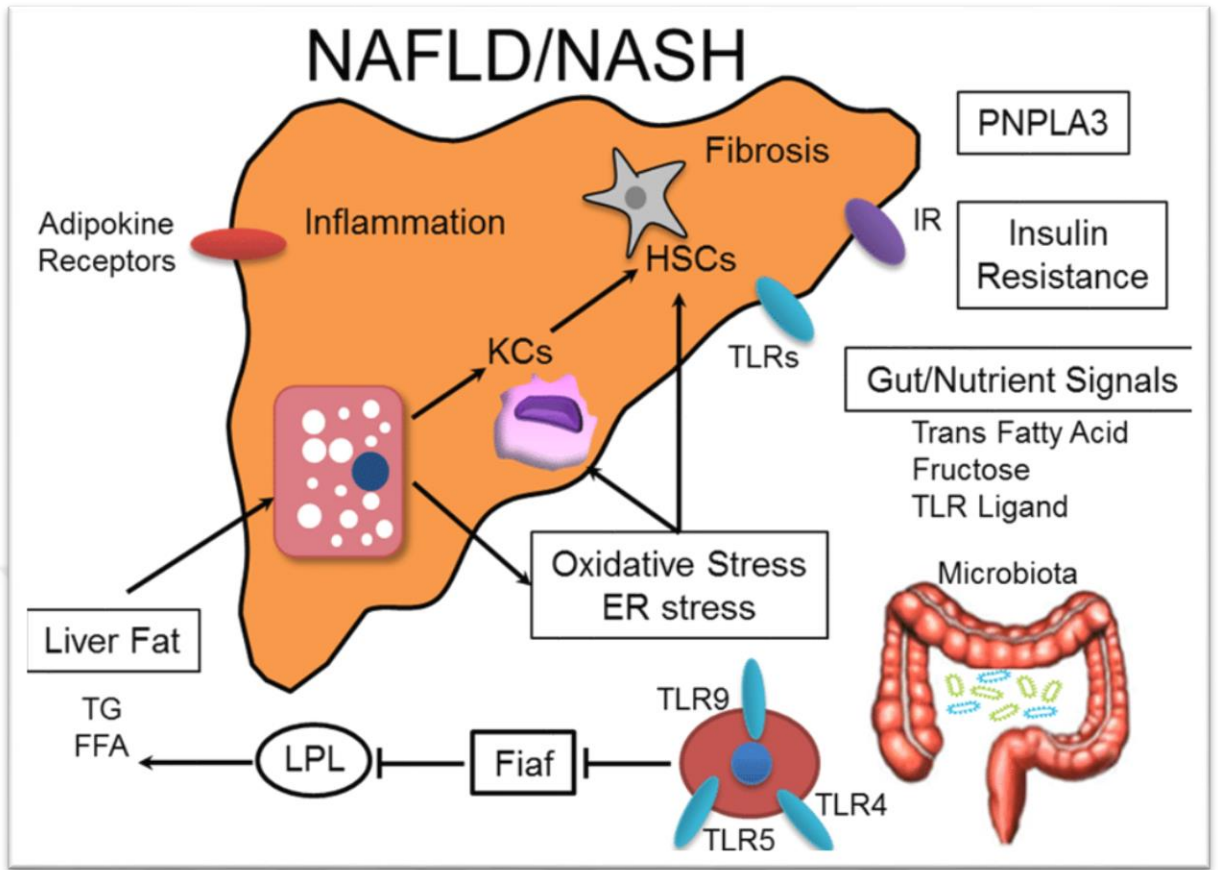
Verilen bu bilgilerin ışığında, araştırmada Ecoli'den izole edilen LPS'in karaciğer hücrelerine etkin konsantrasyonda uygulanarak oluşturulan yangı modelinde alfa terpineolün antiinflamatuvar ve antiapoptotik gibi biyofonksiyonları amaçlandı. Araştırmadan elde edilen verilerle, monoterpen α -terpineol'ün hepatoprotektif etkileri *in vitro* ortamda ortaya konuldu. Yine bu veriler konunun tam aydınlatılabilmesi için *in vivo* çalışmalarına ön veri özelliği taşıdığı kanaatine varıldı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD)

Obezite ve insülin direnci, Tip 2 diyabet, NAFLD, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli kanser türleri komorbiditelere başlıca yatkınlık faktörleridir. Son 10 yılda yapılan birçok çalışmada, bağırsak mikrobiyotası ile obezite / insülin direnci arasında nedensel bir bağlantı kurulmuştur. Ayrıca diyetle indüklenen obezitenin bağırsak mikrobiyotasına bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla insülin direncini arttırdığı da bilinmektedir. Bağırsak florası bakterilerinden gelen LPS, TLR4 aktivasyonu ile insülin direncine yol açan kronik subklinik inflamatuvar süreci başlatmakta ve obeziteye sebep olmaktadır (Saad ve ark., 2016). Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı en yaygın görülen karaciğer hastalığıdır ve dünya nüfusunun yaklaşık % 25'inde görülmektedir (Younossi ve ark., 2016). Hastalığın gelişiminde obezite ve hareketsiz bir yaşam tarzı, besin alımının bileşimi (örn. Mısır şurubundaki fruktoz), diyabet, insülin direnci, disbiyoz ve genetik yatkınlıklar gibi çeşitli faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir (Machado ve ark., 2016). Safra asidi havuzundaki değişimlerin de NAFLD patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir (Arab ve ark. 2017). Hastaların çoğunda, izole hepatik steatoz patojenik bir durum değildir ve basit steatoz olarak adlandırılır (Ahmed ve ark., 2015). Fakat izole hepatik steatozu olan hastalar neoplastik ve kardiyovasküler hastalıklar için risk grubundadırlar (Bonci ve ark. 2015). Buna karşılık, hastaların bir kısmında hepatosellüler hasar, hepatik inflamasyon ve karaciğer fibrozu gelişimi gibi patolojik bulgularla karakterize NASH oluşumu gözlemlenebilir (Machado ve ark., 2016; Younossi ve ark., 2016). Hepatositlerde lipit ara maddelerinin birikimi, hepatosellüler lipotoksisiteye neden olarak hücrel stres, işlev bozukluğu ve sonuç olarak hücre ölümüne sebep olur (Hirsova ve ark. 2015). Lipotoksisite kaynaklı hepatosit hücre ölümü esas olarak ölüm reseptörleri ve endoplazmik retikulum (ER) stresi tarafından aktive edilen apoptotik faktörler aracılığı ile şekillenir ve bu durumun başlıca yağ asidi taşıma proteinlerinin upregülasyonu nedeniyle artan yağ asidi alımından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Bechmann ve ark., 2010).



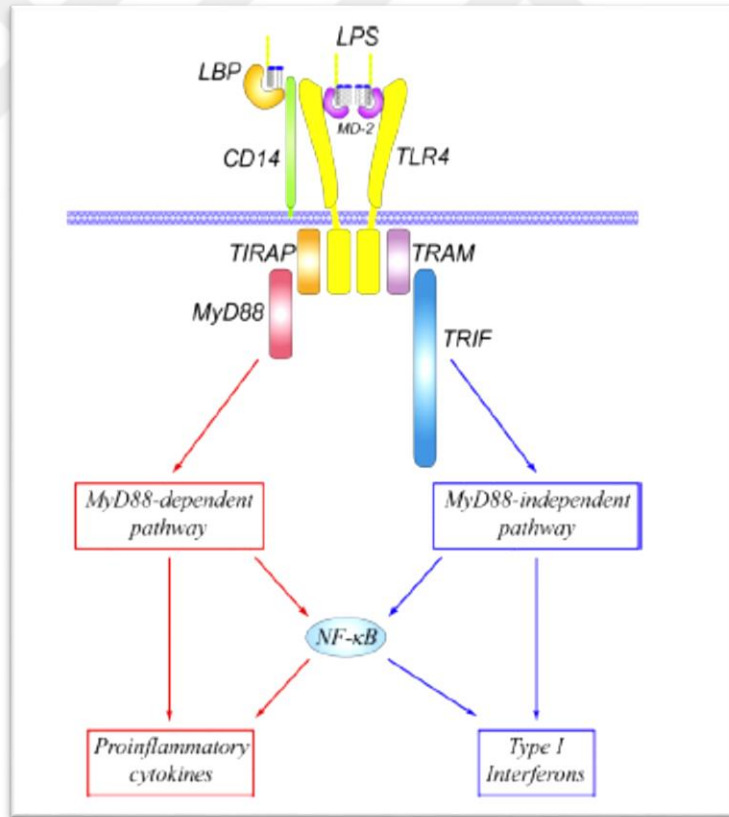
Şekil. 1. NAFLD oluşum sürecinde inflamasyon gibi uyarıcı faktörler (Ni ve ark., 2016).

2.2. Yangı

Yangı, sitokinler, kemokinler ve eikosanoidler gibi medyatörlerle hücrel savunma ve doku onarımının koordinasyonu amacıyla, doku hasarına veya enfeksiyona karşı verilen bir yanıttır. Akut veya kronik olarak klasifiye edilebilir. Akut inflamasyonda başlangıç yanıtı etkilenen dokuya kandan makrofaj ve nötrofillerin geçişiyle karakterizedir. Kronik yangıda ise süreç hasar görmüş dokuların yıkımı ve iyileşmesini içeren farklı bağışıklık sistemi hücreleri (T ve B lenfositleri) ile ilişkilendirilir (Ferrero-Miliani ve ark., 2007). Yangısal ajanların varlığında hücre membranı fosfolipaz A2'yi uyarımı ile araşidonic asit ve sitokinler, serotonin, histamin, prostaglandin ve damar geçirgenliğini arttıran lökotrienler gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınımını sağlar. Bunun sonucu olarak yangı bölgesine lökositlerin geçişine olanak verir (Dassoler ve ark., 2004; Falcao ve ark., 2005).

Lipopolisakkarit gram negatif bakterilerin hücre dışı membranında bulunan ve endotoksin olarak adlandırılan bir moleküldür (Wolff 1904). LPS, bağlayıcı proteinine bağlanarak myeloid faktörünü ve CD 14 uyarımlarını gerçekleştirerek, TLR4

yolağını aktiveştirir. Bu yolun uyarımı TNF- α (Tümör nekroz faktör alfa), IL-6 (interlökin 6), IL-12 (interlökin 12), ve IL-1 β (interlökin 1 beta), gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olarak etkilenen dokuda yangıyı uyarır (Yang ve ark. 2000). Oksidatif stresin kardiyovasküler hastalıklar yangı ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın gelişiminde ve ilerlemesinde önemli etkileri bulunmaktadır. Etkilenen dokularda reaktif oksijen türlerinin artışıyla karakterizedir (Touyz, 2000). LPS, inflamatuvar yanıtın başlatılmasından sorumlu TLR4'e yüksek afinitesi bulunmaktadır. Bu etkileşim sadece makrofajlarda değil, aynı zamanda vücudun neredeyse tüm hücrelerinde geçerlidir (Saad ve ark., 2016). TLR4 tarafından aktive edilen sinyal yolunda, serin kinazlar (JNK, IKK beta ve IKK epsilon) IRS-1'in serin fosforilasyonu yoluyla insülin direncinin indüklenmesinde önemli roller üstlenirler (Velloso ve ark., 1996; Folli ve ark., 1997). obezlerde ve subklinik inflamasyonu TLR4 sinyal yolu TNF- α , IL-6 ve NF- κ B (Nükleer faktör kappa B)'yi aktive eden MCP1 proteinini aktifleştirebilir (Hotamisligil ve ark., 1993).



Şekil .2. LPS-TLR4- CD14 sinyal iletim yolağı (Lu ve ark., 2008)

Karaciğer hücreleri besin maddeleri ve bağırsaktan türetilmiş bakteri ürünlerini PPR reseptörleri ile tanır. PPR (Patern tanımlayıcı reseptör) reseptörleri TLR ve NLR

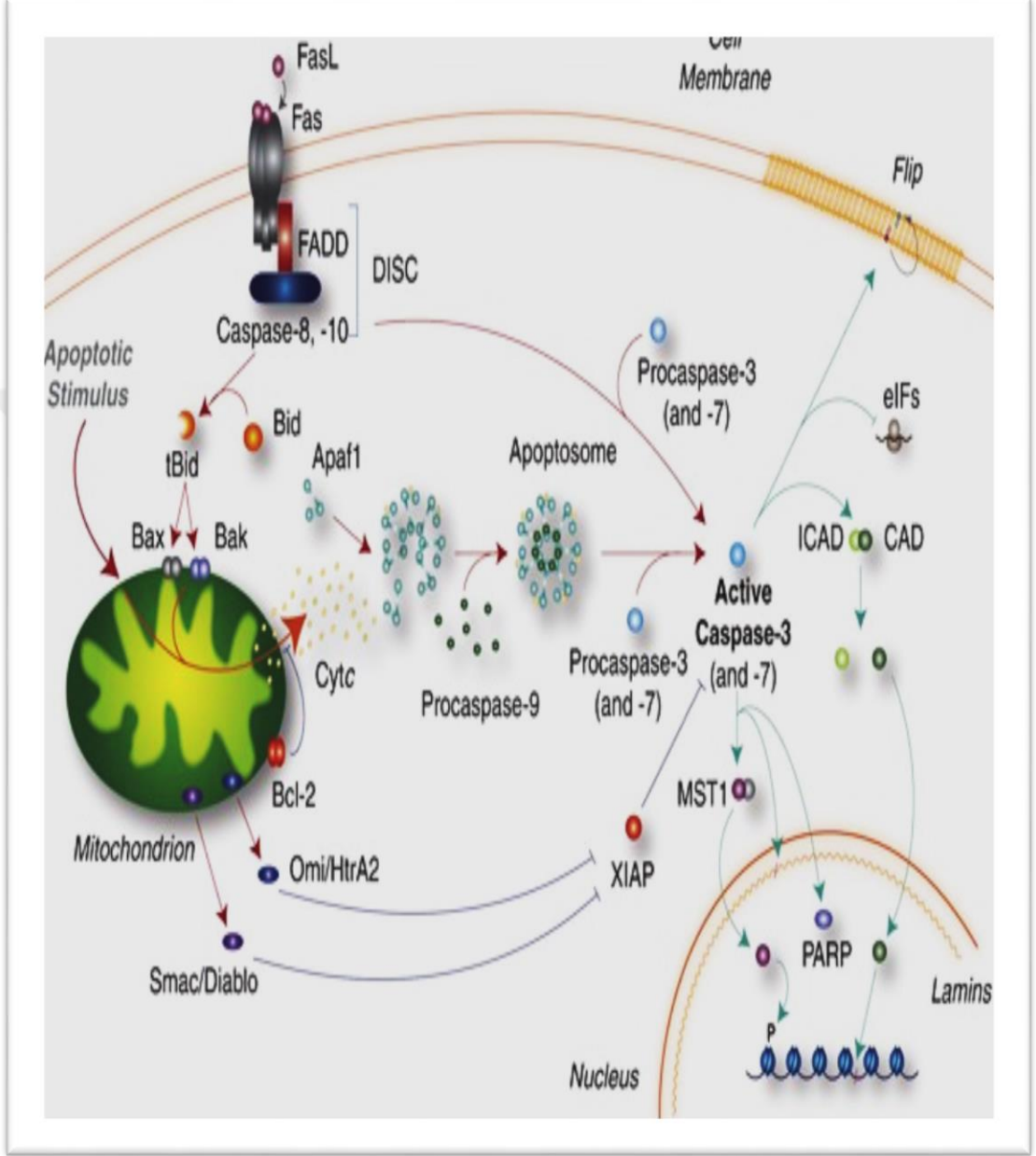
üyelerinden oluşur. PRR, TLR ve NOD benzeri reseptörler (NLR) olmak üzere en az iki adet algılayıcı protein üyesini içerir. Hem NLR'ler hem de TLR'ler patojene bağlı moleküler paternler (PAMP) ve hasarla ilişkili moleküler paternler (DAMP) gibi moleküller tarafından uyarılırlar. PAMP'ler bağırsaktan türetilen mikroorganizmalardan kaynaklanan patojenler tarafından salınır. DAMP'lar ise endojen molekülleri içerirken stresli veya yaralı hepatositlerden salınır. TLR, bağırsak mikrobiyotasından türetilen bakteriyel ürünleri lipopolisakkarit (endotoksin olarak da bilinir) ve peptidoglikanları tanır (Marra ve ark., 2013).

2.3. Apoptoz

Apoptoz kelimesi, ilk olarak 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından, hücre ölümünün morfolojik olarak farklı bir tipini tanımlamak için kullanılmıştır (Kerr ve ark., 1972). Apoptoz, büyümesi ve bölünmesi durdurulan bir hücrenin, içeriğindeki molekülleri onu çevreleyen ortama dökülmeden ölümüyle sonuçlanan bir sürece girdiği işlemdir. Apoptoz, zaman zaman programlanmış hücre ölümü (ya da daha çok 'hücrel intihar') olarak adlandırılır. Apoptozun başlaması, kaspaz olarak bilinen bir dizi sistein - aspartik proteazın aktivasyonuna bağlıdır (Arcy, 2019). Kaspazlar, başlatıcı kaspazlar ve uygulayıcı kaspazlar olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir (Elmore, 2007). Hücre hasarı tespit edildikten sonra, başlatıcı kaspazlar (kaspazlar 8 ve 9) aktif olmayan prokaspazlardan aktive edilir ve uygulayıcı kaspazları (kaspazlar 3, 6 ve 7) aktive etmek için bir kaskad sistemi oluşturur. Yıkıcı kaspazlarının ön aktivasyonu, endonükleazların aktivasyonundan DNA parçalanması, nükleer proteinlerin ve kas iskeletinin tahrip edilmesi, proteinlerin çapraz bağlanması, fagositik hücreler için ligandların ekspresyonu ve apoptotik antikorların oluşumu ile sonuçlanan bir dizi olayı başlatır (Martinvalet ve ark., 2005; Poon ve ark., 2014).

Apoptozisin düzenlenmesinde Bcl-2 gen ailesinin üyeleri önemli bir rol oynar. Bcl-2'nin kendisi apoptoz baskısı olarak işlev görürken, ailenin başka bir üyesi bax proteini hücre ölümünü destekleyici olarak işlev görür (Kroemer, 1997). Bir hücrenin içindeki Bax / Bcl-2 oranının, hücrenin apoptotik uyarılara nasıl tepki verdiğini göstermesi açısından kritik öneme sahip olduğu düşünülmektedir. T hücrelerinde Bax'ın teorik olarak ekspresyonu, DNA hasarı veya glukokortikoid gibi apoptotik uyarılara karşı daha duyarlı

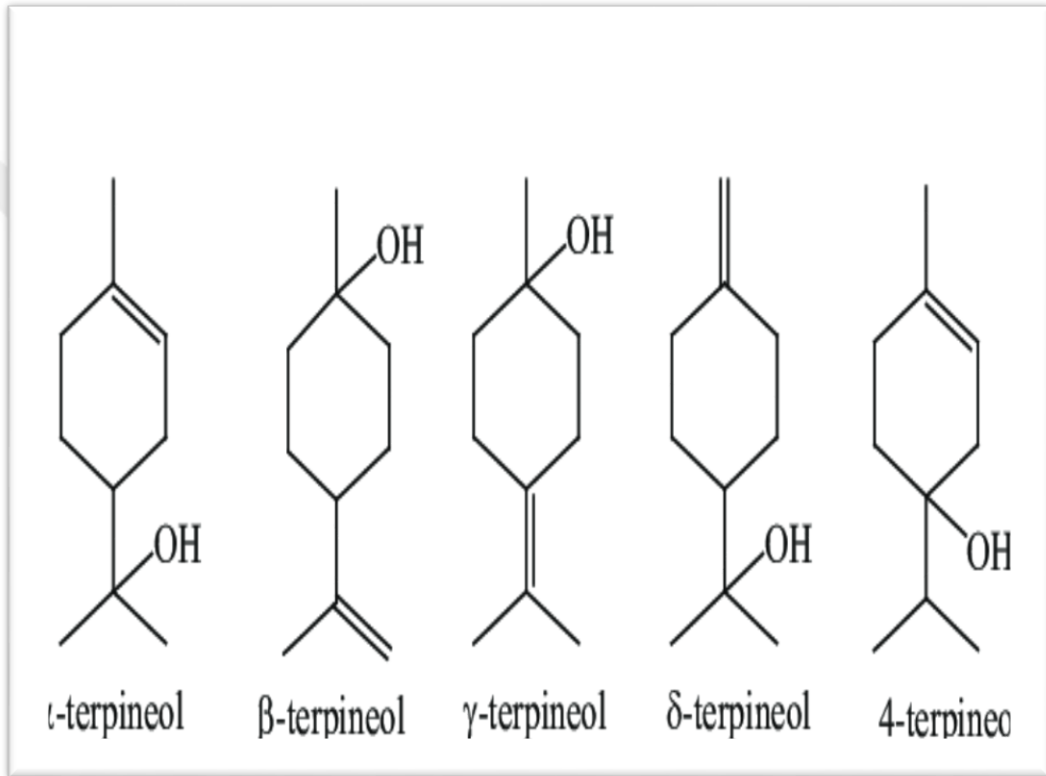
hale getirir ancak anti-Fas antikoruna karşı duyarlı değildir ve bu etkiler Bcl-2 tarafından bloke edilebilir (Brady ve ark., 1996) .



Şekil.3. İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz sinyal yolağı ve üyeleri (Amelio ve ark., 2010)

2.4. Terpeneol

Terpeneoller doğal olarak bulunabilen doymamış monosiklik mono-terpenoid alkollerdir. Bu bileşikler nergis ve frezya gibi çiçeklerde, mercanköşk, kekik, biberiye ve limon gibi bitkilerde yaygın olarak bulunurlar (Bauer ve ark., 2000, Sell ve ark., 2003). Terpeneoller geniş farmakolojik özelliklerinden dolayı oldukça popüler bileşiklerdir.



Şekil .4. Terpeneol türevleri ve kimyasal yapıları (Khaleel ve ark., 2018).

Alfa- (α -T), beta- (β -T), gama- (γ -T), delta- (δ -T) ve terpinen-4-ol (T-4-ol) olmak üzere toplam beş terpeneol izomeri vardır. α - ve β -Terpeneol, optik olarak aktif formlarda ve bir rasemik karışım olarak bulunmaktadır. Hem α -T hem de T-4-ol en önemli ticari ürünlerdir ve çok sayıda uçucu yağda bulunurlar. Öte yandan, β -, γ - ve δ -terpeneoller doğada çok sık görülmez (Bauer ve ark., 2001). Terpeneoller, özellikle α -Terpeneol ve Terpinen-4-ol olarak en sık kullanılan bileşikler olup, insanlar, hayvanlar ve ayrıca bitkiler üzerinde çok çeşitli farklı biyolojik etkiler göstermektedirler. Sadece parfüm, kozmetik ve ev temizlik ürünlerinde değil aynı zamanda yiyecek ve içeceklerin tatlandırılmasında da kullanılan popüler koku bileşenleridir. Aynı zamanda çeşitli önemli biyolojik ve tıbbi

özelliklere de sahiptirler(Sales ve ark., 2020). Son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında, bu bileşiğin anti-hipertansif (Sabino ve ark., 2013), anti-proliferatif (Lampronti ve ark., 2006), anti-enflamatuvar (Held ve ark., 2007), anti-oksidan (Brand ve ark., 2001), anti-ülser (Khaleel ve ark., 2018) ve anti-karsinogenik (Hassan ve ark., 2010) gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu görülmüştür.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Araştırmada materyal olarak sürekli hücre hattı HepG2 (ATCC® HB-8065™) hücreleri kullanıldı. Hücreler, polietilenimin kaplı 25 cm² lik hücre flasklarına eklendi. Hücreler daha sonra içeriğinde % 10 oranında ısı maruziyetli fetal sıgır serumu (FBS) ve penisilin/ streptomisin/amfoterisin B karışımı bulunan, düşük glikoz konsantrasyonlu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's) kültür vasatı uygulandı. Sonrasında HepG2 hücreleri, 37 °C, % 5 CO₂ ve % 95 hava ihtiva eden inkübatör koşullarında üretilerek pasajlandı. Hücreler, flask tabanına % 80-90 popülasyona kavuştuklarında tripsin (% 0,025 Tripsin/EDTA) ile flask tabanından uzaklaştırıldı. Sonrasında hücreler 200 g 5 dk süreyle santrifüj edilerek pelet haline getirildi. Daha sonrasında ise kuyucuklara konulacak hücre sayısı bir hemositome yardımıyla (tripan mavisi boyası hücre sayım metodu) gerçekleştirilerek çalışma grupları tasarlandı. Çalışma grupları her bir kuyucuğa ml'de 1x10⁶ hücre gelecek şekilde oluşturuldu. Hücre kültürü deneme grupları Çizelge 1.' de belirtilmiştir.

Çizelge.1. Hücre kültürü çalışma grupları

Deneme Grupları	Örnek sayısı	Tekrar Sayısı
Grup 1: Kontrol (K)	5	1
Grup 2: LPS uygulanan grup (L)	5	1
Grup 3: α -Terpineol uygulanan grup (T)	5	1
Grup 4: LPS ile birlikte α -Terpineol uygulanan grup (T+L)	5	1

3.2. Uygulamada kullanılan etken maddeler

Araştırmada *Escherichia coli* O111:B4 suşundan elde edilen lipopolisakkarit (LPS-Sigma, EU) ve α -terpineol (Sigma, EU) ticari olarak temin edildi ve hücre besiyerlerinde çözündürülerek çalışmada kullanıldı. Hücrelere farklı konsantrasyonlarda LPS (1, 10 ve 50 ng/ml) ve α -terpineol (10, 25 ve 50 μ M) 24 saat süreyle uygulanarak, bu maddelerin etkin konsantrasyonları MTT viyabilite testleriyle tespit edildi.

3.3. MTT Viabilite Testi

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) metodunun prensibini, yaşayan hücrelerdeki mitokondrial redüktazların tetrazolium halkasını parçalayabilmesi oluşturmaktadır. Bu parçalanma sonrası soluk sarı renkli boya koyu mavi formazan rengine dönüşmektedir. Bu metotta kısaca LPS ve α -terpineol'ün 1 gün süreyle maruziyeti sonrası, kuyucuklardaki besiyeri aspire edilerek, 20 μ L MTT ayracı (5 mg/ml PBS'te çözündürülerek elde edildi) bulunan 200 μ L taze besiyeri eklendi. HepG2 hücreleri bu ayıraçla 4 saat süreyle 37 $^{\circ}$ C'de inkübe edildi. MTT formazan ürünleri 100 μ L 0.04 M HCL/isopropanol ile 15 dakika çözündürüldü. Sonrasında temiz tüplere alınan hücre numuneleri 12000 rpm ve +4 $^{\circ}$ C'de santrifüj edilerek ve 570 nm ışık dalga boyunda mikropleyt (μ Quant ELİSA reader, SK) okuyucuda okutuldu ve kaydedildi. Yöntemle besiyerine eklenen LPS ve α -terpineol'ün hücre viyabilitelerine etkileri değerlendirildi.

3.4. RNA izolasyonu ve qRT-PCR

Mesajcı Ribonükleik asit (mRNA) eldesi için inkübasyon sonu alınan hücre örneklerine, 1ml RNA izolasyon reaktifi konuldu (Trizol, Sigma,,EU). Sonrasında üretici firmanın belirttiği metodoloji takip edilerek total RNA izole edildi. RNA miktarı ve saflığı (OD260/OD280 nm oranı) spektrofotometrede (UV mini 1240, Shimadzu, JP) belirlendi. PCR reaksiyonu için cDNA sentezi ve PCR basamaklarını birlikte gerçekleştirebilecek “tek basamak özellikli ve “syber green” problu ticari kit temin edildi. (Verso-one step Sybr green master mix, Thermo, EU). Kit protokolüne uygun olarak, test tüpleri içerisinde RNA ve enhancer, master mix ve reaksiyon buffer ile araştırılan genlere spesifik bir çift

primer (oligonükleotid) ilave edilerek thermal saykırda (Bio RAD CFX96) cDNA(tamamlayıcı DNA) dönüşümü ve PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

Bu yöntemle araştırmadaki deneme gruplarından izole edilen RNA örneklerinde yangı belirteçleri TNF- α , IL-1 β ve IL-10 sitokinleri ile apoptozun önemli parametrelerinden kaspaz 3, Bax ve Bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri, “ house keeping”gen β aktin düzeyleriyle optimize edilerek ortaya konuldu.

3.5. İstatistiksel Metot

Çalışma hücre canlılık verilerinin istatistiği, SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programının “One-way ANOVA” analiz yöntemiyle ortaya konuldu. İstatistiksel farklar ise “Duncan” testiyle tespit edildi. $p < 0.05$ ve bunun altındaki sonuçlar önemli olarak değerlendirildi. Araştırmada bulgular ortalama $\pm$ standart hata (S.E) şeklinde verildi.

Çizelge.2. Araştırmada kullanılan spesifik gen dizgeleri

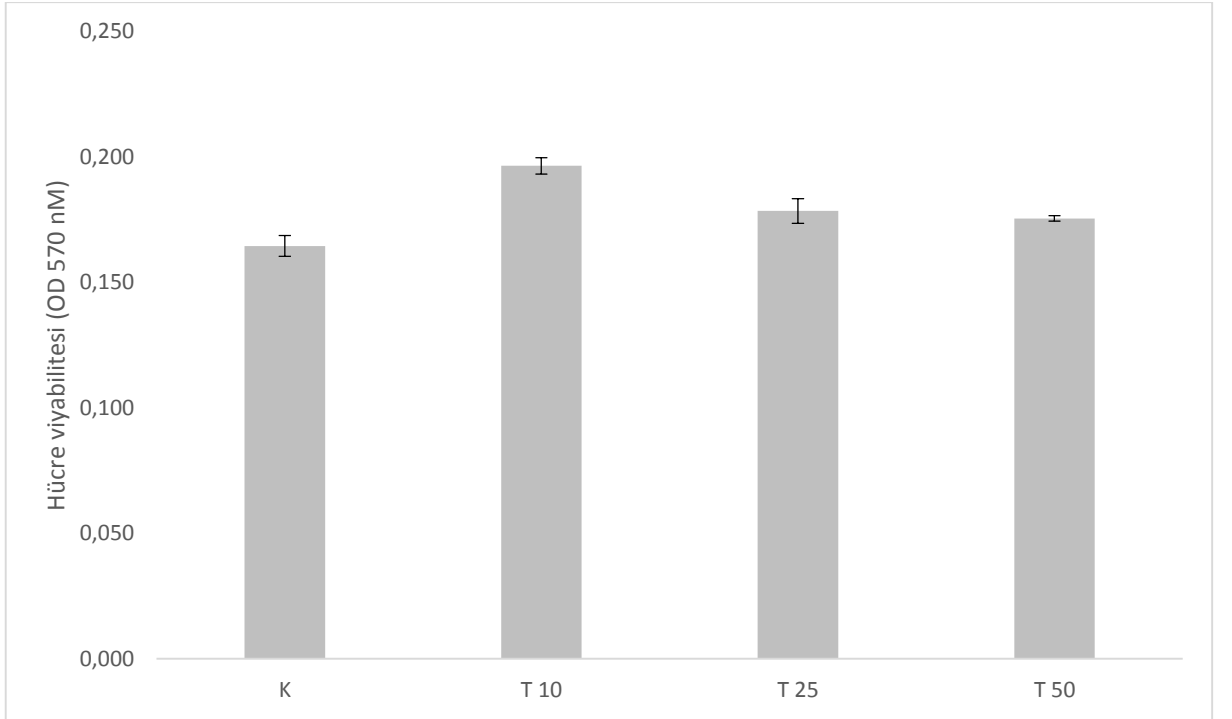
Gen	Forward	Reverse
β-actin	5'-CGT GGC CAT CTC TTG CTC GAA G-3'	5'-CAT CGT CAC CAA CTG GGA CGA C-3'
Kaspaz 3	5'-TTT GGGG AGT AGA TTG CAG GG-3'	5'-TGC ACA TCC ACG ATT TGA TT-3'
IL-1β	5'-GGT CAT TCT CCT GGA AGG AGG TCT GTG GGC -3'	5'-GCA AGG GCT TCA GGC AGG CCG CG-3'
TNF-α	5'-CAG AGG GAA GAG 5'-TTC CCC AG-3'	5'-CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG-3'
Bax	5'-GTT TCA TCC AGG ATC GAG CAG-3'	5'-CAT CTT CTT CCA GAT GGT GA-3'
Bcl-2	5'-CCT GTG GAT GAC TGA GTA CC-3'	5'-GAG ACA GCC AGG AGA AAT CA-3'
IL-10	5'-AAG TCT CAA GGG GCT GGG TCA GCT A-3'	5'-ATG CCC CAA GCT GAG ACC CAA GAC CCA-3'

4.BULGULAR

4.1.Hücre canlılığı test sonuçları:

HepG2 hepatomalara farklı konsantrasyonlarda LPS ve α -terpineol 24 saat süreyle uygulandı. İnkübasyon süresi sonrası kuyucuklardaki hücrelerin viyabilite kontrolleri MTT yöntemiyle gerçekleştirildi.

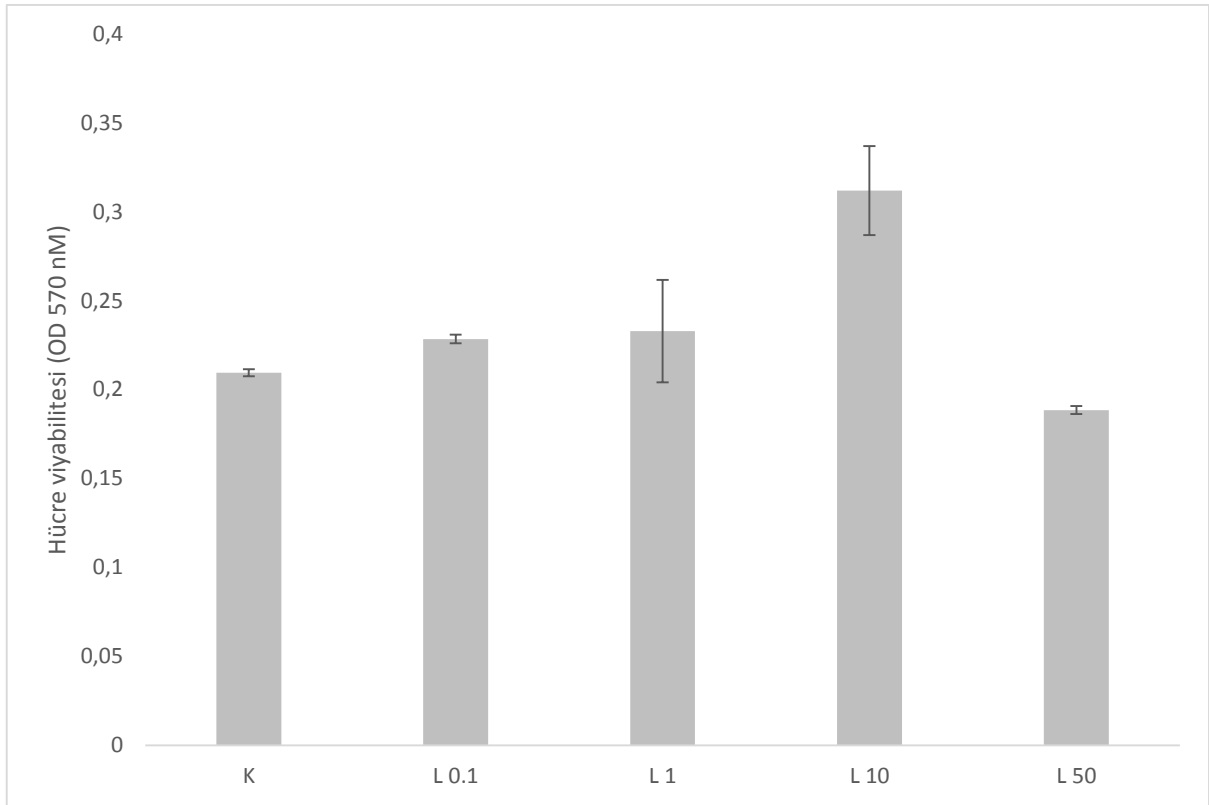
4.1.1. Farklı konsantrasyonlarda α -terpineol 'ün hücre canlılığı üzerine etkilerinin sonuçları.



Grafik.1. Değişik konsantrasyonlardaki α -terpineol'ün hücre viyabilitesine etkisi

Viyabilite kontrollerine göre viyabilite kontrol grubu ($0,164 \pm 0,009$) ile karşılaştırıldığında terpineol'ün 10, 25 ve 50 μ m konsantrasyonlarında, hücre sayısını % 20 ($0,196 \pm 0,007$), % 8 ($0,178 \pm 0,01$) ve % 6.6 ($0,175 \pm 0,02$) oranlarında arttırdığı tespit edildi ($p < 0.05$).

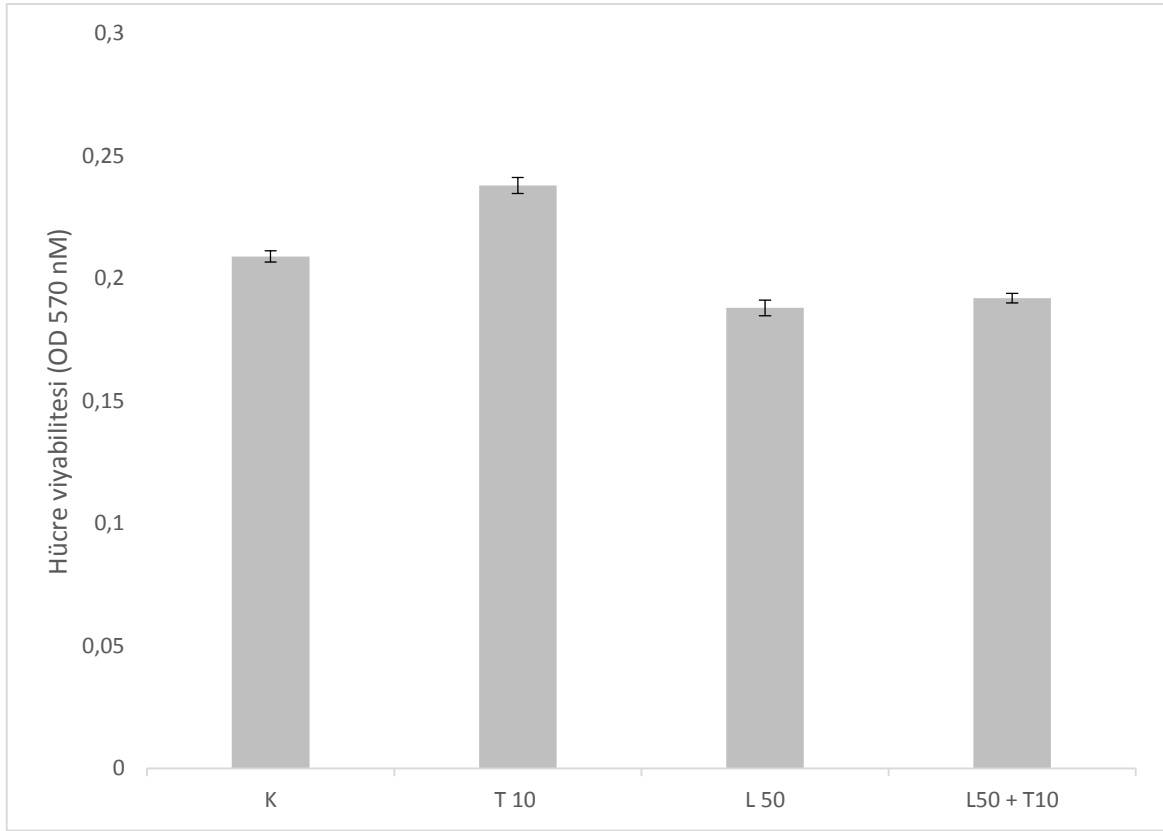
4.1.2. Farklı konsantrasyonlarda LPS ‘in hücre canlılığı üzerine etkilerinin sonuçları



Grafik.2. Değişik yoğunluklardaki LPS ‘in hücre canlılığı üzerine etkileri

Hücre canlılık testlerine göre karaciğer hücrelerine uygulanan LPS kontrol grubuna (0.209 ± 0.04) göre düşük konsantrasyonlarda (0.1, 1 ve 10 ng/ml) hücre sayısını sırasıyla % 9 (0.228 ± 0.05), % 11 (0.233 ± 0.64) ve % 49 (0.312 ± 0.64) oranlarında arttırdığı tespit edildi. Ancak LPS ‘in yüksek konsantrasyonunun (50 ng/ml) hücrelerde toksik etki yaparak % 11.5 (0.188 ± 0.04) oranında kayıplara neden olduğu ortaya konuldu ($p < 0.05$). Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak etkin konsantrasyonun 50 ng/ml olarak seçildi ve çalışmanın devamında bu konsantrasyon referans olarak kullanıldı.

4.1.3. Etkin konsantrasyonlarda α -terpineol ve LPS 'in hücre viyabilitesine etkilerinin sonuçları



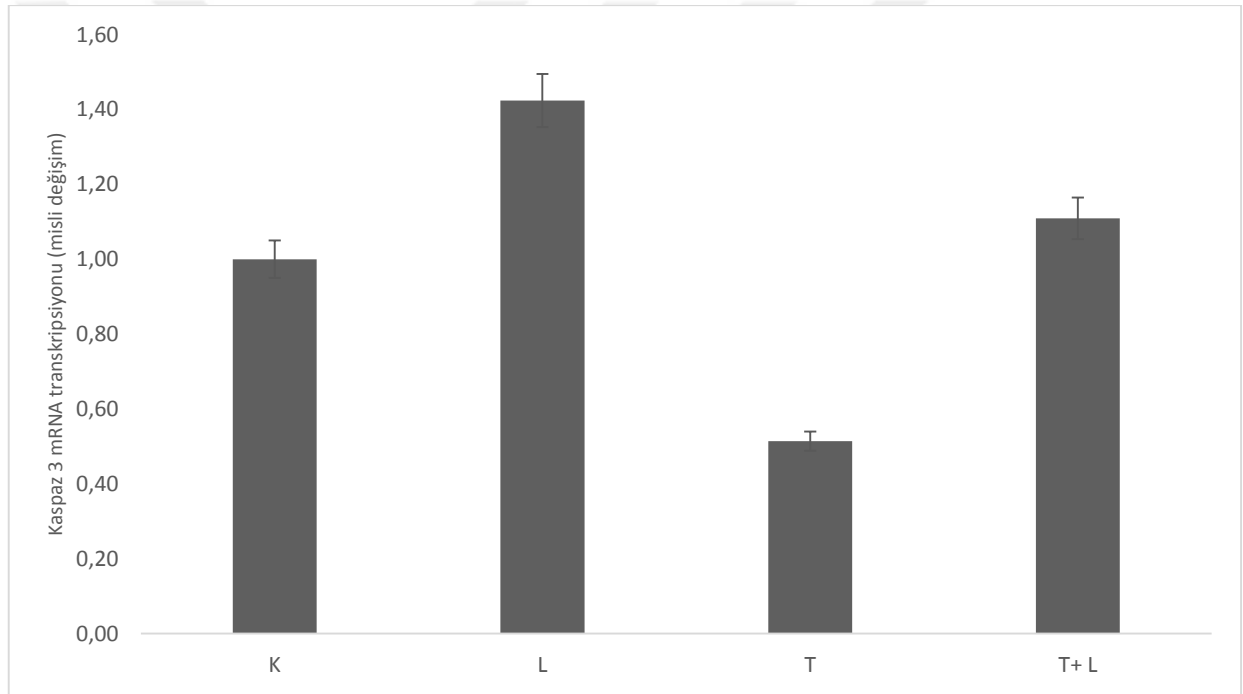
Grafik.3. Etkin konsantrasyonlardaki LPS ve α -terpineol'ün hücre canlılığı üzerine etkileri

Etkin konsantrasyonda LPS ve α -terpineol'ün hücreler üzerine etkilerine bakıldığında kontrol grubuna göre(0.209 ± 0.05) LPS 50 ng/ml konsantrasyonda uygulanan grupta(0.188 ± 0.07) hücre canlılığının %10 düzeyinde kayıplara neden olduğu tespit edildi($p < 0.05$). Bununla birlikte, LPS ile birlikte α -terpineol (10 μ m) uygulanan grup (0.192 ± 0.04) ile LPS grubu karşılaştırıldığında hücre kayıplarında % 2.12 düzeyinde geri çevirme olduğu ortaya konuldu($p < 0.05$).

4.2 Gen ekspresyon analiz sonuçları

Karaciğer hücrelerine etkin konsantrasyonlarda (LPS, 50 ng/ml ve α -terpineol, 10 μ m) etken maddeler 24 saat süreyle uygulandı. İnkübasyon süresi sonrası çalışma gruplarından m RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Daha sonrasında RNA örneklerinden hedef genler olan TNF- α , IL -1 β ve IL-10 ile Bax, Bcl-2 ve kaspaz 3 genlerinin ekspresyon düzeyleri spesifik primerler kullanılarak, qRT-PCR yöntemiyle araştırıldı. Araştırmada farklı tarihlerde alınan 3 örneğin gen sonuçlarının ortalaması alındı ve grup standart hataları yüzde olarak verildi.

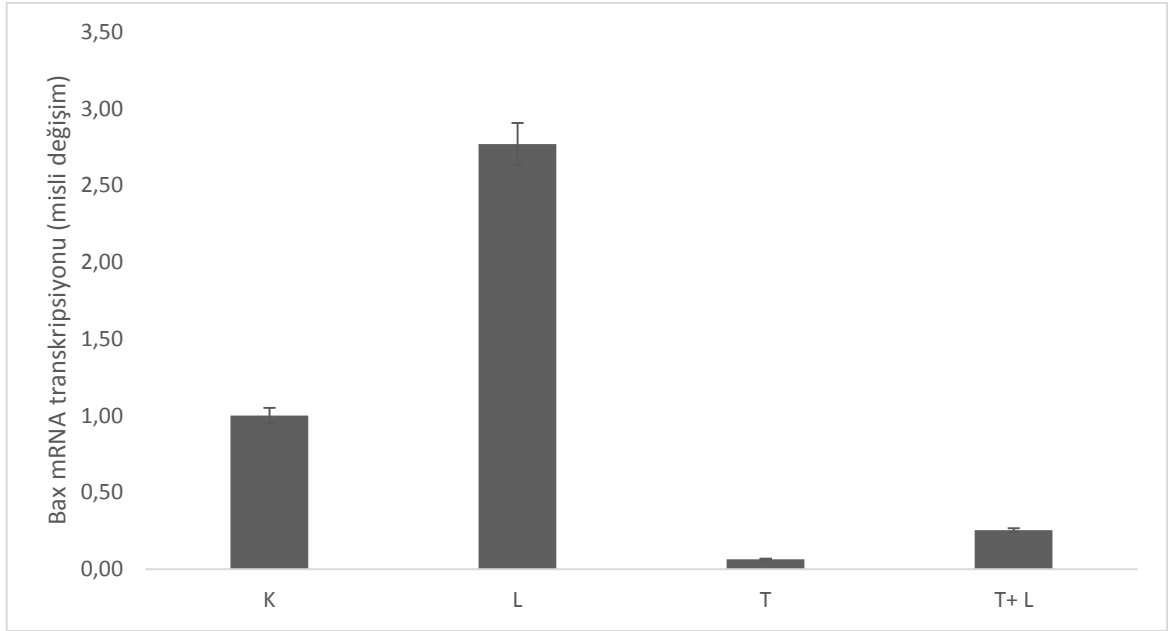
4.2.1. Kaspaz 3 gen ekspresyon sonuçları



Grafik.4. Deneme gruplarındaki Kaspaz 3 gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).

Araştırmada etkin konsantrasyonda terpineol'ün kontrol grubuna göre Kaspaz 3 ekspresyonunu yaklaşık 2 kat "down-regüle" ettiği tespit edildi. Çalışmada gen ekspresyon analizlerine göre etkin konsantrasyondaki LPS'in kaspaz 3 düzeyine kontrol grubuna göre 1,42 kat "up-regüle" bulundu. Bununla birlikte α -terpineolün LPS ile aynı zamanlı uygulanan grupta bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında, bu artışın 1,28 kat misli değişimlerle "down-regüle" edildiği ortaya konuldu.

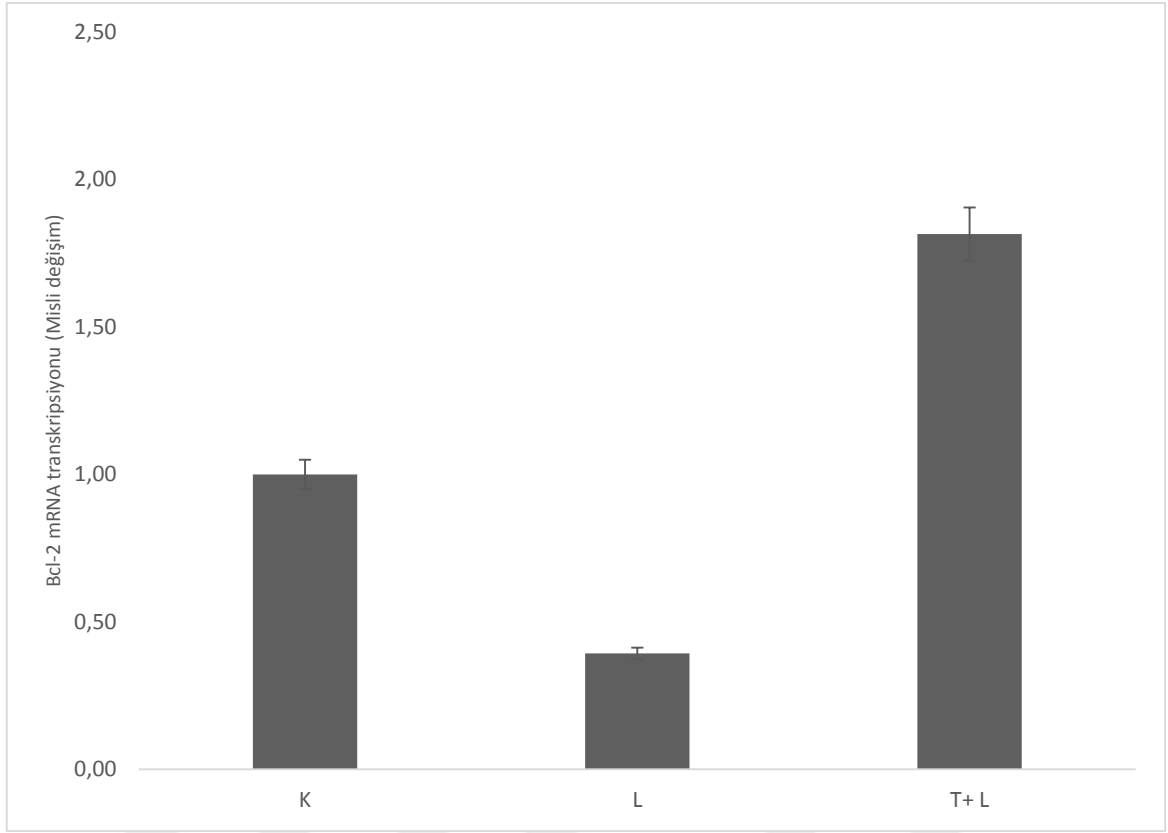
4.2.2. Bax gen ekspresyonu sonuçları.



Grafik.5. Deneme gruplarındaki Bax gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).

Araştırmada etkin konsantrasyonda α -terpineol'ün kontrol grubuna göre Bax ekspresyonu 14 kat "down-regüle" ettiği tespit edildi. Çalışmada gen ekspresyon analizlerine göre etkin konsantrasyondaki LPS 'in bax düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 2.78 kat "up-regüle " bulundu. Bununla birlikte α -terpineolün LPS ile aynı zamanlı uygulanan grupta bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında, bu baskılanmanın yaklaşık 11.4 kat misli değişimlerle "up-regüle" edildiği ortaya konuldu.

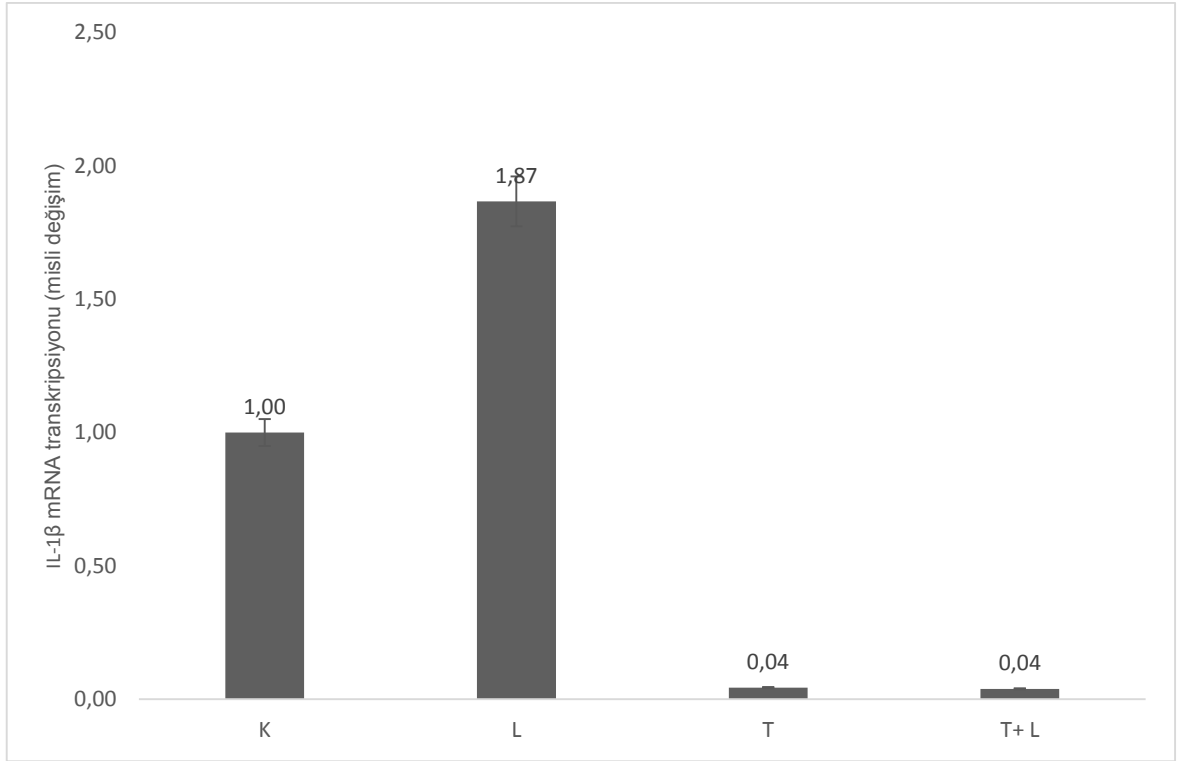
4.2.3. Bcl -2 gen ekspresyon sonuçları



Grafik.6. Deneme gruplarındaki Bcl -2 gen ekspresyonu düzeyleri(24 saat)

Çalışmada gen ekspresyon analizlerine göre etkin konsantrasyondaki LPS ‘in Bcl-2 düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 2.6 kat ‘down-regüle’ettiği bulundu. Bununla birlikte α -terpineolün LPS ile aynı zamanlı uygulanan grupta bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında, bu baskılanmanın yaklaşık 4.6 kat misli değişimlerle ‘up-regüle’edildiği ortaya konuldu.

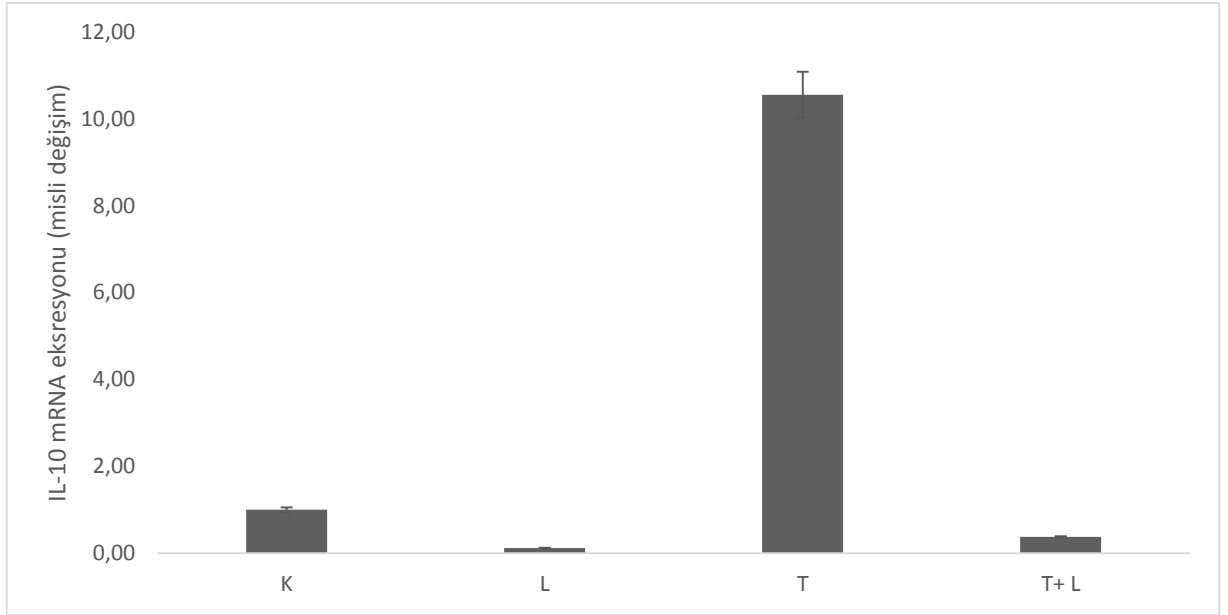
4.2.4. IL-1 β gen ekspresyonu sonuçları



Grafik.7. Deneme gruplarındaki IL-1 β gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).

Araştırmada etkin konsantrasyonda α -terpineol'ün kontrol grubuna IL-1 β ekspresyonunu 25 kat "down-regüle" ettiği tespit edildi. Çalışmada gen ekspresyon analizlerine göre etkin konsantrasyondaki LPS 'in IL-1 β düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 1.87 kat "up-regüle" bulundu. Bununla birlikte α -terpineolün LPS ile aynı zamanlı uygulanan grupta bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında yaklaşık 50 kat misli değişimlerle "down regüle" edildiği tespit edildi.

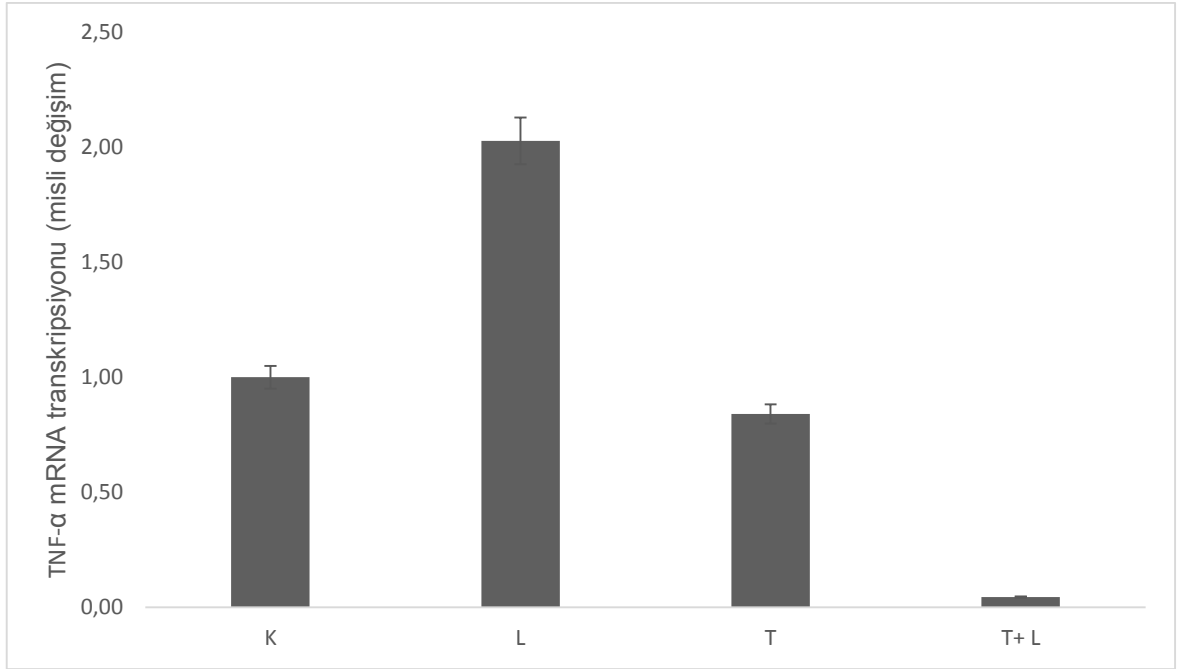
4.2.5. IL-10 gen ekspresyon sonuçları



Grafik.8. Deneme gruplarındaki IL-10 gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).

Araştırmada etkin konsantrasyonda α -terpineol'ün kontrol grubuna göre IL-10 ekspresyonunu 10.56 kat "up-regüle"ettiği tespit edildi. Çalışmada gen ekspresyon analizlerine göre etkin konsantrasyondaki LPS 'in IL-10 düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 8.33 kat "down-regüle" bulundu. Bununla birlikte α -terpineolün LPS ile aynı zamanlı uygulanan grupta bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında, bu baskılanmanın yaklaşık 3.08 kat misli değişimlerle "up-regüle" edildiği ortaya konuldu.

4.2.6. TNF- α gen ekspresyonu sonuçları



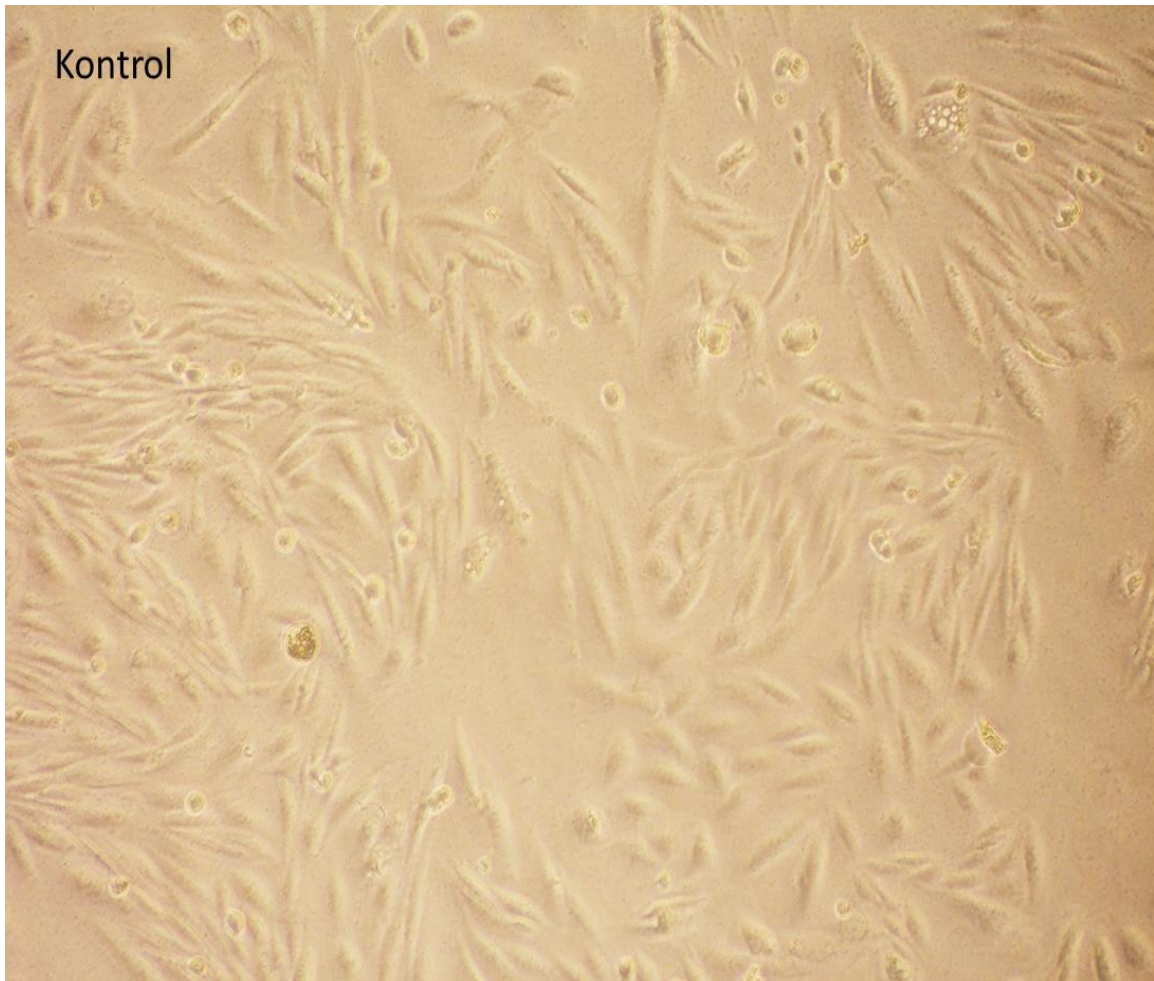
Grafik.9. Deneme gruplarındaki TNF- α gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).

Araştırmada etkin konsantrasyonda α -terpineol'ün kontrol grubuna göre TNF- α ekspresyonunu 1.19 kat''down-regüle'' ettiği tespit edildi. Çalışmada gen ekspresyon analizlerine göre etkin konsantrasyondaki LPS 'in IL-10 düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 2.03 kat''up-regüle'' bulundu. Bununla birlikte α -terpineol'ün LPS ile aynı zamanlı uygulanan grupta bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında, bu baskılanmanın yaklaşık 50 kat misli değişimlerle ''down-regüle'' edildiği ortaya konuldu.

4.3. Hücre Görüntüleri

Karaciğer hücrelerine LPS ve α -terpineol'ün 24 saat maruziyeti sonrası çalışma gruplarındaki hücreler invert mikroskopun (Olympus CK40,JP) 20x objektifiyle görüntülendi. Deneme gruplarından elde edilen fotoğraflarda LPS'in 50 ng/ml konsantrasyonda yoğun hücre kayıplarına neden oluğu gözlemlendi. Ayrıca LPS ile birlikte terpineol kullanılan grupta bu kayıpların dikkate değer biçimde azaldığı da gözlemlendi.

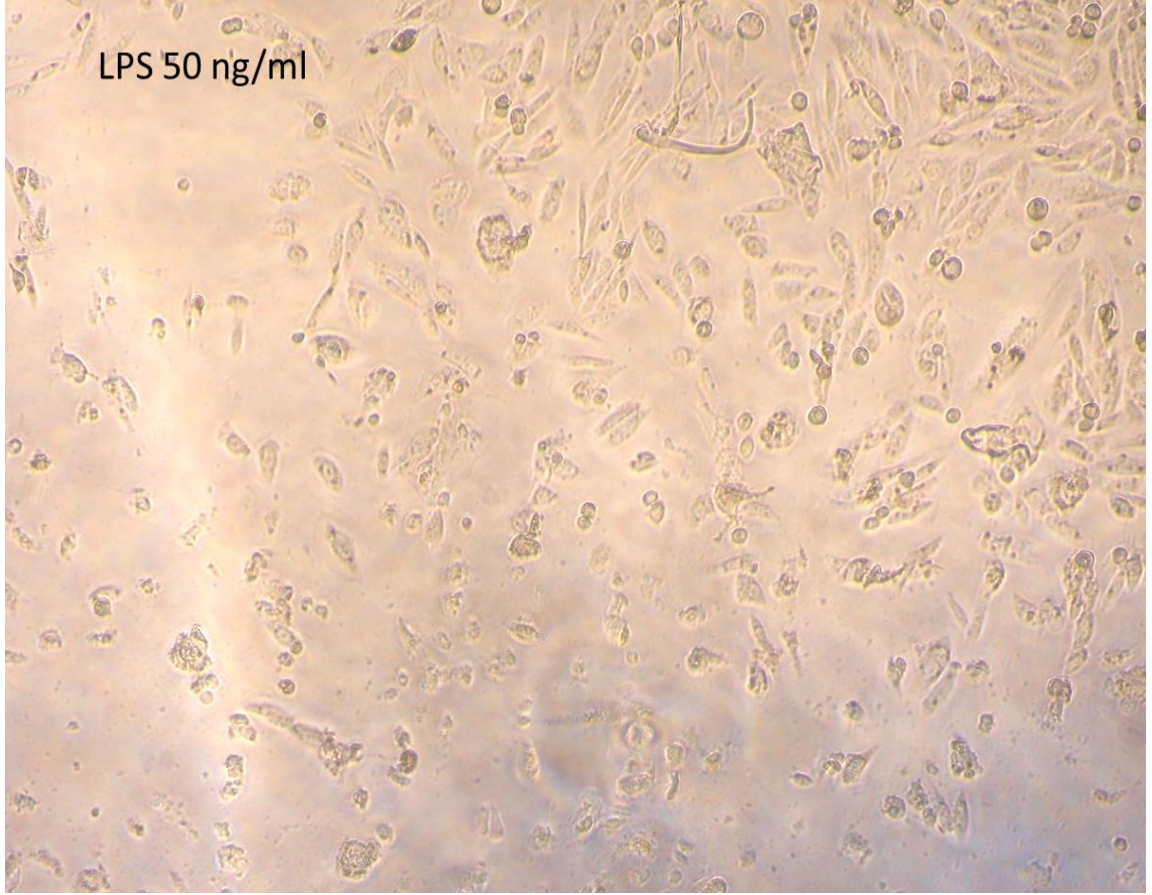
4.3.1. Kontrol grubu hücre görüntüleri



Fotoğraf 1. Kontrol grubu fotoğrafı (20 x, skala bar 1-50 nm).

Çalışmada kontrol hücrelerinin morfolojilerinin normal hepatosit yapısında oldukları ve flask tabanına homojen yayıldıkları görülmektedir.

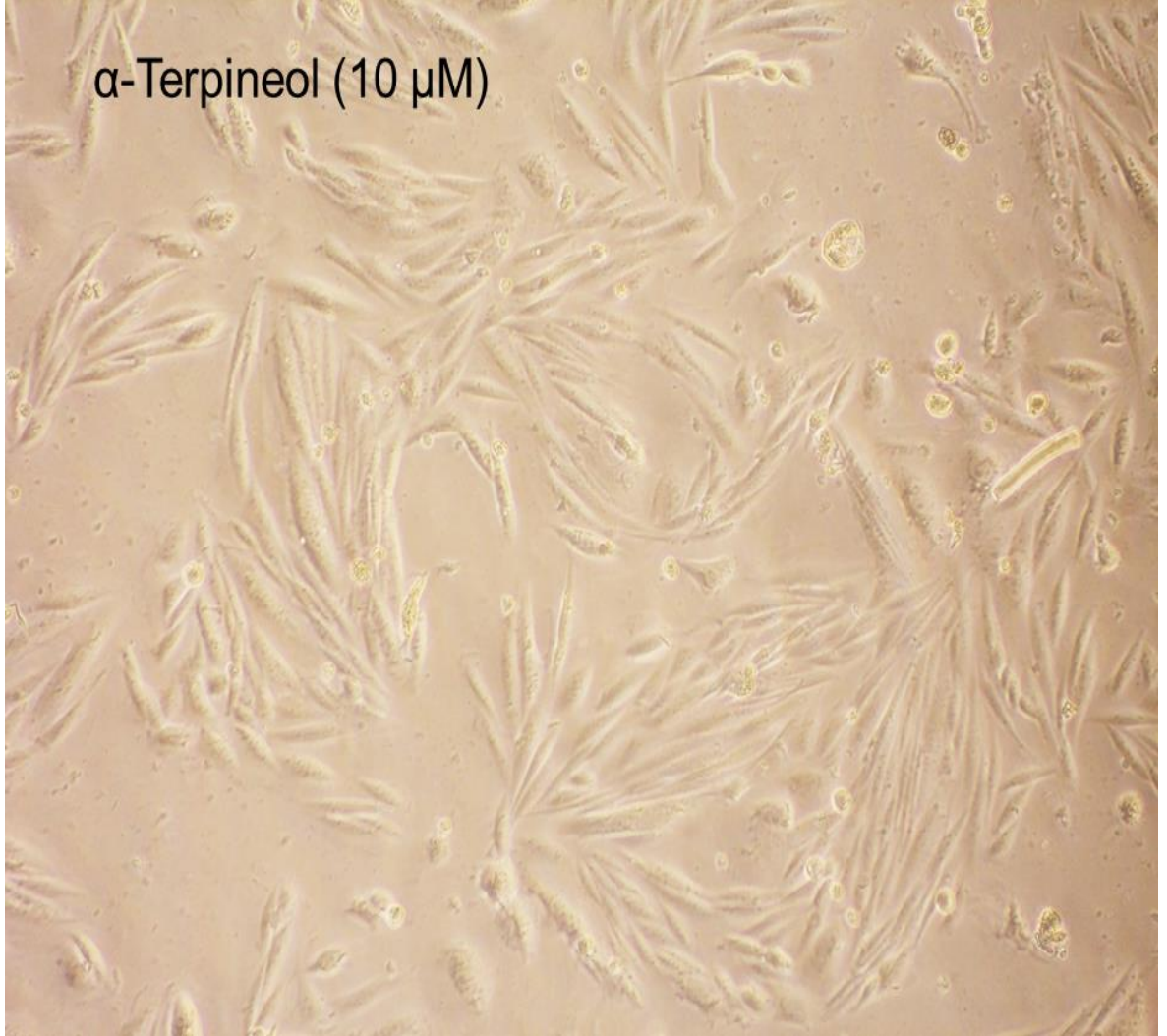
4.3.2. LPS grubu hücre görüntüleri



Fotoğraf 2. LPS grubu fotoğrafı (20 x, skala bar 1-50 nm)

Çalışmada LPS uygulanan grup hücrelerinin hem morfolojik olarak deformasyona uğradığı ve bununla birlikte yoğun hücre kayıplarının olduğu görülmektedir.

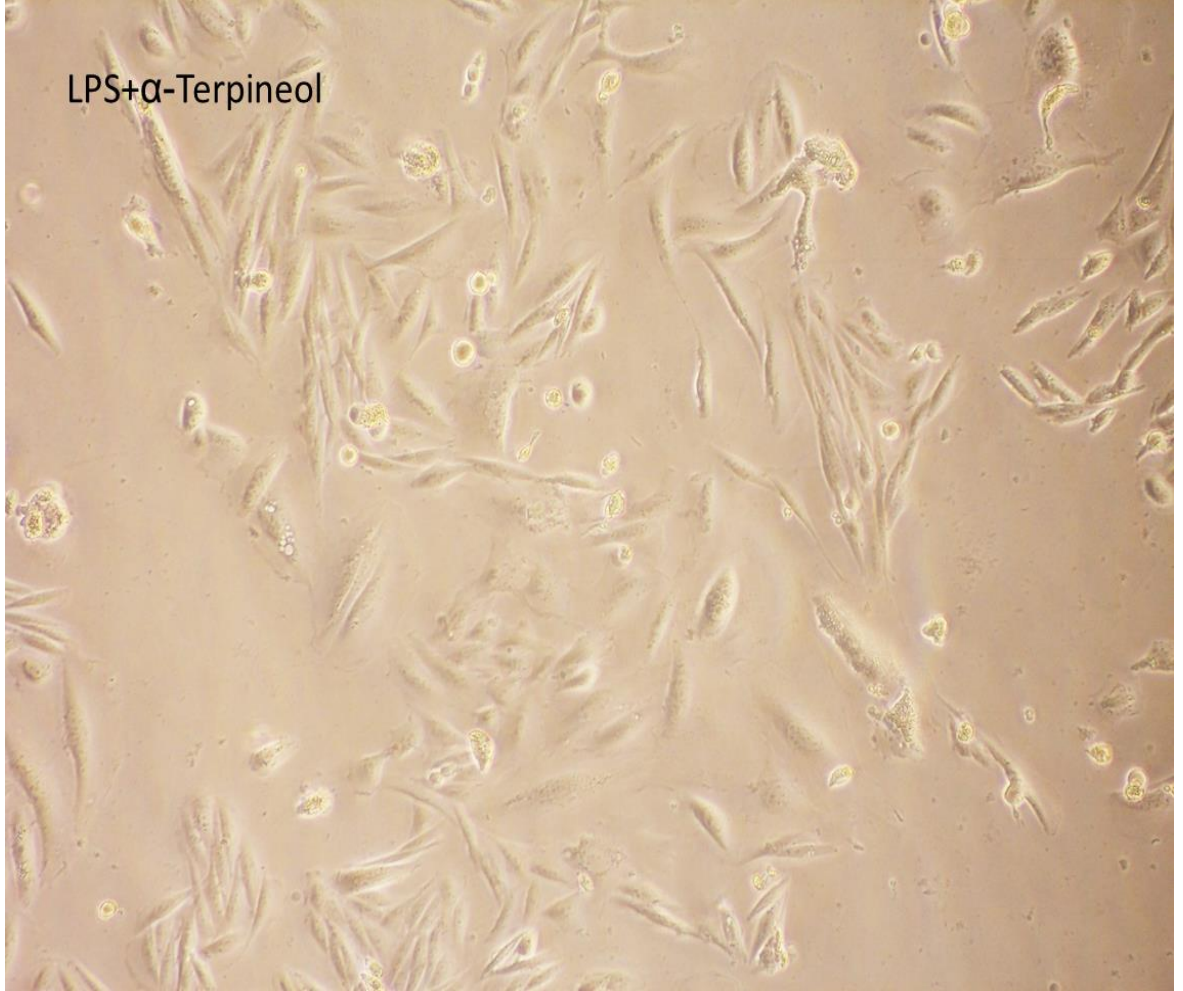
4.3.3. α -Terpineol grubu hücre görüntüleri



Fotoğraf 3. α -terpineol grubu fotoğrafı (20 x, skala bar 1-50 nm)

Çalışmada yalnız α -terpineol eklenen grup hücrelerinin gerek morfoloji gerekse de yoğunluk olarak kontrol hücrelerine yakın olduğu görülmektedir.

4.3.4. LPS+ α -terpineol grubu hücre görüntüleri



Fotoğraf 4. LPS+ α -terpineol grubu fotoğrafı (20 x, skala bar 1-50 nm).

Diğer bir sonuç olarak LPS+terpineol grubu sadece LPS uygulanan gruptaki hücrelerle kıyaslandığında, LPS'in meydana getirdiği morfoloji ve yoğunluk değişimlerini dikkate değer bir şekilde iyileştirdiği görülmektedir.

5- TARTIŞMA

Son 10 yılda yapılan birçok çalışmada, bağırsak mikrobiyotası ile obezite /insülin direnci arasında nedensel bir bağlantı kurulmuştur. Ayrıca diyetle indüklenen obezitenin bağırsak mikrobiyotasına bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla insülin direncini arttırdığı da bilinmektedir. Bağırsak florası bakterilerinden gelen LPS, TLR4 aktivasyonu ile insülin direncine yol açan kronik subklinik inflamatuvar süreci başlatmakta ve obeziteye sebep olmaktadır.

Araştırmamızda elde ettiğimiz hücre canlılık testlerinde etkin konsantrasyonda LPS'in hücre kayıplarına neden olduğu, ancak yine etkin konsantrasyonda uygulanan α -terpineol'ün bu kayıpları anlamlı derecede azalttığı ortaya konulmuştur. Bununla birlikte literatür tarandığında tespit ettiğimiz etkin konsantrasyonun (10 μ M) birçok çalışmaya göre kısa süreli kullanımı ve daha düşük konsantrasyonda olduğu görüldü. Birçok çalışmada, α -terpineol'ün çalışmamızdakinden yüksek konsantrasyonlarda uygulanımının göreceli olarak karaciğer yağlanmasına sebep olduğu rapor edilmiştir. Örneğin; Choi ve ark., (2013) yaptıkları *in vivo* çalışmada farelere 2 hafta süreyle 100 μ g/ml konsantrasyonda oral olarak α -terpineol verdiklerinde karaciğer dokusunda yağ infiltrasyonu olduğunu rapor etmişleridir.

Çalışmamızda viyabilite analizleri verilerine benzer olarak, birçok çalışmada LPS'in farklı hücre tiplerine sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Stone ve ark., 2003; Nishio ve ark., 2013; Shi ve ark., 2016; Ting ve ark., 2019). Yine Nogueira ve ark., (2014) yaptıkları LPS uyarımlı makrofajlarda çay ağacı esansiyel yağ bileşenlerinden α -terpineol'ün özellikle proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 β , TNF- α baskılayarak ve antiinflamatuvar sitokin olan IL-10'u uyararak LPS'in neden olduğu hücre kayıplarını önlediğini rapor etmişlerdir. Konu ile ilgili literatür tarandığında hücre canlılık testi sonuçları büyük oranda homoloji göstermektedir.

Araştırmada LPS'in karaciğer hücrelerinde pro inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β ve TNF- α) gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde uyardığı tespit edildi. Çalışmada diğer bir sitokin olan ve anti inflamatuvar yanıtta rolü bulunan IL10 ekspresyonu LPS tarafından baskılanmıştı. Yine araştırmada yangı parametrelerindeki bu olumsuz tablo α -terpineol

tarafından anlamlı düzeyde iyileştirildiği de görüldü. Çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasının çeşitli mekanizmalar yoluyla NAFLD'ye katkıda bulunduğunu göstermektedir (Chalasani ve ark., 2018). Bunlar enerji homeostazının düzenlenmesi için kısa zincirli yağ asitleri karbonhidrat fermantasyonu yoluyla karaciğerde de novo lipogenezi indüklenmesi (Lucas ve ark., 2018) endokannabinoid sistemin modülasyonu (Armstrong ve ark., 2014); çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) ve karaciğer lipid ihracatının sentezi için gerekli kolin metabolizmasının modülasyonu (Ashtari ve ark., 2015); safra asidi homeostazının modülasyonu(Buzzetti ve ark., 2016); endojen etanol oluşumu; ve (Mazzotti ve ark., 2016) karaciğer makrofajlarında pro-enflamatuar sitokinlerin üretimini aktive eden ve hepatositlerin iltihaplanmasına neden olan lipopolisakkaritin (LPS) artışı olarak sıralanabilir (Poeta ve ark., 2017). Gram negatif bakterilerin hücre duvarı bileşeni olan LPS'in, TNF- α ve IL-6, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz 2 (COX2) ve nükleer faktör-kappaB gibi birçok enflamatuar aracı molekülün ekspresyonu için sinyalleme kaskatını başlattığı bilinmektedir (Rossol ve ark., 2011). Bağırsak mikrobiyotası ve bağırsak bariyeri bozulma olaylarının özünde PRR'lerin aktivasyonu ile IL-1 IL, IL-6 ve TNF- α gibi sitokinlerin üretiminin ve ekspresyonunun uyarılması bulunmaktadır (Buzzetti ve ark., 2016). TNF- α 'nın aşırı ekspresyonu, NAFLD ve obezitenin ilerlemesinde inflammatuar bir belirteç olarak kabul edilir. TNF- α , hücrelerin insüline duyarlı hale getirilmesinde rol oynayan bir anti-enflamatuar sitokindir ve adiponektinin bir antagonisti olarak işlev görür. Aynı zamanda, enflamasyonu, metabolizmayı, hücre canlılığını ve çeşitli sitokinlerin üretimini düzenleyen nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B)'nin hücre içi enflamatuar yolunu aktive eder. Hem TNF- α hem de NF- κ B aktive edilir ve birlikte insülin direncini arttırırlar ve karaciğer iltihabına katılırlar (Duarte ve ark., 2015). Sitokin salınımının yanı sıra, TLR aktivasyonu; NF- κ B hücre içi enflamatuar yolunu uyararak, insülin direncine ve obeziteye neden olan makrofajların stimülasyonunu indükler (Chakraborti, 2015). İnsülin direnci ve obezite varlığı, vücut tarafından daha fazla serbest lipid metaboliti üretildiği ve daha fazla pro-inflamatuar sitokinlerin dolaştığı anlamına gelir. Pro-inflamatuar sitokinler ve lipotoksisite faktörleri hepatositlerde inflamasyon, apoptoz ve fibrozisin gelişmesine katkıda bulunur (Buzzetti ve ark., 2016). NASH'li karaciğerlerde pro-enflamatuar yolları etkinleştirerek kemokinlerin, sitokinlerin ve diğer proenflamatuar moleküllerin salınmasına yol açan bazı mekanizmalar mevcuttur. Bu sinyal yolları, protein kinaz, NF- κ B ve JNK gibi

transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu içermektedir (Yu ve ark., 2006). NF- κ B, p65 ve p50 gibi homodimerik veya heterodimerik beş peptitten oluşan bir transkripsiyon faktörüdür ve karaciğerde yüksek oranda eksprese edilir. NF- κ B p65: p50 heterodimerleri, sitokinler, kemokinler, adhezyon molekülleri, nitrik oksit ve siklooksijenaz 2 gibi birçok pro-enflamatuar moleküllerin transkripsiyonunu düzenler (Yu ve ark., 2006). Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı'nda NF- κ B aktivasyonunun en çok parankimal olmayan hücrelerde görüldüğü, TNF- α , IL-1 β ve diğer sitokinlerin aktivasyonu yoluyla hücrelerde pro-enflamatuar yolların uyarımı gerçekleştiği bilinmektedir (Dela Peña ve ark., 2005). Sousa ve ark., (2020) α -terpineol enantiyomerlerinin yüksek yağlı diyet uygulanan farelerde antioksidan ve antienflamatuar etkilerini araştırdıkları çalışmada 50mg/kg α -terpineol'ün pro-inflamatuar sitokinlerden TNF- α ve IL-1 β serum düzeylerini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Cintra ve ark., (2008) yaptıkları fare NAFLD modelinde, antikör veya antisens oligonükleotitler kullanılarak IL-10 inhibisyonunun, karaciğerdeki TNF- α ve IL-6 ekspresyonunu upregüle ettiği ve insülin direncini arttırdığı gözlemlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, yoğun α -terpineol ve terpinen-4-ol içeren çay ağacı esansiyel yağları özütünün güçlü antienflamatuar özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. α -terpineol'ün enflamatuar medyatörlerin üretimini baskıladığı ve bu etkiyi NF- κ B, p38 veya ERK/MAPK yolları üzerinden gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Nogueira et al., 2014). Bir diğer çalışmada ise Oliveira ve ark., (2012) α -terpineolün sitokin kaskadını inhibe ettiği, TNF- α ve IL-1 β gibi enflamatuar medyatörlerin üretimini azalttığı ve NO salımını inhibe ettiği, böylelikle de antienflamatuar ve antihipernosikeptif etkinlik gösterdiği bildirilmiştir

Araştırmamızda karaciğer hücrelerinde LPS'in kaspaz 3 ve bax gibi proapoptotik parametreleri uyardığı, bununla birlikte anti apoptotic olan Bcl-2gen ekspresyonunu ise baskılayarak hücre kayıplarına neden olduğu tespit edildi. Yine koruyucu etken madde olarak α -terpineol'ün bu olumsuz durumu geri çevirerek hücreleri kurtardığı da yapılan gen ekspresyon analizleriyle ortaya konuldu. İnflamatuar yanıt faktörleri hücre içi NF κ B ve AP-1 aktivasyonuna neden olarak TNF- α transkripsiyonunu tetikler ve apoptoz sürecinin başlamasına neden olur (Bubici ve ark., 2004). Zhu ve ark., (2006); LPS gibi faktörlerin uyarımıyla TNF- α reseptörüne bağlandığında kaspaz 3'ü dolaylı olarak kaspaz 8 üzerinden uyarabildiği gibi doğrudanda uyararak mitokondriyal membran permeabilitesini bozarak sitokrom c'nin sitoplazmaya translokasyonunu uyararak intrinsik apoptozu tetiklediğini rapor etmişlerdir. Bax proteininin mitokondriye translokasyonu apoptozda

kritik bir adımdır (Valentijn ve ark. 2003). Bax genelde sitozolde bulunur. Ancak apoptoz sürecinde protein Bcl2/Bcl xl proteinleriyle interaksiyona girerek onların mitokondri geçişlerini engeller (Copano ve ark., 2002). Zhang ve ark.,(2007) yaptıkları çalışmada nöron hücrelerine uyguladıkları TNF- α 'nın bax stimölasyonuna neden olarak apoptozu indüklediklerini rapor etmişlerdir. Pourbakhsh ve ark.,(2014) yaptıkları etanol uyarımlı karaciğer harabiyeti modelinde içeriğinde terpineol bulunan Nigella sativa bitkisinin esansiyel yağlarının Bax ekspresyonunu baskımlarken, Bcl-2 ekspresyonunu indüklediğini rapor etmişlerdir. Yine aynı çalışmada ekstrinsik apoptozunda baskılanmasında esansiyel yağların kaspaz 8'I baskımlayarak etki gösterdiğide rapor edilmiştir.

Araştırmanın tüm verileri dikkate alındığında karaciğer hücrelerinin LPS ile maruziyeti sonrası inflamasyon ve buna bağılı olarak apoptoz gelişmiştir. Bununla birlikte hücrelere proliferatif etkin konsantrasyonda uygulanan α -terpineol'ün ise inflamatuvar yanıt sitokinlerini baskımlayarak yangıyı önlemiş ve buna bağılı olarak apoptozu engellediğı görölmüştür.

6. SONUÇ

Sonuç olarak, araştırmada bakteriyel hücre duvarı endotoksini ile karaciğer hücrelerinde *in vitro* olarak yangı ve apoptoz modellemesi yapıldı. Yine çalışmada hücrelerde meydana gelen bu olumsuz durumun giderilmesinde bir monoterpen alkol olan α -terpineol kullanıldı. Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre etkin konsantrasyondaki LPS, hücrelerde anlamlı düzeyde yangı ve apoptoz meydana getirdi. Bununla birlikte hücre canlılık testleriyle etkin konsantrasyonu tespit edilen α -terpineol'un proinflatuar yangı belirteç olan IL-1 β ve TNF- α 'nın gen ekspresyonlarını baskılayarak güçlü antiinflatuar etki gösterdiği ortaya konuldu. Yine anti inflammatuar sitokinlerden IL 10 ekspresyonları ise α -terpineol tarafından anlamlı düzeyde uyarıldığı da tespit edildi. Ayrıca araştırmada proapoptozu uyaran bax ve kaspaz 3 gen ekspresyonları LPS tarafından uyarılırken α -terpineol tarafından baskılandığı bulundu. Yine antiapoptotik Bcl2 gen ekspresyonları LPS tarafından baskılanırken α -terpineol tarafından uyarıldığı görüldü.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde α -terpineolün mikrobiyota patojenleri tarafından meydana getirilen yangı ve hücre kayıplarına karşı alternatif bir etken madde olarak kullanılabileceği kanısına varıldı. Bununla birlikte literatür tarandığında, tespit ettiğimiz proliferatif etkin konsantrasyonun (10 μ M) birçok çalışmaya göre kısa süreli kullanımı ve daha düşük konsantrasyonda olduğu görüldü. Birçok çalışmada, α -terpineol'un çalışmamızdakinden yüksek konsantrasyonlarda uygulananının göreceli olarak karaciğer yağlanmasına sebep olduğu rapor edilmiştir. Ancak konunun tam aydınlatılabilmesi ve ortaya konulabilmesi için *in vivo* ve ileri düzey araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. **Saad M. J. A., Santos A., Prada P. O.** Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *PHYSIOLOGY* **2016** 31: 1, 283–293.
2. **Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM.** Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* .**1993**.259: 87–91.
3. **Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP.** Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest* **1997** 100: 2158– 2169.
4. **Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJA, Kahn CR.** Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996** .93: 12490–12495.
5. **Marra F, Lotersztajn S** **2013** Pathophysiology of NASH: perspectives for a targeted treatment. *Curr Pharm Des* 19:5250–5269.
6. **Arcy M.S. D.,** Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*. **2019**. 43, 6: 582-92.
7. **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR** **1972** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4): 239–57.
8. **Elmore S (2007)** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4): 495–516.
9. **Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J (2005)** Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22(3): 355–70.
10. **Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS (2014)** Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol* 14(3): 166–80.
11. **Kroemer G.,** The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis, *Nature Med.* **3:** (1997), 614- 620.
12. **Brady H.J.M., Salomons G.S., Bobeldijk R.C., Berns A.J.M.,** T-cells from baxtransgenic mice show accelerated apoptosis in response to stimuli but do not show restored DNA damage-induced cell death in the absence of p53, *EMBO J.* 15 **1996** 1221-1230.
13. **Bubici C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G.** NF- κ B and JNK: An intricate affair. *Cell Cycle* **2004**; 3:1524-9.
14. **Zhu J, Liu M, Kennedy RH, Liu SJ.** TNF α -induced impairment of mitochondrial integrity and apoptosis mediated by caspase-8 in adult ventricular myocytes. *Cytokine* **2006**; 34:96-105.
15. **Valentijn AJ, Metcalfe AD, Kott J, Streuli CH, Gilmore AP.** Spatial and temporal changes in Bax subcellular localization during anoikis. *J Cell Biol* **2003**; 162:599-612.
16. **Zhang L. Xing D. Liu L. Gao X. Chen M.** TNF- α Induces Apoptosis Through JNK/BaxDependent Pathway in Differentiated, but not Naïve PC12 Cells. *Cell Cycle.* **2007**, 6:12, 1479-1486.
17. **Capano M, Crompton M.** Biphasic translocation of Bax to mitochondria. *Biochem J* **2002**; 367:169-78.
18. **Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al.** Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* **2016**; 64:73–84.
19. **Machado MV, Diehl AM.** Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology.* **2016**; 150:1769–77.
20. **Arab JP, Karpen SJ, Dawson PA, et al.** Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: molecular insights and therapeutic perspectives. *Hepatology.* **2017**; 65:350–62.
21. **Ahmed A, Wong RJ, Harrison SA.** Nonalcoholic fatty liver disease review: diagnosis, treatment, and outcomes. *Clin Gastroenterol Hepatol.* **2015**; 13:2062–70.
22. **Bonci E, Chiesa C, Versacci P, et al.** Association of nonalcoholic fatty liver disease with subclinical cardiovascular changes: a systematic review and meta-analysis. *Biomed Res Int.* **2015**; 2015:1–11.
23. **Hirsova P, Gores GJ.** Death receptor-mediated cell death and proinflammatory signaling in nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* **2015**; 1:17–27.

24. **Bechmann LP, Gieseler RK, Sowa JP, et al.** Apoptosis is associated with CD36/fatty acid translocase upregulation in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* **2010**; 30:850–9.
25. **Dela Peña A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G.** NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology.* **2005**;129:1663–1674.
26. **Yu J, Ip E, Dela Peña A, et al.** COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: role as pro-inflammatory mediator. *Hepatology.* **2006**;43:826–836.
27. **Xu H, Uysal KT, Becherer JD, Arner P & Hotamisligil GS 2002** Altered tumor necrosis factor- α (TNF- α) processing in adipocytes and increased expression of transmembrane TNF- α in obesity. *Diabetes* 51 1876–1883.
28. **Lang CH, Dobrescu C & Bagby GJ 1992** Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology* 130 43–52.
29. **Arner P 2003** The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 14 137–145.
30. **Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW & Hotamisligil GS 1997** Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389 610–614.
31. **Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M & Taylor R 1996** Effects of an engineered human anti-TNF- α antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 45 881–885.
32. **Tilg H & Diehl AM 2000** Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *New England Journal of Medicine* 343 1467–1476.
33. **Lesmana CR, Hasan I, Budihusodo U, Gani RA, Krisnuhoni E, Akbar N & Lesmana LA 2009** Diagnostic value of a group of biochemical markers of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Digestive Diseases* 10 201–206.
34. **Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A & George J 2004** Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or adiponectin? *Hepatology* 40 46–54.
35. **Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Yang H, Zhan Q, Huang J, Shi SL, Lai XB & Huang HL 2010** Influence of polygenetic polymorphisms on the susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease of Chinese people. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 25 772–777.
36. **Marra F & Bertolani C 2009** Adipokines in liver diseases. *Hepatology* 50, 957–969.
37. **den Boer MA, Voshol PJ, Schroder-van der Elst JP, Korshennikova E, Ouwers DM, Kuipers F, Havekes LM & Romijn JA 2006** Endogenous interleukin-10 protects against hepatic steatosis but does not improve insulin sensitivity during high-fat feeding in mice. *Endocrinology* 147, 4553–4558.
38. **Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP, Moraes JC, de Souza CT, Milanski M, Morari J, Gambero A, Saad MJ & Velloso LA 2008** Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *Journal of Hepatology* 48 628–637.
39. **Bauer K., Garbe D., Surburg H.,** Common Fragrance and Flavor materials: Preparations, properties, and uses, 4th ed., Wiley, New York, **2001**.
40. **Sell C.,** A Fragrant Introduction to terpenoid chemistry, 1st ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **2003**.
41. **Sales A., Felipe L. O., Bicas J. L..** Production, Properties, and Applications of α -Terpineol. *Food and Bioprocess Technology*, **2020**, doi: 10.1007/s11947-020-02461-6.
42. **Bauer K., Garbe D., Surburg H.,** Common Fragrance and Flavor materials: Preparations, properties, and uses, 4th ed., Wiley, New York, **2001**.
43. **Sabino C.K., Ferreria-Filho E.S., Mendes M.B., Da Silva-[5] Filho J.C.,** Cardiovascular effects induced by α -terpineol in hypertensive rats, *Flavour Frag. J.*, **2013**, 28(5), 333-339.
44. **Lampronti I., Saab A.M., Gambari A.,** Antiproliferative [6] activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division, *Int. J. Oncol.*, **2006**, 29(4), 989-995.
45. **Held S., Schieberle P., Somoza V.,** Characterization of alpha-[7] terpineol as an anti-inflammatory component of orange juice by in vitro studies using oral buccal cells, *J. Agric. Food Chem.*, **2007**,

- 55(20), 8040-8046.
46. **Brand C., Ferrante A., Prager R.H., Riley T.V., Carson C.F., [8] Finaly-Jones J.J., et al.**, The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro, *Inflamm. Res.*, **2001**, 50(4), 213-219.
 47. **Hassan S.B., Muhtasib H.G., Goeransson H., Larsson R.**, Alpha-[9] terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF- κ B signaling, *Anticancer Res.*, **2010**, 30(6), 1911-1920.
 48. **Nogueira MN, Aquino SG, Rossa Junior C, Spolidorio DM.** Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm Res.* **2014**;63(9):769-778.
 49. **Sousa GM, Cazarin CBB, Maróstica Junior MR, et al.** The effect of α -terpineol enantiomers on biomarkers of rats fed a high-fat diet. *Heliyon.* **2020**;6(4):e03752. Published 2020 Apr 30.
 50. **Oliveira, Makson & Marques, Rosemarie & Santana, Michele & Santos, Amanda & Brito, Fabíola & Barreto, Emiliano et al., (2012).** α -Terpineol Reduces Mechanical Hypernociception and Inflammatory Response. *Basic & clinical pharmacology & toxicology.* 111. 120-5. 10.1111/j.1742-7843.2012.00875.x.
 51. **Wolff A.** U"ber Grundgesetze der Immunität. *Zentralbl Bakteriolog* **1904**; 37: 390–397.
 52. **Yang H, Young DW, Gusovsky F and Chow JC.** Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated tolllike receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J Biol Chem* **2000**; 275: 20861–20866
 53. **Khaleel C., Tabanca N., Buchbauer G.** α -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. *Open Chem.*, **2018**; 16: 349–361.
 54. **Touyz R.M.**, Oxidative stress and vascular damage in hypertension, *Curr. Hypertens. Rep.*, **2000**, 2(1), 98-105.
 55. **Brand C., Ferrante A., Prager R.H., Riley T.V., Carson C.F., Finaly-Jones J.J., et al.**, The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro, *Inflamm. Res.*, **2001**, 50(4), 213-219.
 56. **Ferrero-Miliani, L.; Nielsen, O.H.; Andersen, P.S.; Girardin, S.E.** Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin. Exp. Immunol.* **2007**, 147, 227–235.
 57. **Dassoler, M.; Schwanz, M.; Busseto, F.; Moreira, E.A.; Gutierrez, L.** Perfil fitoquímico e ensaio farmacológico de *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae). *J. Bras. Fitom.* **2004**, 2, 4–8.
 58. **Falcão, H.; Lima, I.O.; Santos, V.L.; Dantas, H.F.; Diniz, M.F.F.M.; Barbosa-Filho, J.M.; Batista, L.M.** Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Braz. J. Pharmacogn.* **2005**, 15, 381–391.
 59. **Ni Y., Zhug. F., Nagashimada M., Ota T.** Novel Action of Carotenoids on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Macrophage Polarization and Liver Homeostasis. *Nutrients.* 2016 Jun 24;8(7):391.
 60. **Lu Y.C. Chen Yeh W. Ohashi P. S.** LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **2008**. 145–151.
 61. **Amelio M. D. Cavallucci V. ve Cecconi F.** Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death and Differentiation* **2010**. 17, 1104–1114.
 62. **Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, Harrison SA, Brunt EM, Sanyal AJ.** **2018.** The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 67: 328–357.
 63. **Lucas C, Lucas G, Lucas N, Krzowska-Firych J, Tomasiewicz K.** **2018.** A systematic review of the present and future of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Hepatol* 4: 165–174.
 64. **Armstrong MJ, Adams LA, Canbay A, Syn WK.** **2014.** Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 59: 1174–1197.
 65. **Ashtari S, Pourhoseingholi MA, Zali MR.** **2015.** Non-alcohol fatty liver disease in Asia: prevention and planning. *World J Hepatol* 7: 1788–1796.

66. **Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. 2016.** The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 65: 1038–1048.
67. **Mazzotti A, Caletti MT, Sasdelli AS, Brodosi L, Marchesini G. 2016.** Pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease: lifestyle-gut-gene interaction. *Dig Dis* 34Suppl 1: 3–10.
68. **Poeta M, Pierri L, Vajro P. 2017.** Gut-liver axis derangement in non-alcoholic fatty liver disease. *Children*, Basel.
69. **Chakraborti CK. 2015.** New-found link between microbiota and obesity. *World J Gastrointest Pathophysiol* 6: 110–119.
70. **Duarte N, Coelho IC, Patarrão RS, Almeida JJ, Penha-Gonçalves C, Macedo MP. 2015.** How inflammation impinges on NAFLD: a role for Kupffer cells. *BioMed Res Int* 2015: 984578.
71. **Rossol M. , HeineH. , Meusch Quandt U. , D. , Klein C. , Sweet M.J. , Hauschildt S.** LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages *Critical Reviews in Immunology*, 31 **2011**, pp. 379-446
72. **Shi H., Yang Y. G., Binlin L., Xiaoyu S.G., Lu Y. J.S.** The in vitro effect of lipopolysaccharide on proliferation, inflammatory factors and antioxidant enzyme activity in bovine mammary epithelial cells. *Animal Nutrition* 2 **2016**. 99-104.
73. **Nishio K., Horie M. Yoko M. A. Hitoshi S. Yoshihisa I. Yasukazu H. Niki Y..E.** Attenuation of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytotoxicity by tocopherols and tocotrienols. *Redox Biology* 1 **2013**.97–10398.
74. **Ting Ge Y., Zhong AQ , Xu GF , Lu Ying** Resveratrol Protects BV2 Mouse Microglial Cells Against LPS-induced Inflammatory Injury by Altering the miR-146a-5p/TRAF6/NF-κB Axis. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* **2019** Oct;41(5):549-557.
75. **Stone W. L. Qui M. Smith M..** Lipopolysaccharide enhances the cytotoxicity of 2-chloroethyl ethyl sulfide. *BMC Cell Biology* **2003**, 4: 1-7.
76. **Nogueira M. N. M., Aquino S. G., Rossa J. C., Spolidorio D. M. P.** Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1b, IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm. Res.* **2014**. 63:769–778.
77. **Pourbakhsh H, Taghiabadi E, Abnous Kh, Timcheh Hariri A, Hosseini SM, Hosseinzadeh H.** Effect of *Nigella sativa* fixed oil on ethanol toxicity in rats. *Iran J Basic Med Sci* **2014**; 17:1020-1031.
78. **Choi Y. , Sim W.C. , Choi H.K. , Lee S. , Lee B. H.** α-Terpineol induces fatty liver in mice mediated by the AMP-activated kinase and sterol response element binding protein pathway. *Food and Chemical Toxicology* 55 **2013**. 129–136

8. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Hatay da doğdu, ilkokulu Yavuz Selim İlkokulu, ortaokulu Yayladağı Lisesi, liseyi Merkez Lisesinde tamamladı. 2002 Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi hemşirelik yüksek okuluna başladı. 2006 yılında mezun oldu. 2009 yılında İstanbul Validebağ Devlet Hastanesinde göreve başladı aynı zamanda Marmara Üniversitesi pedagojik formasyon eğitimini tamamladı. 2018 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Biyokimya AD’da yüksek lisansa başladı.

