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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Eray ÖZGÜN

PALMİTAT İLE YAĞLANMA OLUŞTURULAN İNSAN KAYNAKLI HEPATOMA HÜCRELERİNDE ROSMARİNİK ASİDİN PARAOKSONAZ-1 VE PARAOKSONAZ-3 PROTEİN EKSPRESYONLARINA ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Esra YAKŞİ

Referans no: 10252742

EDİRNE - 2019

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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Eray ÖZGÜN

PALMİTAT İLE YAĞLANMA OLUŞTURULAN İNSAN KAYNAKLI HEPATOMA HÜCRELERİNDE ROSMARİNİK ASİDİN PARAOKSONAZ-1 VE PARAOKSONAZ-3 PROTEİN EKSPRESYONLARINA ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Esra YAKŞİ

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2017/134

Tez no:

EDİRNE - 2019

T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde ve Dr. Öğretim Üyesi Eray ÖZGÜN' ün danışmanlığında Yüksek Lisans öğrencisi Esra YAKŞİ' ye ait tez başlığı ''Palmitat İle Yağlanma Oluşturulan İnsan Kaynaklı Hepatoma Hücrelerinde Rosmarinik Asidin Paraoksonaz-1 Ve Paraoksonaz-3 Protein Ekspresyonlarına Etkisi'' olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 27.05.2019 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından ''Yüksek Lisans Tezi'' olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN
JÜRİ BAŞKANI

Dr. Öğr.Üyesi Eray ÖZGÜN
ÜYE

Dr.Öğr.Üyesi Aliye ÇELİKKOL
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana emek veren ve yönlendiren, tez çalışmamda katkıları olan danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Eray ÖZGÜN'e, Tıbbi Biyokimya A.D. Başkanı Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, Tıbbi Biyokimya A.D. öğretim üyeleri Prof. Dr. Sevgi ESKİOCAK, Prof. Dr. Hakan ERBAŞ, Prof. Dr. İlker Dıbırdık ve Dr. Öğr. Üyesi Gülben Sayılan ÖZGÜN'e , tüm çalışma arkadaşlarıma ve bu çalışmayı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI** 3
- **PALMİTATLA OLUŞTURULAN DENEYSEL NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI MODELİ** 6
- **ROSMARİNİK ASİT** 7
- **PARAOKSONAZLAR** 8

GEREÇ VE YÖNTEMLER 10

BULGULAR 16

TARTIŞMA 25

SONUÇLAR 29

ÖZET 31

SUMMARY 33

KAYNAKLAR 35

ŞEKİLLER LİSTESİ 41

ÖZGEÇMİŞ 42

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

HDL : Yüksek dansiteli lipoprotein

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

NAFLD : Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı

PBS : Tuzlu fosfat tamponu

PON : Paraoksonaz

RA : Rosmarinik asit

GİRİŞ VE AMAÇ

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), tüm dünyadaki görülme sıklığı yaklaşık %25 civarında olan en önemli sağlık sorunlarından biridir. NAFLD alkol kullanım alışkanlığı bulunmayan bireylerde, farklı derecelerde karaciğer yağlanması varlığı ile karakterize bir hastalıktır (1). NAFLD hastalarında hepatositlerin içine trigliserit infiltrasyonu artmaktadır (2). 16 karbonlu doymuş bir yağ asidi olan palmitat karaciğerde trigliseritlerin yapısında bulunur ve hem sağlıklı bireylerde hem de NAFLD hastalarının karaciğerlerinde en fazla bulunan yağ asitlerinden biridir (3).

HepG2 hücreleri, insan kaynaklı hepatoma hücreleridir ve bu hücreler hepatositlere benzerlikleri sebebiyle serbest yağ asitleri ile deneysel NAFLD modeli oluşturmak için sıklıkla kullanılmaktadır. HepG2 hücrelerinde 1 mM palmitat ile oluşturulan yağlanmanın, karaciğerde yağ birikimine bağlı karaciğer hücresindeki akut ve toksik etkilerin araştırılmasında kullanılabilecek bir hücresel NAFLD modeli olduğu bildirmiştir (4).

Rosmarinik asit (RA), doğada biberiye, adaçayı ve perilla biftek otu gibi bitkilerde bulunan, antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri gösterilmiş bir polifenoldür (5).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı multisistemik bir hastalıktır ve metabolik sendrom ile ilişkilidir. Aynı zamanda NAFLD'nin ateroskleroz ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (6,2). Paraoksonaz (PON)1 ve PON3 dolaşımda yüksek dansiteli lipoprotein (HDL)'ye bağlı olarak bulunan antioksidan ve anti-aterojenik enzimlerdir ve her iki enzim de esas olarak karaciğerde sentez edilir (7). Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında RA'nın yağlanma üzerine etkisini araştıran tek bir çalışma bulunmakla birlikte Balachander ve ark. (8), çalışmamızdan farklı olarak oleik asit ile oluşturulan kronik NAFLD modelinde, RA'nın

hücre içi yağlanmayı azalttığını bildirmişlerdir. Ancak akut ve toksik NAFLD modeli olan palmitat ile oluşturulan NAFLD modelinde yağlanmaya ve hücre canlılığına etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Aynı zamanda literatürde RA'nın PON1 ve PON3 enzimleri üzerine etkisini araştıran bir çalışma da bulunmamaktadır.

Çalışmamızın amacı, palmitat ile deneysel NAFLD modeli oluşturulan HepG2 hücrelerinde RA'nın, hücre canlılığına, yağlanmaya, PON1 ve PON3 protein düzeylerine etkisini araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı görüntüleme yöntemleri veya histolojik olarak karaciğer yağlanmasının gösterildiği ancak bununla ilişkilendirilebilecek düzeyde bir alkol kullanım alışkanlığının bulunmadığı karaciğer yağlanmalarını tanımlamaktadır (1). Yağ birikimi ile karakterize basit karaciğer yağlanması, karaciğerde yağlanma ile birlikte inflamasyon ve balonlaşmanın görüldüğü non-alkolik steatohepatit ve karaciğer fibrozis ile seyreden siroz NAFLD'de görülebilen histopatolojik lezyonlardır (9).

Etyopatogenezi

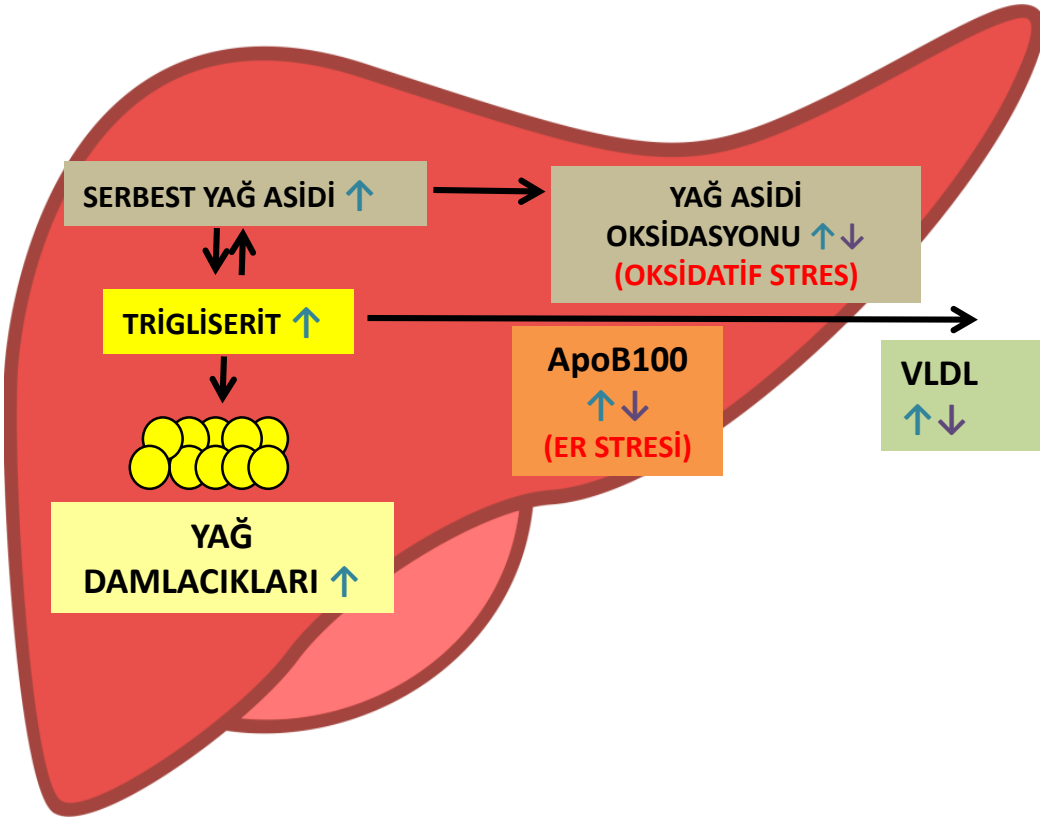
Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı gelişim mekanizmalarında birbiri ile benzer iki hipotez ortaya atılmıştır (10,11). Çift vuruş hipotezinde primer olarak meydana gelen yağlanma ve buna bağlı olarak karaciğer hasarı, inflamasyon ve fibrozis geliştiği öne sürülmüştür (10). Çoklu vuruş hipotezinde ise yağ birikimi, oksidatif stres, inflamasyon, endoplazmik retikulum stresi, yağ dokusu disfonksiyonu, genetik faktörler ve barsak mikrobiyatası gibi birçok faktörün NAFLD gelişiminde rolü olduğu bildirilmektedir (11).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı karaciğer parankiminde yüksek seviyede trigliserit ve serbest yağ asidi birikimiyle karakterizedir (12,13). NAFLD hastalarında özellikle yağ dokusundaki artmış lipoliz ve karaciğerde de novo yağ asidi sentezinin artması karaciğerde trigliserit birikimini arttırmaktadır (Şekil 1) (14).

Hem sağlıklı hem de non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı olan bireylerin karaciğerlerindeki trigliseritlerin yapısında en fazla bulunan yağ asitleri 16 karbonlu doymuş yağ asidi olan palmitat ve 18 karbonlu doymamış yağ asidi olan oleattır (3).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında yağ birikimini azaltmak için karaciğer lipid oksidasyonu ile kompanzasyona uğraşır (15). Mitokondriyal disfonksiyon, demir metabolizması bozuklukları, barsak-karaciğer uygunsuz yanıtı, insulin direnci, endotel disfonksiyonu ve endoplazmik retikulum stresi, reaktif oksijen türlerini ve pro-oksidanları arttırıp antioksidanların ise azalmasına yol açarak oksidatif stresin oluşumunda rol oynar (16).

Karaciğer hücreleri diğer sekretuvar hücreler gibi endoplazmik retikulumdan zengindir ve NAFLD'de endoplazmik retikulum stresi artar ve bu artış yağlanma, lipotoksisite, insülin direnci, inflamasyon ve apopitotik hücre ölümü ile ilişkilidir (17).



ApoB100: Apolipoprotein B100; **ER:** Endoplazmik retikulum; **VLDL:** Çok düşük dansiteli lipoprotein.

Şekil 1. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında karaciğerde yağlanma mekanizması (14)

Artmış yağ asidi düzeyleri ve lipotoksisite, insülin direnci, periferik yağ dokusu disfonksiyonu ve barsak kaynaklı endotoksinler NAFLD'de inflasmasyonun gelişiminde rol oynayan başlıca faktörlerdir. İnflamasyon özellikle basit karaciğer yağlanmasından non-

alkolik steatohepatit gelişimi için önemlidir ve ayrıca kronik inflamatuvar durum hepatoselüler karsinom gelişiminde rol oynabilir (18).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında kronik karaciğer hasarının defektif onarımına bağlı fibrozis gelişir. Esas olarak hepatik stellat hücre kaynaklı miyofibroblast birikimi ve fibrogenesis ile karakterizedir (19).

Görülme Sıklığı

Gelişmiş toplumlarda ve batı tarzı diyet ile beslenen kişilerde daha çok görülen NAFLD'nin görülme sıklığı dünya genelinde yaklaşık % 25'tir ve görülme sıklığı giderek artmaktadır (20). Bu hastalığın, Amerikan toplumundaki görülme sıklığı erkeklerde %30-40, kadınlarda ise %10-20 olarak tespit edilmiştir (20,21). NAFLD hastalığının görülme sıklığı obez kişilerde artmakla birlikte %75 civarında olduğu bildirilmektedir (22).

Klinik Bulgular ve Tanı

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalarının çoğu asemptomatiktir. Tanı genelde aşırı alkol tüketimi olmadığı durumlarda, karaciğer enzim yüksekliği ya da başka sebeple yapılan karaciğer görüntülemesiyle konmaktadır. NAFLD hastalarında halsizlik, yorgunluk ve üst kadranda rahatlıksızlık durumu mevcuttur, en sık yakınma sebepleri ise halsizliktir (23). Hastaların fizik muayenesinin çoğunda hepatomegaliye rastlanmaktadır (24).

Risk Faktörleri ve Diğer Hastalıklarla İlişkisi

Metabolik sendrom, obezite, tip 2 diyabet ve dislipidemi NAFLD için major risk faktörleri olarak bilinmektedir (20). Obezitede yaş ve diyabetten bağımsız olarak vücut kitle indeksi ile karaciğerdeki yağlanma derecesinin ilişkili olduğu gösterilmiştir (25,26). Aynı zamanda polikistik over sendromunun, hipotiroidinin, obstrüktif uyku apnesinin, hipopitüitarizmin, hipogonadismin ve pankreato-duodenal rezeksiyonun da NAFLD riskini arttırdığı bildirilmektedir (20).

İnsülin direncine bağlı olarak hem karaciğere serbest yağ asidi girişinde artış hem de karaciğerin çok düşük dansiteli lipoprotein sekresyonunda azalma olması nedeniyle hepatositler içerisinde yağ birikimi artar. NAFLD hastalarının büyük çoğunluğunda insülin direnci de bulunmaktadır. Karaciğer hastalığı ilerledikce, hepatosit hasarı ve fibrozis artacağından insülinin karaciğer tarafından yıkımı da azaldığından, hem hiperinsülinemi görülür hem de insülin direnci artar (26).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, sadece karaciğer ile sınırlı bir hastalık gibi görünse de aslında birçok ekstrahepatik organ ve düzenleyici yolağın etkilendiği multisistemik bir hastalıktır (2,21). NAFLD'de karaciğerden başka en çok etkilenen dokular kan damarları, kalp ve böbrektir.

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, aterojenik dislipidemi için bağımsız risk faktörüdür ve NAFLD'nin ateroskleroz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (2,6). NAFLD hastalarında en sık görülen ölüm nedeni karaciğer hastalıklarından çok kardiyovasküler hastalıklara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (27).

Tedavi

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalarında, yaşam değişikliklerinden bariatrik cerrahiye kadar farklı tedavi yaklaşımları bulunmakla birlikte ilk tedavi seçeneği olarak diyet ve egzersiz önerilmektedir (28). İnsülin duyarlılığını arttıran ilaçlar, vitamin E, pentoxifylline ve lipid düşürücü ilaçlar da tedavide kullanılabilmekle birlikte halen yeni ve güncel tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç vardır (1).

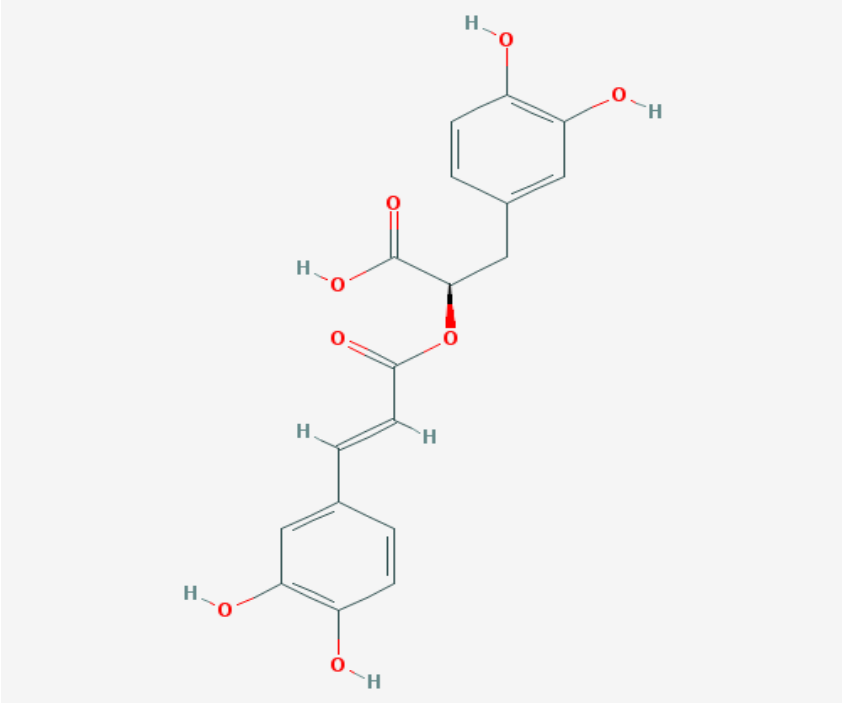
PALMİTATLA OLUŞTURULAN DENEYSEL NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI MODELİ

HepG2 hücreleri ticari olarak satılan insan kaynaklı karaciğer hepatoma hücreleridir. HepG2 hücreleri birçok yönden biyolojik olarak hepatositlere benzemektedir ve bu hücreler karaciğer protein sentezinin araştırılması için uygun hücrelerdir (29). NAFLD hastalığının araştırılmasında; palmitat ve oleik asit ile oluşturulan yağlanma modelleri kullanılmaktadır (4,30-33). Gomez-Lechon ve ark. (4), hem primer insan hepatositleri hem de HepG2 hücreleri kullanarak yaptığı çalışma sonucunda; HepG2 hücresinin deneysel yağlanma modellerinde primer insan hepatositleri ile benzer davranışlar gösterdiğini, HepG2 hücrelerinde palmitat ile oluşturulan yağlanma modelinin karaciğerde yağ birikimine bağlı karaciğer hücresindeki akut ve toksik etkilerin araştırılmasında, oleat ve palmitat karışımı (oleat/palmitat 2:1 oranında) ile oluşturulan yağlanma modelinin ise kronik karaciğer yağlanmasının etkilerinin araştırılmasında kullanılabilecek hücresel NAFLD modelleri olduğunu ve tek başına palmitat ile oluşturulan NAFLD modelinin daha sitotoksik olduğunu bildirilmiştir.

ROSMARİNİK ASİT

Rosmarinik asit, L-fenilalanin ve L-tirozin aminoasitlerinden sentezlenen kafeik asitin ve 3,4 dihidroksifenillaktik asitin esteri fenolik asittir (Şekil 2) (34). RA, birçok bitkide bulunan doğal bir madde olmakla birlikte biberiye, adaçayı ve perilla biftek otu en fazla oranda bulunduğu bitkilerdendir (5).

Rosmarinik asidin antioksidan, anti-mikrobiyal, anti-inflamatuvar, anti-kanser, hepatoprotektif ve kardiyoprotektif etkileri olduğu gösterilmiştir (35). Bununla birlikte RA'nın antitrombotik ve böbrek hücrelerini koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (36,37).



Şekil 2. Rosmarinik asidin kimyasal yapısı (38)

Ağız yoluyla alınan RA barsaklardan emilerek kan yoluyla esas olarak böbrek, akciğer, dalak, kalp ve karaciğer olmak üzere ayrıca beyin, deri, kas ve kemik dokulara da dağılır, karaciğer tarafından metabolize edilerek böbrekler yoluyla vücuttan atılır (35).

Rosmarinik asit reaktif oksijen ve nitrojen türlerini ve peroksinitriti temizleyerek antioksidan etki gösterir (35). Yapılan in vitro çalışmalarda RA antioksidan etkisinin quercetin ile kıyaslanabilecek düzeyde olduğu, HepG2 hücre hattında tert-butil hidroperoksit ile oluşturulan oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin olduğu (39) ve L02 hepatosit hücre hattında hidrojen peroksit ile oluşturulan hücre hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir (40).

Rosmarinik asit, lipoksijenazları ve siklooksijenazları inhibe ederek anti-inflamatuar etki gösterir. Ayrıca hücresel yollar ve pro-inflamatuar sitokinler üzerine güçlü bir inhibe edici etkiye sahiptir (41). RA'nın mevsimsel alerjik rinitte reaktif oksijen türlerini ve inflamatuvar yanıtı azaltarak etkili olduğu görülmüştür (42).

Rosmarinik asidin aynı zamanda gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi de vardır (43) ve kardiyoprotektif etkisi olduğuna dair deneysel çalışmalar da bulunmaktadır (35).

PARAOKSONAZLAR

İnsanlarda 7. kromozomda tanımlanabilen PON enzim ailesinin; PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç üyesi vardır. Bu üç proteinin aminoasit kalıntısı arasında en az %60 benzerlik bulunmaktadır. İlk olarak organofosfatlardan biri olan paraoksonun PON1 tarafından hidroliz edildiğinin saptanması nedeniyle bu enzim ailesine PON adı verilmiştir. PON enzimleri organofosfat hidrolizi yaptıkları için A tipi esterazlardır (44, 45).

PON1 ve PON3 enzimleri karaciğer ve böbrekte sentezlenirken, PON2 enzimi ise neredeyse tüm dokularda sentezlenmektedir ve tüm PON enzimleri en fazla miktarda karaciğerde sentezlenmektedir. PON2 enzimi hücre içi bir enzim iken, PON1 ve PON3 dolaşıma geçerek HDL yapısında taşınmaktadır. PON enzimlerinin tümü antioksidan özelliktedir, inflamasyona karşı savaşırlar ve anti-aterojenik özellik gösterdikleri gösterilmiştir (7). Bu açıdan dolaşımda HDL yapısında bulunan PON1 ve PON3'ün HDL'nin antioksidan ve anti-aterojenik etkilerinden sorumlu enzimlerdendir. PON1 dolaşımda HDL, LDL ve makrofajları oksidasyondan korur, lipid peroksidasyonunu engeller (46). PON3 enziminin de okside LDL oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. (47).

Paraoksonaz 1 ve PON3 enzimleri birçok yönden ortak özelliklere sahip olsa da farklı aktivitelere sahiptirler. PON1 enzimi paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi gösterirken, PON3 enziminin ise arilesteraz aktivitesi çok düşük düzeyde ve paraoksonaz aktivitesi ise yoktur. Bununla birlikte tüm PON enzimlerinin birer laktonaz olduğu da gösterilmiştir (48). PON1 ve PON3 enzimleri arasındaki bir diğer farklılık da gen ve protein ekspresyonlarının düzenlenmesindeki farklılıklardır. PON1 enzimi okside lipidler tarafından düzenlenirken, PON3 enziminin ise düzenlenmediği gösterilmiştir (47). Aynı zamanda farklı farmakolojik maddeler tarafından gen ve protein ekspresyonlarının farklı şekilde düzenlendiği de gösterilmiştir (49).

Ateroskleroz ve koroner kalp hastalıkları başta olmak üzere diabetes mellitus ve komplikasyonları, karaciğer hastalıkları, inflamatuvar barsak hastalıkları, metabolik sendrom, obezite, kanser ve yaşlanma gibi birçok önemli hastalıkla PON enzimleri arasında ilişkisi bulunmuştur (50).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 29.03.2017 tarihinde TÜTF-BAEK 2017/95 protokol kodu ve 06/05 karar no ile onaylandı (Ek 1). Trigliserit ölçümleri için Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Merkez Laboratuvarı Biyokimya Birimi'nden hizmet satın alındı. Western blotting yönteminde kemilüminesans görüntüleme, Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet satın alınarak yapıldı. Diğer tüm deneyler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yapıldı.

DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Eagle'ın minimum esansiyel mediumu fenol red içeren (Wisent)

Eagle'ın minimum esansiyel mediumu fenol red içermeyen (Wisent)

Fetal Sığır Serumu (Thermo)

Antibiyotik-Antimikotik (Thermo)

% 0.25 Tripsin-EDTA solüsyonu (Thermo)

RA (Sigma)

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

Tuzlu fosfat tamponu (PBS) tablet (Thermo)

Dimetil sülfoksit (Sigma)

Glisin (Sigma)

Sodyum klorür (Sigma)

Sodyum hidroksit (Sigma)

Sodyum palmitat (Sigma)

Sığır serum albumini-yağ asidi içermeyen (GoldBio)

Radyoimmünopresipitasyon lizis tamponu (Santa Cruz)

Triton X-100 (Sigma)

Proteaz inhibitör kokteyli (Sigma)

Bakır sülfat (Sigma)

Folin ayıracı (Merck)

Oil Red O (Sigma)

Paraformaldehit (Sigma)

İsopropanol (Honeywell)

Akrilamid (Merck)

N,N-Metilenbis-akrilamid (Merck)

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

2-merkaptoetanol (Sigma)

Amonyum persülfat (Sigma)

Sodyum dodesil sülfat (Sigma)

Bromofenol blue (Merck)

Gliserol (Sigma)

Tween 20 (Sigma)

Trizma Base (Sigma)

Yağsız süt tozu (Sigma)

Metanol (Merck)

Pre-stained Protein Standard (Thermo)

Magicmark XP Western Protein Standard (Thermo)

Poliviniliden diflorid membran (Bio-Rad)

PON1 primer antikoru (Abcam)

PON3 primer antikoru (Abcam)

Sekonder antikor (Abcam)

Kemilüminesans substrat (Thermo)

ANALİZLERDE KULLANILAN CİHAZLAR VE SARF MALZEMELER

Biyogüvenlik kabini (Thermo Scientific Safe 2020)

Karbondioksitli inkübatör (Thermo Scientific Forma Steri-cycle 371)

Faz kontrast invert mikroskop (Olympus CKX 53)

Sıvı azot tankı (Air Liquide GT21)

Mikrobiyolojik inkübatör (Thermo Scientific Heratherm IMC-18)

Santrifüjler (DLAB DM0412), (Nüve NF048), (Heraeus multifuge 3 S-R)

Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Daihan Scientific WiseStir)

Homojenizatör (Next Advance Bullet Blender Storm)

Mikroplaka okuyucu (Biotek µQuant)

Dikey elektroforez sistemi (Cleaver Scientific Omnipage Mini Vertical System)

Western blotting sistemi (Cleaver Scientific Semi Dry Blotter)

Güç kaynağı (Cleaver Scientific)

Çalkalayıcı (Cleaver Scientific CW23)

-80 °C derin dondurucu (Heraeus HERAfreeze)

Biyokimya otoanalizörü (Beckman Coulter AU5800)

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

Mikroskop görüntü yansıtıcı (Isolab 613.31.001)

Hassas terazi (Sartorius)

Vorteks (VELP)

pH metre (Inolab)

Su banyosu (GFL 1083)

Otomatik pipetler (Eppendorf)

75 cm^2 flask (Nest)

25 cm^2 flask (Nest)

6 kuyucuklu plaka (SPL)

96 kuyucuklu plaka (SPL)

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

Steril otomatik pipet uçları (Isolab)

Steril şırınga filtre (Biosorfa)

Hücre kazıyıcı (Biosorfa)

Steril santrifüj tüpü 15 ve 50 ml (Isolab)

Beher (Isolab)

Balon joje (Isolab)

Mezür (Isolab)

TEMEL HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI

Bu çalışmada kullanılan HepG2 hücreleri Doktor Öğretim Üyesi Gülben Sayılan Özgün tarafından temin edildi. Hücreler ticari satıcısı olan American Type Culture Collection tarafından da önerilen koşullar olan %10 fetal sığır serumu içeren Eagle'ın minimum esansiyel mediumu ile %5 CO_2'li ortamda 37°C'de inkübatörde yaşatıldı (51). Ayrıca hücrelerin mediumuna mikroorganizmaların üremesini engellemek için %1 antibiyotik-antimikotik eklendi. Hücrelere tüm uygulamalar yatay hava akışlı biyogüvenlik kabini içerisinde yapıldı. Deneylerde 10-20 hücre pasajları kullanıldı. Hücreler 75 cm^2 flasklarda çoğaltıldı. Hücrelerin haftada iki kez mediumu değiştirildi ve %90 hücre yoğunluğuna ulaşıldığında 1:4 veya 1:6 oranında pasajlandı.

ROSMARİNİK ASİTİN HEPG2 HÜCRELERİNDE HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ

Rosmarinik asitin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi MTT testi ile gösterildi (52,53). 96 kuyucuklu plakalara 10^4 hücre ekildi. RA mediumda çözüldü ve hücreler 24 saat boyunca 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 µM konsantrasyonlarda RA ile inkübe edildi. 24 saat sonra medium alınarak yerine 10 µl PBS içerisinde çözülmüş MTT (5 mg/mL) ve 100 µl fenol red içermeyen Eagle'ın minimum esansiyel mediumu konuldu ve 4 saat inkübe edildi. MTT içeren medyum alınarak oluşan formazan 200 µl dimetil sülfoksit 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. Ölçülen absorbanslar aynı plakadaki kontrol grubunun ortalamasına bölünürek, sonuçlar kontrol grubunun yüzdesi olarak verildi.

PALMİTAT İLE HEPG2 HÜCRELERİNDE YAĞLANMA OLUŞTURULMASI

Yağlanma oluşturmak için HepG2 hücreleri 1 mM palmitat ile 24 saat inkübe edildi. (4,54-56). Sodyum palmitat steril su ile 70 °C'de çözüldü (32,57) ve insan serum konsantrasyonları ile benzer konsanstrasyonda, mediumda çözülmüş, 0.7 mM yağ asidi içermeyen sığır serum albumini ile en az 3 saat konjuge edilerek (31) hücrelere 24 saat süreyle uygulandı. Kontrol grubuna ise sadece 0.7 mM albumin içeren medium uygulandı.

PALMİTAT İLE YAĞLANMA OLUŞTURULAN HEPG2 HÜCRELERİNDE ROSMARİNİK ASİTİN HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulandığında kontrol grubuna göre %80 ve üzeri hücre canlılığının görüldüğü 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 μM RA konsantrasyonları 1 mM palmitat ile aynı anda hücrelere uygulandı. RA'nın palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde, hücre canliliğina etkisi yukarıda anlatıldığı şekilde MTT hücre canlılık testi ile gösterildi (52,53).

ROSMARİNİK ASİTİN HÜCRE İÇİ YAĞLANMAYA ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

Trigliserit Ölçümü

Trigliserit ölçümleri için hücreler 25 cm^2 flasklara ekildi. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulandığında kontrol grubuna göre %80 ve üzeri hücre canlılığının görüldüğü 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 μM RA konsantrasyonları 1 mM palmitat ile aynı anda hücrelere 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 trigliserit düzeyleri otoanalizörün orijinal kitleri kullanılarak ölçüldü. Lowry ve ark. (58) yöntemine göre protein ölçümü yapılarak sonuçlar proteine oranlandı ve kontrol grubunun ortalamasına oranlanarak kontrol grubunun katı olarak verildi.

Oil Red O Boyama

Oil Red O ile boyama için hücreler 6 kuyucuklu plakalara ekildi. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulandığında kontrol grubuna göre %80 ve üzeri hücre canlılığının görüldüğü 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 μM RA konsantrasyonları 1 mM palmitat ile aynı anda hücrelere uygulandı. 24 saat sonunda hücreler PBS ile yıkandı, %10 paraformaldehit ile fikse edildi. Fiksasyon sonrası %60 isopropanol ile yıkanıp %60 isopropanol içeren oil red O (stok %0.35 (w/v) oil red O %100 isopropanolda çözünen) ile inkübe edildi ve distile su ile yıkanarak faz kontrast invert mikroskobu altında mikroskop görüntü yansıtıcı kullanılarak fotoğraflandı (56).

ROSMARİNİK ASİTİN HEM UYGULAMA YAPILMAMIŞ HEM DE PALMİTAT İLE YAĞLANMA OLUŞTURULAN HEPG2 HÜCRELERİNDE PARAOKSONAZ-1 VE PARAOKSONAZ-3 PROTEİN EKSPRESYONUNA ETKİLERİNİN GÖSTERİLMESİ

Palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde, hücre canlılığının azalmasını ve hücre içi trigliserit düzeylerinin artışını en fazla önleyen 100 ve 200 μM RA konsantrasyonlarının hem yağlanma oluşturarak hem de yağlanma oluşturmadan PON1 ve PON3 protein ekspresyonlarına etkileri incelendi. Protein ekspresyonu deneyleri için hücreler 75 cm^2 flasklara ekildi. Deneysel prosedür sonrası PBS ile yıkanan hücreler, ticari radyoimmünopresipitasyon lizis tamponu ile birlikte verilen proteaz inhibitör kokteyli, fenil metil sulfonil florid ve sodyum ortovanadat çözeltilerinden %1 içeren radyoimmünopresipitasyon lizis tamponu ile kazındı. Cam bilyeler kullanılarak homojenize edildikten sonra homojenat 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısımdaki süpernatant deneylerde kullanıldı. Protein ölçümü Lowry ve ark.(58) yöntemine göre yapıldı. Laemmli yöntemine (59) göre %4-12 poliakrilamid jel hazırlanarak, 20 μg protein dikey sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıldı. Jeller yarı ıslak aktarım sistemi ile poliviniliden diflorid membrana aktarıldı. Membranlar %5 süt tozu ile 1 saat bloklandı, primer antikorlar (PON1 ve PON3 için 1:1000, Tübülin 1:10000 dilüsyon) ile gece boyu 4 °C'de inkübe edildi. Ardından 1 saat sekonder antikor (1:10000 dilüsyon) ile inkübe edilen antikorlar, kemilüminesans substrat kullanılarak görüntülendi. Her bir protein için band yoğunluğu Image J programı kullanılarak hesaplandı (60). PON1 ve PON3 proteinleri aynı numunenin yükleme kontrolü olarak kullanılan tübülin protein düzeyine oranlandı ve sonuçlar aynı membrandaki kontrole oranlanarak kontrolün katı olarak verildi.

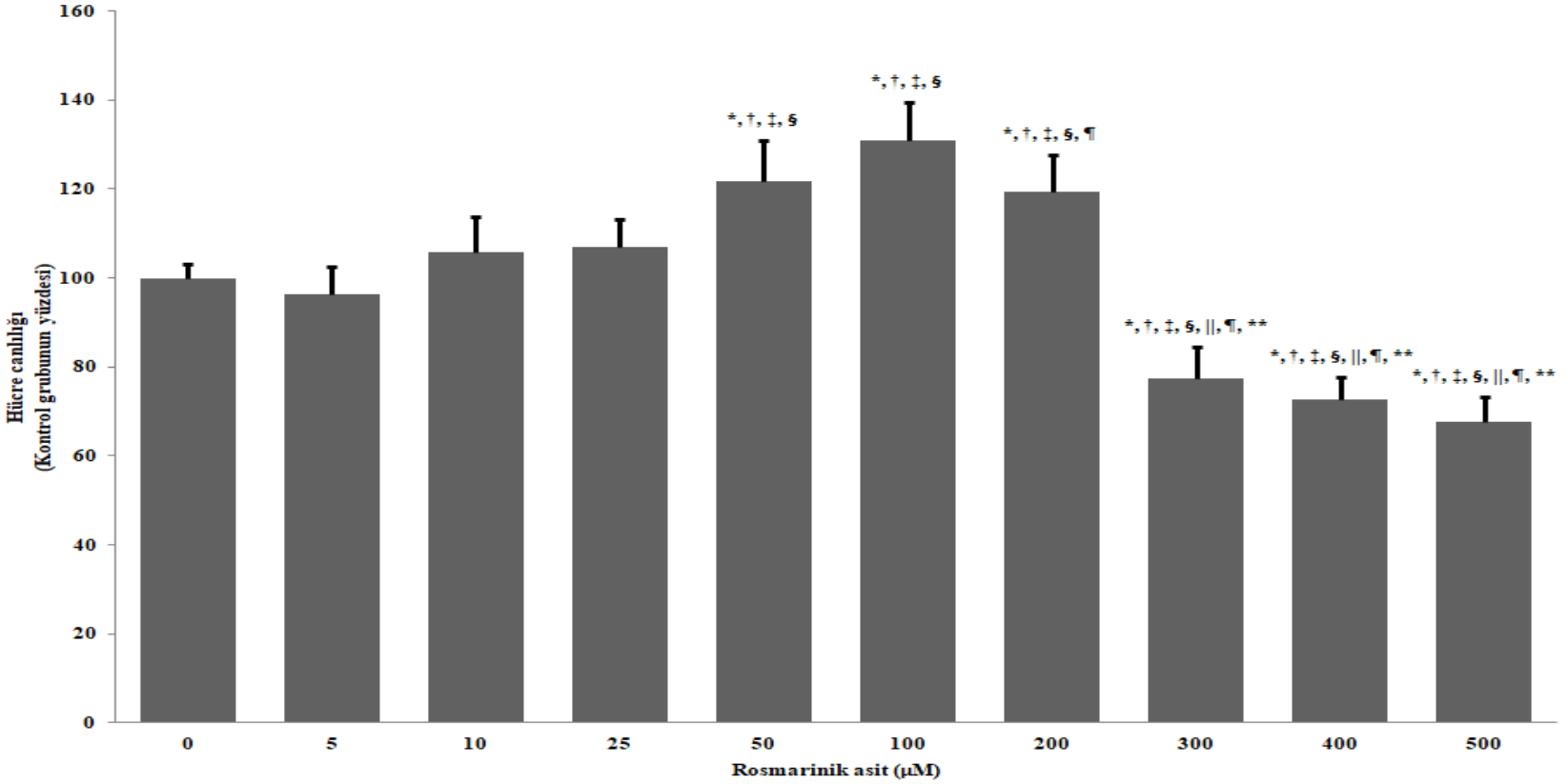
İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel analizler SPSS 20 programı (Lisans no: 10240642) kullanılarak gerçekleştirildi. Deney parametrelerinin karşılaştırılması için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey ve Tamhane testleri kullanıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma (Ort±SS) olarak ifade edildi ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Rosmarinik asidin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi Şekil 3'de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle RA uygulanması sonrası hücre canlılıkları; kontrol grubunda %100±3, 5 μM RA uygulanan hücrelerde %96±6, 10 μM RA uygulanan hücrelerde %106±8, 25 μM RA uygulanan hücrelerde %107±6, 50 μM RA uygulanan hücrelerde %122±9, 100 μM RA uygulanan hücrelerde %131±8, 200 μM RA uygulanan hücrelerde %119±8, 300 μM RA uygulanan hücrelerde %77±7, 400 μM RA uygulanan hücrelerde %73±5 ve 500 μM RA uygulanan hücrelerde %68±6 bulundu.

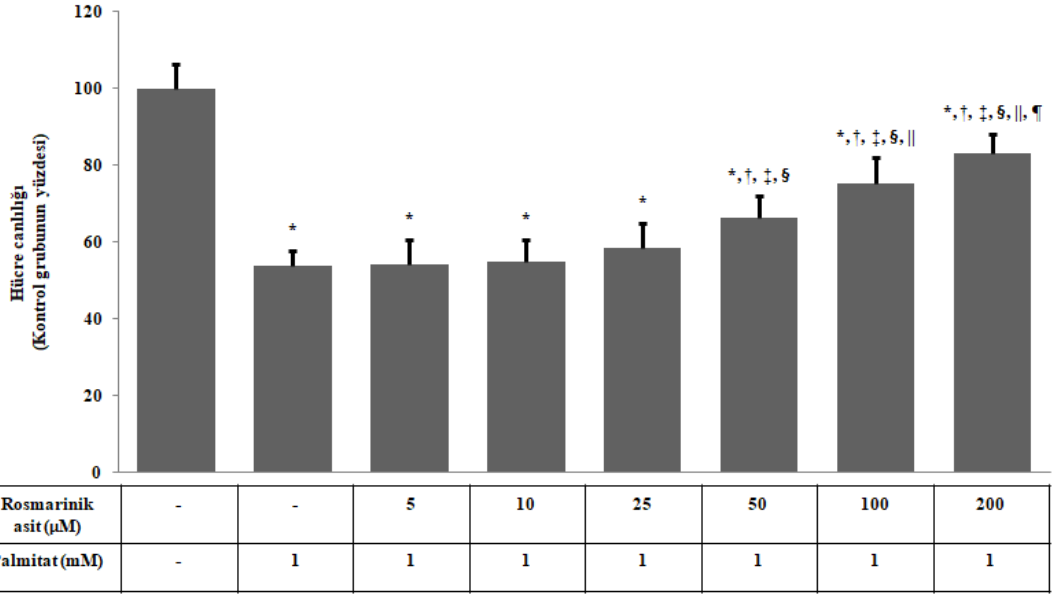
5, 10 ve 25 μM RA hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak değiştirmedi (tümü için $p>0.05$). 50, 100 ve 200 μM RA hücre canlılığını kontrole, 5, 10 ve 25 μM RA'ya göre anlamlı olarak arttırdı (tümü için $p<0.05$). 200 μM RA hücre canlılığını 100 μM RA göre anlamlı olarak azalttı ($p<0.05$). 300, 400 ve 500 μM RA hücre canlılığını kontrole, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 μM RA'ya göre anlamlı olarak azalttı (tümü için $p<0.05$).



Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edildi (n=8).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
†: 5 µM rosmarinik asit ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
‡: 10 µM rosmarinik asit ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
§: 25 µM rosmarinik asit ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
||: 50 µM rosmarinik asit ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
¶: 100 µM rosmarinik asit ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
**: 200 µM rosmarinik asit ile karşılaştırıldığında $p<0.05$

Şekil 3. Rosmarinik asidin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi

Palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde RA'nın hücre canlılığına etkisi Şekil 4'de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası hücre canlılıkları; kontrol grubunda %100±6, sadece 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde %54±4; 1 mM palmitat ile birlikte 5 µM RA uygulanan hücrelerde %54±6, 10 µM RA uygulanan hücrelerde %55±6, 25 µM RA uygulanan hücrelerde %59±6, 50 µM RA uygulanan hücrelerde %66±6, 100 µM RA uygulanan hücrelerde %75±7 ve 200 µM RA uygulanan hücrelerde %83±5 bulundu.



Rosmarinik asit (µM)	-	-	5	10	25	50	100	200
Palmitat (mM)	-	1	1	1	1	1	1	1

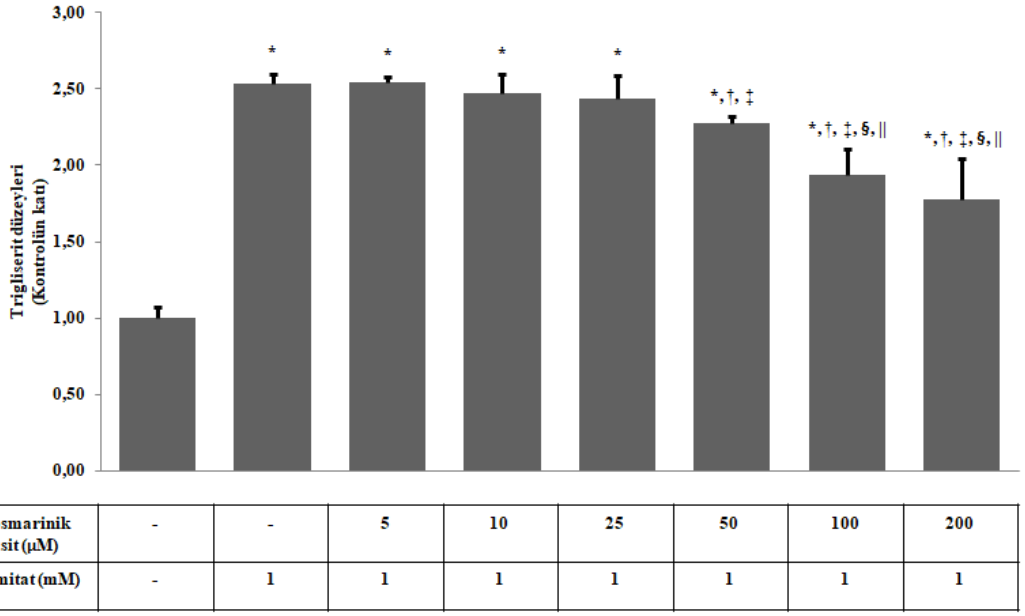
Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edildi (n=8).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
†: 1 mM palmitat ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
‡: 1 mM palmitat + 5 µM rosmarinik asit ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
§: 1 mM palmitat + 10 µM rosmarinik asit ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
||: 1 mM palmitat + 25 µM rosmarinik asit ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
¶: 1 mM palmitat + 50 µM rosmarinik asit ile karşılaştırıldığında $p<0.05$

Şekil 4. Palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde rosmarinik asidin hücre canlılığına etkisi

1 mM palmitat uygulanan tüm hücrelerde hücre canlılığı kontrole göre anlamlı olarak azaldı (tümü için $p<0.05$). 1 mM palmitat ile birlikte 50 µM RA uygulaması, hücre canlılığını sadece 1 mM palmitat ve 1 mM palmitat ile birlikte 5 ve 10 µM RA uygulamalarına göre anlamlı olarak arttırdı (tümü için $p<0.05$). 1 mM palmitat ile birlikte 100 µM RA uygulaması, hücre canlılığını sadece 1 mM palmitat ve 1 mM palmitat ile birlikte 5, 10 ve 25 µM RA uygulamalarına göre anlamlı olarak arttırdı (tümü için $p<0.05$). 1 mM palmitat ile birlikte 200

µM RA uygulaması, hücre canlılığını sadece 1 mM palmitat ve 1 mM palmitat ile birlikte 5, 10, 25 ve 50 µM RA uygulamalarına göre anlamlı olarak arttırdı (tümü için $p<0.05$).

Palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde RA'nın trigliserit düzeylerine etkisi Şekil 5'de görülmektedir ve sonuçlar kontrol grubunun ortalamasına oranlanarak kontrolün katı şeklinde verildi. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası düzeyleri; kontrol grubunda 1.00±0.07, sadece 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde 2.54±0.06; 1 mM palmitat ile birlikte 5 µM RA uygulanan hücrelerde 2.55±0.04, 10 µM RA uygulanan hücrelerde 2.47±0.12, 25 µM RA uygulanan hücrelerde 2.44±0.15, 50 µM RA uygulanan hücrelerde 2.27±0.05, 100 µM RA uygulanan hücrelerde 1.94±0.17 ve 200 µM RA uygulanan hücrelerde 1.77±0.27 bulundu.



Rosmarinik asit (µM)	-	-	5	10	25	50	100	200
Palmitat (mM)	-	1	1	1	1	1	1	1

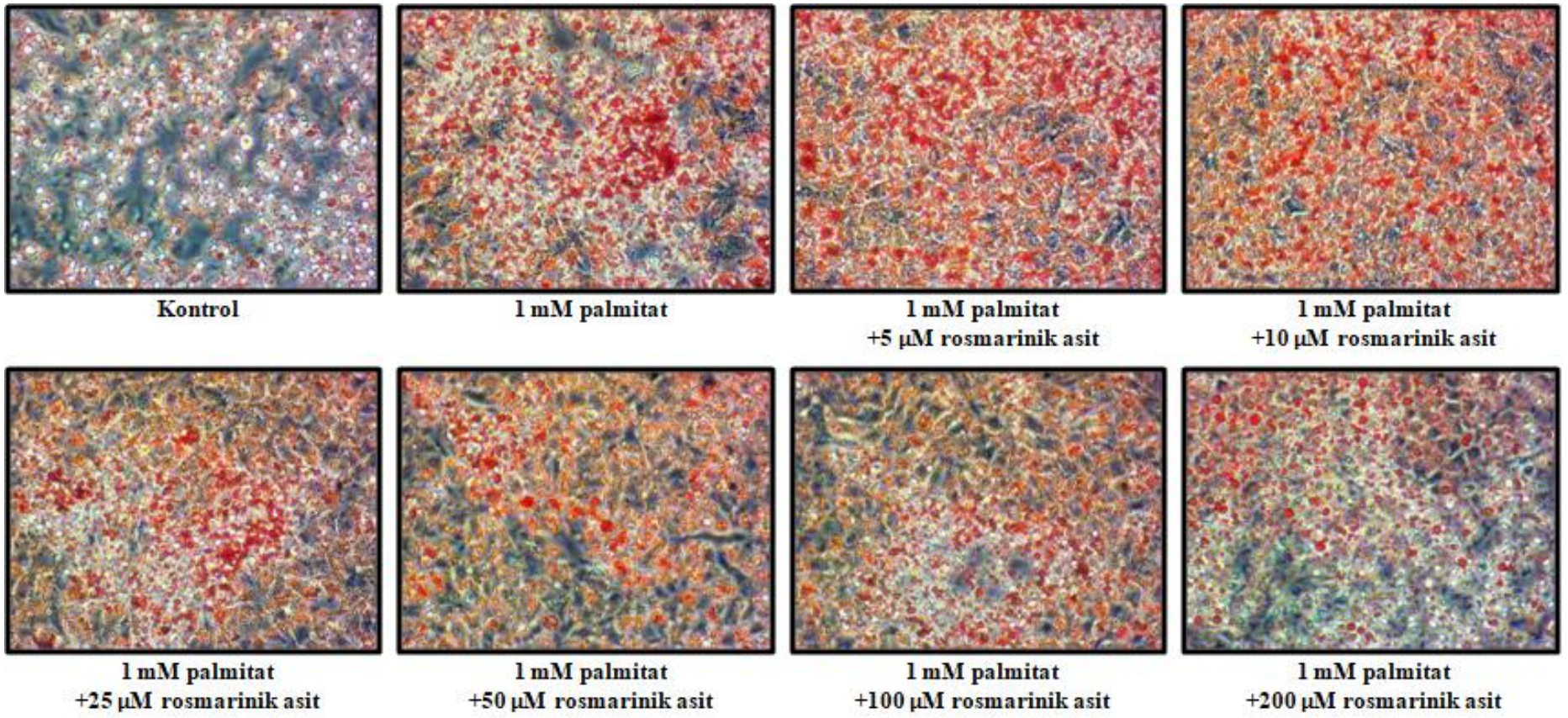
Her grupta 3 bağımsız deneyden 6 farklı sonuç ortalama±standart sapma olarak ifade edildi.
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tamhane testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
†: 1 mM palmitat ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
‡: 1 mM palmitat + 5 µM rosmarinik asit ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
§: 1 mM palmitat + 10 µM rosmarinik asit ile karşılaştırıldığında $p<0.05$
||: 1 mM palmitat + 25 µM rosmarinik asit ile karşılaştırıldığında $p<0.05$

Şekil 5. Palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde rosmarinik asidin trigliserit düzeylerine etkisi

1 mM palmitat uygulanan tüm hücrelerde trigliserit düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak arttı (tümü için $p<0.05$). 1 mM palmitat ile birlikte 50 µM RA uygulaması, trigliserit düzeylerini sadece 1 mM palmitat ve 1 mM palmitat ile birlikte 5 µM RA uygulamalarına göre anlamlı olarak azalttı (her ikisi için $p<0.05$). 1 mM palmitat ile birlikte 100 µM RA

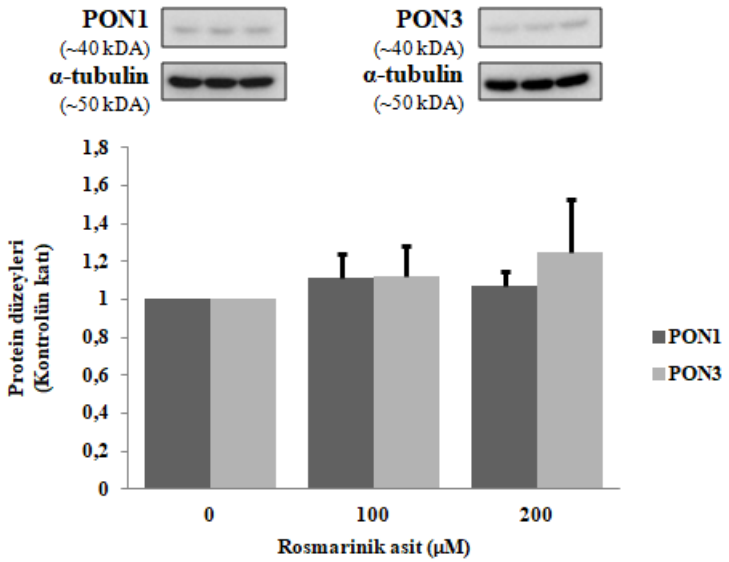
uygulaması, trigliserit düzeylerini sadece 1 mM palmitat ve 1 mM palmitat ile birlikte 5, 10 ve 25 μM RA uygulamalarına göre anlamlı olarak azalttı (tümü için $p<0.05$). 1 mM palmitat ile birlikte 200 μM RA uygulaması, trigliserit düzeylerini sadece 1 mM palmitat ve 1 mM palmitat ile birlikte 5, 10 ve 25 μM RA uygulamalarına göre anlamlı olarak azalttı (tümü için $p<0.05$).

Palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde RA'nın yağlanma üzerine etkisi mikroskopik olarak oil red O boyama ile incelendi ve mikroskopi resimleri Şekil 6'da görülmektedir. 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde oil red O ile boyanma kontrole göre fazla olduğu görüldü. 1 mM palmitat ile birlikte uygulanan RA konsantrasyonlarının oil red O ile boyanmayı azalttığı ve bu azalmanın özellikle yüksek konsantrasyonlarda daha belirgin olduğu görüldü.



Şekil 6. Palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde rosmarinik asidin yağlanma üzerine etkisi (Oil Red O boyama, 400X büyütme)

Rosmarinik asidin HepG2 hücrelerinde PON1 ve PON3 düzeylerine etkisi Şekil 7'de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası PON1 protein düzeyleri; 100 µM RA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.11±0.13 katı, 200 µM RA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.07±0.07 katı olarak bulundu. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası PON3 protein düzeyleri; 100 µM RA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.12±0.16 katı, 200 µM RA uygulanan hücrelerde ise kontrolün 1.25±0.28 katı olarak bulundu. 100 µM ve 200 µM RA uygulanan ve kontrol hücreleri arasında PON1 ve PON3 düzeyleri açısından anlamlı fark yoktu (tümü için p>0.05).



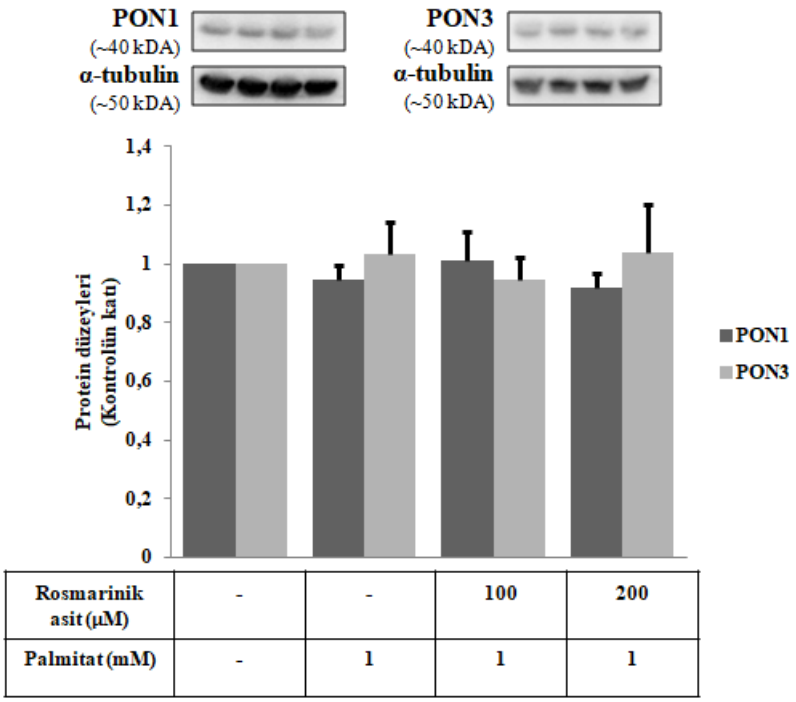
Her grupta 4 bağımsız deneyden 4 farklı sonuç ortalama±standart sapma olarak ifade edildi.
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi kullanıldı (p>0.05).

PON: Paraoksonaz.

Şekil 7. Rosmarinik asidin HepG2 hücrelerinde paraoksonaz 1 ve 3 düzeylerine etkisi

Palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde rosmarinik asidin PON1 ve PON3 protein düzeylerine etkisi Şekil 8'de görülmektedir. PON1 düzeyleri, sadece 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrolün 0.94±0.05 katı; 1 mM palmitat ile birlikte 100 µM RA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.01±0.10 katı ve 200 µM RA uygulanan hücrelerde kontrolün 0.92±0.05 katı bulundu. PON3 düzeyleri ise, sadece 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrolün 1.03±0.11 katı; 1 mM palmitat ile birlikte 100 µM RA uygulanan hücrelerde kontrolün 0.95±0.08 katı ve 200 µM RA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.04±0.17 katı bulundu. 1 mM palmitat, 1 mM palmitat ile birlikte 100 µM ve 200 µM RA

uygulanan ve kontrol hücreleri arasında PON1 ve PON3 protein düzeyleri açısından anlamlı fark yoktu (tümü için p>0.05).



Her grupta 4 bağımsız deneyden 4 farklı sonuç ortalama±standart sapma olarak ifade edildi.
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi kullanıldı (p>0.05).

PON: Paraoksonaz.

Şekil 8. Palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde rosmarinik asidin paraoksonaz 1 ve 3 düzeylerine etkisi

Çalışmada elde edilen tüm hücre canlılığı, trigliserit düzeyleri, PON1 protein düzeyi ve PON3 protein düzeyi sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada elde edilen tüm sonuçlar

			KONTROL	5 µM RA	10 µM RA	25 µM RA	50 µM RA	100 µM RA	200 µM RA	300 µM RA	400 µM RA	500 µM RA
HÜCRE CANLILIĞI (% KONTROL)	RA'nın hücre canlılığına etkisi	1	95,46	84,61	93,44	95,71	106,98	115,64	111,80	64,85	67,58	59,71
		2	96,22	90,33	99,83	101,60	114,38	125,06	112,00	71,27	68,13	61,14
		3	98,07	94,95	104,12	106,81	118,92	127,25	114,19	75,24	68,47	62,83
		4	100,08	95,54	105,72	107,15	121,36	129,02	114,94	77,90	70,25	68,71
		5	100,76	97,31	106,64	108,16	123,13	133,56	116,78	78,86	72,64	69,55
		6	102,02	100,00	106,98	108,58	123,72	135,07	120,82	81,59	76,60	70,23
		7	103,20	102,19	109,92	110,26	129,18	139,95	129,63	82,96	78,65	73,51
		8	104,21	104,63	120,52	117,07	137,17	141,55	134,14	87,13	80,09	75,02

		KONTROL	1 mM palmitat	1 mM palmitat + 5 µM RA	1 mM palmitat + 10 µM RA	1 mM palmitat + 25 µM RA	1 mM palmitat + 50 µM RA	1 mM palmitat + 100 µM RA	1 mM palmitat + 200 µM RA
RA'nın palmitat ile yağlanmada hücre canlılığına	1	89,60	47,99	46,59	48,37	48,12	60,24	64,45	72,11
	2	93,43	50,41	48,12	48,88	52,33	61,39	70,45	79,77
	3	98,53	51,56	48,37	49,65	54,88	62,67	71,22	82,32
	4	100,06	52,84	52,46	55,26	59,35	64,84	74,41	82,71
	5	100,32	55,78	54,50	56,80	60,11	65,35	75,05	85,39
	6	102,74	56,67	59,99	57,31	61,39	67,52	79,26	86,28
	7	106,06	57,31	60,11	61,01	65,35	72,24	81,94	86,92
	8	109,25	58,97	63,94	63,31	66,75	76,83	85,26	88,07

TRİGLİSERİT DÜZEYLERİ (KONTROLÜN KATI)		KONTROL	1 mM palmitat	1 mM palmitat + 5 µM RA	1 mM palmitat + 10 µM RA	1 mM palmitat + 25 µM RA	1 mM palmitat + 50 µM RA	1 mM palmitat + 100 µM RA	1 mM palmitat + 200 µM RA
	1	0,93	2,51	2,58	2,34	2,34	2,20	2,05	1,41
	2	0,93	2,45	2,58	2,40	2,29	2,25	2,11	1,46
	3	0,98	2,51	2,52	2,60	2,29	2,25	2,11	1,89
	4	1,04	2,54	2,55	2,65	2,53	2,33	1,76	1,89
	5	1,04	2,60	2,49	2,39	2,59	2,27	1,76	1,94
	6	1,10	2,60	2,55	2,45	2,59	2,33	1,86	2,05

PON1 PROTEİN DÜZEYİ (KONTROLÜN KATI)		KONTROL	100 µM RA	200 µM RA
RA'nın etkisi	1	1,00	0,94	1,17
	2	1,00	1,18	1,00
	3	1,00	1,23	1,04
	4	1,00	1,10	1,08

		KONTROL	1 mM palmitat	1 mM palmitat + 100 µM RA	1 mM palmitat + 200 µM RA
RA'nın palmitat ile yağlanmada etkisi	1	1,00	0,89	0,91	0,86
	2	1,00	0,95	0,99	0,96
	3	1,00	1,01	1,15	0,95
	4	1,00	0,93	0,99	0,91

PON3 PROTEİN DÜZEYİ (KONTROLÜN KATI)		KONTROL	100 µM RA	200 µM RA
RA'nın etkisi	1	1,00	1,08	0,93
	2	1,00	1,29	1,53
	3	1,00	0,91	1,10
	4	1,00	1,20	1,44

		KONTROL	1 mM palmitat	1 mM palmitat + 100 µM RA	1 mM palmitat + 200 µM RA
RA'nın palmitat ile yağlanmada etkisi	1	1,00	1,07	0,93	0,97
	2	1,00	1,09	1,05	0,86
	3	1,00	1,11	0,87	1,25
	4	1,00	0,87	0,93	1,06

RA: Rosmarinik asit; **PON:** Paraoksonaz.

TARTIŞMA

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, tüm dünyada yaklaşık olarak dört kişiden birinde görülen ve sıklığı gittikçe artan önemli bir sağlık sorunudur (20). NAFLD, sadece karaciğer ile sınırlı bir hastalık gibi görünse de aslında birçok ekstrahepatik organ ve düzenleyici yolağın etkilendiği multisistemik bir hastalıktır ve metabolik sendrom ile ilişkilidir. NAFLD; diabetes mellitus, kalp ve böbrek hastalıkları riskini arttırır (2,21). Aynı zamanda NAFLD, aterojenik dislipidemi için bağımsız risk faktörüdür ve ateroskleroz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (2,6).

Hem Dünya Gastroentroloji Örgütü hem de Amerikan Gastroenteroloji Derneği; NAFLD kılavuzlarında, tedavide ilk önce diyet ve egzersizi önermekle birlikte antioksidan tedavinin, özellikle E vitamininin de bu hastalarda tedaviye eklenebileceğini bildirmektedir (28,1). RA, antioksidan etkileri olduğu gösterilmiş bitkisel kaynaklı bir polifenoldür. Membran stabilizasyonu ve oksidatif hasara karşı koruma sağlar ve serbest radikalleri temizler (61).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalarında en sık görülen ölüm nedeni karaciğer hastalıklarından çok kardiyovasküler hastalıklara bağlı olarak görülmektedir. Hem NAFLD ve hem de kardiyovasküler hastalık patogenezinde oksidatif stresin rol oynaması antioksidan sistemleri gündeme getirmektedir (27). PON1 ve PON3 enzimleri esas olarak karaciğerde sentezlenen antioksidan enzimlerdir. Bu enzimler dolaşımda HDL'nin yapısında yer alarak ateroskleroz gelişiminin önlenmesinde görev alırlar (7).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında hepatositlerin içine trigliserit infiltrasyonu artmaktadır (2). 16 karbonlu doymuş bir yağ asidi olan palmitat hem sağlıklı bireylerde hem

de NAFLD hastalarının karaciğerlerindeki trigliseritlerin yapısında en fazla bulunan yağ asitlerindendir (3). HepG2 hücreleri ticari olarak satılan insan kaynaklı karaciğer hepatoma hücreleridir ve hepatositlere birçok biyolojik özellikleri benzedikleri için, bu hücreler karaciğer protein sentezinin araştırılması için uygun hücrelerdir (29). Gomez-Lechon ve ark. (4), hem primer insan hepatositleri hem de HepG2 hücreleri ile yaptığı çalışmada, HepG2 hücresinin deneysel yağlanma modellerinde primer insan hepatositleri ile benzer davranışlar gösterdiğini ve HepG2 hücrelerinde palmitat ile yağlanma modelinin, karaciğerde yağ birikimine bağlı karaciğer hücresindeki akut ve toksik etkilerin araştırılmasında kullanılabilecek hücresel NAFLD modeli olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmanın amacı palmitat ile hücresel NAFLD modeli oluşturulan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde RA'nın, hücre canlılığına, yağlanmaya, PON1 ve PON3 protein düzeylerine etkisini araştırmaktır.

Rosmarinik asidin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi ile ilgili literatürde çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Adomako-Bonsu ve ark. (38), HepG2 hücrelerine 5 saat süreyle uygulanan RA'nın 700 μM'a kadar toksik olmadığını ve 2800 μM konsantrayonda %25 toksisiteye neden olduğunu, Wu ve ark. (62), HepG2 hücrelerine 24 veya 48 saat süreyle uygulanan 160 μM RA'nın toksik olmadığını bildirmişlerdir. Diğer yandan Ma ve ark. (63), HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan yaklaşık 35 μM RA'nın hücre canlılığını azalttığını bildirmişlerdir. Bu sebeple çalışmamızda öncelikle 500 μM'a kadar RA konsantrasyonları 0.7 mM sığır serum albumini içeren medium içinde HepG2 hücrelerine 24 saat boyunca uygulanarak RA'nın hücre canlılığı üzerine etkisi araştırıldı. 50, 100 ve 200 μM RA HepG2 hücrelerinde hücre canlılığını anlamlı olarak arttırırken, 300 μM ve üzeri RA konsantrasyonları hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı ve bu sebeple palmitat ile yağlanmaya karşı 200 μM'a kadar RA konsantrasyonları uygulandı.

HepG2 hücrelerinde palmitat ile oluşturulan hücresel NAFLD modelinde hücre canlılığının azaldığı, hücre içi yağlanmanın ise arttığı bilinmektedir. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak palmitat uygulması hücre canlılığını anlamlı olarak azaltırken, hücre içi trigliserit düzeyini ise anlamlı olarak arttırdı ve palmitat uygulamasının hücre içi lipid içeriğini arttırdığı mikroskopik olarak da görüldü. Bu bulgularımız HepG2 hücrelerinde palmitat ile hücresel NAFLD modelinin oluştuğunu kanıtlamaktadır.

Palmitat ile oluşturulan hücresel NAFLD modelinde RA'nın hücre canlılığı veya hücre içi yağlanma üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya literatürde rastlamadık ancak farklı bir deneysel modelde RA'nın HepG2 hücrelerinde doza bağlı olarak tert-butil hidroperoksit ile

oluşturulan hücre ölümünü azalttığı bildirilmiştir (38,64). Çalışmamızda 50, 100 ve 200 μM RA, palmitatın sebep olduğu hücre ölümünü anlamlı olarak azalttı.

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında RA'nın yağlanma üzerine etkisini araştıran tek bir çalışma bulunmaktadır ve 2018 yılında yayınlanan bu çalışmada Balachander ve ark. (8), HepG2 hücrelerinde 1 mM oleik asit ile oluşturulan karaciğer yağlanmasında 20 μM RA'nın hücre içi trigliserit düzeylerini azalttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda 50, 100 ve 200 μM RA, palmitatın sebep olduğu trigliserit düzeylerindeki artışı anlamlı olarak azalttı ancak 25 μM ve daha düşük RA konsantrasyonlarında ise anlamlı fark yoktu ve RA'nın yağlanmayı özellikle yüksek dozlarda azalttığı mikroskopik olarak oil red-O boyama ile de görüldü. Çalışmamız, HepG2 hücrelerinde serbest yağ asidi ile oluşturulan yağlanmada RA'nın hücre içi trigliserit düzeylerini azaltması bakımından Balachander ve ark. (8) ile benzer olsa da, trigliserit düzeyini azaltmada etkin RA konsantrasyonları bakımından farklılık teşkil etmektedir ve bu farklılık oleik asit ve palmitat ile oluşturulan hücresel NAFLD modelleri arasındaki farktan kaynaklanmış olabilir. Çünkü Gomez-Lechon ve ark. (4), HepG2 hücrelerinde palmitat ile yağlanma modelinin, karaciğerde yağ birikimine bağlı karaciğer hücresindeki akut ve toksik etkilerin araştırılmasında; oleik asit ile oluşturulan yağlanma modelinin ise tek başına palmitata göre daha az toksik etkiler gösterdiğini ve kronik karaciğer yağlanmasının araştırılmasında kullanılabilecek hücresel NAFLD modelleri olduğunu bildirmiştir. Bu açıdan palmitat ile oluşturulan deneysel model daha akut ve toksik bir model olduğundan düşük RA konsantrasyonları yetersiz kalmış olabilir.

Desai ve ark. (65), pediatrik non-alkolik yağlanmada PON1 protein düzeyinin arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda HepG2 hücrelerine palmitat uygulaması PON1 protein ekspresyonlarını değiştirmedi. Desai ve ark. (65)'dan farklı olarak PON1 düzeylerinin değişmemesinin nedeni palmitat ile oluşturulan hücresel NAFLD modelinin kısa süreli akut bir model olması olabilir. Diğer yandan çalışmamızdaki hücresel NAFLD modelinde NAFLD hastalarından farklı olarak yağ asidi olarak sadece palmitat uygulaması yapıldı ve bu da Desai ve ark. (65) ile çalışmamız arasındaki farklı PON1 sonuçlarına sebep olabilir. Çünkü çalışmamızı destekler nitelikte, Kudchodkar ve ark. (66) diyetsel tripalmitinin sıçanlarda PON1 aktivitesini değiştirmediğini, Boshtam ve ark. (67) ise HDL'nin palmitik asit içeriği ile PON1 aktiviteleri arasında fark olmadığını bildirmişlerdir. Literatürde NAFLD'nin PON3 üzerine etkisini araştıran bir çalışma ise bulunmamakta olup bu çalışma ile HepG2 hücrelerinde palmitatın PON1 enziminin yanında PON3 enzimini de değiştirmediği ilk kez gösterilmiştir.

Literatürde RA'nın PON1 veya PON3 enzimleri üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda hücre canlılığını ve hücre içi yağlanma üzerine en etkili dozlar olan 100 ve 200 μM RA'nın hem direkt olarak HepG2 hücrelerinde hem de HepG2 hücrelerinde palmitat ile oluşturulan hücresel NAFLD modelinde PON1 ve PON3 protein ekspresyonları üzerine anlamlı etkisi yoktu. Bu bulgular ışığında RA'nın ne tek başına uygulandığında, ne de palmitat ile birlikte uygulandığında HepG2 hücrelerinde PON1 ve PON3 protein düzeyleri üzerine anlamlı etkisi olmadığını söylebiliriz.

Sonuç olarak çalışmamız, RA'nın insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde palmitat ile oluşturulan hücresel NAFLD modelinde hücre canlılığını arttırdığını, yağlanmayı azalttığını, ancak PON1 ve PON3 protein düzeylerinin değiştirmediğini gösterdi. Hücre canlılığını arttırması ve yağlanmayı azaltması sebebiyle RA, NAFLD'nin önlenmesinde ya da bulgularının azaltılmasında etkili olabilir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada palmitat ile NAFLD modeli oluşturulan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde RA'nın, hücre canlılığına, yağlanmaya, PON1 ve PON3 protein ekspresyonlarına etkisini göstermeyi amaçladık. Bu amaçla MTT hücre canlılığı testi ile HepG2 hücrelerinde 24 saat uygulandığında %80 ve üzeri canlılığın görüldüğü toksik olmayan RA konsantrasyonları 24 saat süreyle 1 mM palmitat ile NAFLD modeli oluşturulan HepG2 hücrelerine tedavi olarak palmitat ile aynı anda uygulanmış ve bu hücre canlılığına etkisi MTT testi, yağlanma üzerine etkisi ise trigliserit ölçümü ve Oil Red-O boyama ile gösterildi. Palmitat ile NAFLD modelinde hücre canlılığını en fazla arttıran ve yağlanmayı en fazla azaltan RA konsantrasyonları, 24 saat süreyle tek başlarına veya 1 mM palmitat ile HepG2 hücrelerine uygulanarak PON1 ve PON3 protein düzeyleri western blot yöntemiyle ölçüldü. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar şunlardır:

1. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan RA; 50 μM, 100 μM ve 200 μM konsantrasyonlarında hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdı, 5 μM, 10 μM ve 25 μM konsantrasyonlarında hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmedi ve 300 μM, 400 μM ve 500 μM konsantrasyonlarında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı.
2. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 1 mM palmitat hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı, palmitat ile eş zamanlı uygulan RA; 50 μM, 100 μM ve 200 μM konsantrasyonlarında hücre canlılığını anlamlı olarak arttırken, 5 μM, 10 μM ve 25 μM konsantrasyonlarında hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmedi.
3. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 1 mM palmitat trigliserit düzeylerini anlamlı olarak arttırdı, palmitat ile eş zamanlı uygulan RA; 50 μM, 100 μM ve

200 μM konsantrasyonlarında trigliserit düzeylerini anlamlı olarak azaltırken, 5 μM, 10 μM ve 25 μM konsantrasyonlarında trigliserit düzeylerini anlamlı olarak değiştirmedi.

4. 24 saat süreyle 1 mM palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde oil red O ile boyanmanın kontrole göre fazla olduğu görüldü. 1 mM palmitat ile birlikte uygulanan RA konsantrasyonlarının oil red O ile boyanmayı azalttığı ve bu azalmanın özellikle daha yüksek konsantrasyonlarda belirgin olduğu görüldü.
5. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 100 μM ve 200 μM RA, PON1 ve PON3 protein düzeylerini anlamlı olarak değiştirmedi.
6. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 1 mM palmitat ve 1 mM palmitat ile birlikte eşzamanlı uygulanan 100 μM ve 200 μM RA, PON1 ve PON3 protein düzeylerini anlamlı olarak değiştirmedi.

Sonuç olarak bulgularımız, RA'nın palmitat ile NAFLD modeli oluşturulan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde, hücre canlılığını arttırdığını, yağlanmayı azalttığını, ancak PON1 ve PON3 protein ekspresyonlarını değiştirmediğini gösterdi.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, palmitat ile non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı modeli oluşturulan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde rosmarinik asidin, hücre canlılığına, yağlanmaya, paraoksonaz-1 ve paraoksonaz-3 protein ekspresyonlarına etkisini araştırmaktır.

Deneysel yağlanma modeli oluşturmak için; HepG2 hücreleri 1 mM palmitat ile 24 saat inkübe edildi. Tedavi olarak palmitat ile aynı anda hücre kültürü medyumuna HepG2 hücrelerine toksik olmayan rosmarinik asit konsantrasyonları eklendi. Hücre canlılığı 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür testi ile değerlendirildi. Yağlanmanın değerlendirilmesi için hücre içi trigliserit düzeyleri ölçüldü ve hücreler Oil-Red O ile boyandı. Paraoksonaz-1 ve paraoksonaz-3 protein düzeyleri western blot yöntemiyle ölçüldü.

1 mM palmitat hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya ve trigliserit düzeylerinde anlamlı bir artşa yol açtı ancak paraoksonaz-1 ve paraoksonaz-3 protein düzeylerini anlamlı olarak değiştirmedi. Palmitat ile oluşturulan deneysel non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı modelinde rosmarinik asit 50 μM, 100 μM ve 200 μM konsantrasyonlarda, hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdı ve trigliserit düzeylerini anlamlı olarak azalttı. Oil-Red O ile boyanan hücrelerin mikroskopik incelenmelerinde hücrelerin trigliserit düzeylerindeki değişimleri ile benzer bulgular görüldü. Palmitat ile oluşturulan non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı modelinde hücre canlılığını en fazla arttırması ve yağlanmayı en fazla azaltması nedeniyle seçilen 100 μM ve 200 μM rosmarinik asit hem palmitat uygulanmayan hem de palmitat uygulanan hücrelerde paraoksonaz-1 ve paraoksonaz-3 protein düzeylerini anlamlı olarak değiştirmedi.

Sonuç olarak çalışmamız, rosmarinik asidin palmitat ile non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı modeli oluşturulan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde, hücre canlılığını

arttırdığını, yağlanmayı azalttığını, ancak paraoksonaz-1 ve paraoksonaz-3 protein ekspresyonlarını değiştirmediğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, rosmarinik asit, palmitat, paraoksanaz-1, paraoksonaz-3.

EFFECT OF ROSMARINIC ACID ON PARAOXONASE-1 AND PARAOXONASE-3 PROTEIN EXPRESSIONS IN PALMITATE-INDUCED STEATOSIS IN HUMAN-DERIVED HEPATOMA CELLS

SUMMARY

The aim of this study is to investigate the effect of rosmarinic acid on cell viability, steatosis, paraoxonase-1 and paraoxonase-3 protein expressions in palmitate-induced non-alcoholic fatty liver disease model in human-derived hepatoma cells.

To induce experimental steatosis model; HepG2 cells were incubated with 1 mM palmitate for 24 hours. For the treatment, non-toxic rosmarinic acid concentrations were added to cell culture medium simultaneously with the palmitate. Cell viability was evaluated by 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay. To evaluate steatosis, intracellular triglyceride levels were measured and cells were stained with Oil-Red O. Paraoxonase-1 ve paraoxonase-3 protein levels were measured by western blotting.

1 mM palmitate caused a significant decrease on cell viability and a significant increase on triglyceride levels but it did not significantly change paraoxonase-1 ve paraoxonase-3 protein levels. Rosmarinic acid at 50 μM, 100 μM and 200 μM concentrations significantly increased cell viability and significantly decreased triglyceride levels in palmitate-induced non-alcoholic fatty liver disease model. The similar findings with the triglyceride levels of cells were shown in microscopic examination cells which were stained with Oil-Red O. 100 μM and 200 μM rosmarinic acid concentrations, which are choosen because of they are the most increasing cell viability and the most decreasing steatosis in

palmitate-induced non-alcoholic fatty liver disease model, did not significantly change paraoxonase-1 ve paraoxonase-3 protein levels neither non-treated cells or treated cells with palmitate. As a result, our study showed that rosmarinic acid increases cell viability and decreases steatosis but it dose not change paraoxonase-1 ve paraoxonase-3 protein expressions in palmitate-induced non-alcoholic fatty liver disease model in human-derived hepatoma cells.

Key words: Non-alcoholic fatty liver disease, rosmarinic acid, palmitate, paraoxonase-1, paraoxonase-3.

KAYNAKLAR

1. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. Hepatology 2012;55(6):2005-23.

2. DeFilippis AP, Blaha MJ, Martin SS, Reed MR, Jones SR, Nasir K, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and serum lipoproteins: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. Atherosclerosis 2013;227:429-36.

3. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thieleman L, Orellanam M, Pettinelli P, et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n−6/n−3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Clin Sci (Lond) 2004;106:635–43.

4. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. Chem Biol Interact 2007;165(2):106-16.

5. Kim GD, Park YS, Jin YH, Park CS. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. Appl Microbiol Biotechnol 2015;99:2083-92.

6. Sookoian S, Pirola CJ. Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. J Hepatol 2008;49(4):600-7.

7. Précourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, et al. The three- gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. Atherosclerosis 2011;214(1):20-36.

8. Balachander GJ, Subramanian S, Ilango K. Rosmarinic acid attenuates hepatic steatosis by modulating ER stress and autophagy in oleic acid-induced HepG2 cells. RSC Advances 2018;8(47):26656-63.

9. Bedossa P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. Liver Int 2017;37:85-9.

10. Paschos, P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease two-hit process: multifactorial character of the second hit. Hippokratia 2009;13(2):128.

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

12. Younossi ZM, Diehl AM, Ong JP. Nonalcoholic fatty liver disease: an agenda for clinical research. Hepatology 2002;35:746–52.

13. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. Semin Liver Dis. 2001;21:17–26.

14. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. Cell Mol Life Sci. 2018;75(18):3313-27.

15. Serviddio G, Bellanti F, Vendemiale G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. Free Radic Biol Med 2013;65:952-68.

16. Masarone M, Rosato V, Dallio M, Gravina AG, Aglitti A, Loguercio C, et al. Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Oxid Med Cell Longev, 2018;2018:9577613.

17. Zhang XQ, Xu CF, Yu CH, Chen WX, Li YM. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol 2014;20(7):1768-76.

18. Arrese M, Cabrera D, Kalergis AM, Feldstein AE. Innate immunity and inflammation in NAFLD/NASH. Dig Dis Sci 2016;61(5):1294-303.

19. Angulo P, Machado MV, Diehl AM. Fibrosis in nonalcoholic Fatty liver disease: mechanisms and clinical implications. Semin Liver Dis 2015;35(2):132-45.

20. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global Epidemiology of Non Alcoholic Fatty Liver Disease–Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence and Outcomes. Hepatology 2016;64(1):73-84.

21. Byrne CD, Targher, G. NAFLD: a multisystem disease. J Hepatol. 2015;62(1 Suppl):S47-64.

22. Holterman AX, Guzman G, Fanztuzzi G, Wangh H, Aigner K, Browne A, et al. Nonalcoholic fatty liver diseasein severely obese adolescent and adult patients. Obesity (Silver Spring). 2013;21(3):591-7.

23. Yaggi HK, Araujo AB, McKinlay JB. Sleep duration as a risk factor for the development of type 2 diabetes. Sleep Med 2009;10(8):919-24.

24. Martín-Domínguez V, González-Casas R, Mendoza-Jiménez-Ridruejo J, García-Buey L, Moreno-Otero R. Pathogenesis, diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. Rev Esp Enferm Dig 2013;105(7):409-20.

25. Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ. Non-alcoholic steatohepatitis. Association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. Diabetes Metab 2000;26(2):98-106.

26. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: Further evidence for an etiologic association. Hepatology 2002;35(2):367-72.

27. Polimeni L, Del Ben M, Baratta F, Perri L, Albanese F, Pastori D, et al. Oxidative stress: New insights on the association of non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. World J Hepatol 2015;7(10):1325-36.

28. LaBrecque DR, Abbas Z, Anania F, Ferenci P, Khan AG, Goh KL, et al. World Gastroenterology Organisation global guidelines: Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. J Clin Gastroenterol 2014;48(6):467-73.

29. Bouma ME, Rogier E, Verthier N, Labarre C, Feldmann G. Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. In Vitro Cell Dev Biol 1989;25(3):267-75.

30. Song Z, Song M, Lee DY, Liu Y, Deaciuc IV, McClain CJ. Silymarin Prevents Palmitate-Induced Lipotoxicity in HepG2 Cells: Involvement of Maintenance of Akt Kinase Activation. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2007;101(4):262-8.

31. Yang X, Chan C. Repression of PKR mediates palmitate-induced apoptosis in HepG2 cells through regulation of Bcl-2. Cell Res 2009;19(4):469-86.

32. Park JY, Kim Y, Im JA, Lee H. Oligonol suppresses lipid accumulation and improves insulin resistance in a palmitate-induced in HepG2 hepatocytes as a cellular steatosis model. BMC Complement Altern Med 2015;15:185.

33. Willy JA, Young SK, Stevens JL, Masuoka HC, Wek RC. CHOP links endoplasmic reticulum stress to NF-κB activation in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. Mol Biol Cell 2015;26(12):2190-204.

34. Bulgakov VP, Inyushkina YV, Fedoreyev SA. Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. Crit Rev Biotechnol 2012;32(3):203-17.

35. Nunes S, Madureira AR, Campos D, Sarmento B, Gomes AM, Pintado M, et al. Therapeutic and nutraceutical potential of rosmarinic acid—Cytoprotective properties and pharmacokinetic profile. Crit Rev Food Sci Nutr 2017;57(9):1799-806.

36. Zou ZW, Xu LN,Tian JY. Antithrombotic and Antiplatelet Effects of Rosmarinic Acid, a Water-soluble Component Isolated from Radix Salvia miltiorrhizae (Danshen). Yaoxue Xuebao 1993;28(4):241-5.

37. Yokozawa T, Liu ZW, Chen CP, Tanaka T. Evaluation of Caffeic Acid Analogues using a Cultured Renal Epithelial Cell Line, LLC-PK1. Pharmacy and Pharmacology Communications 1999;5:365-70.

38. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/rosmarinic_acid#section=2D-Strucure Erişim tarihi: 24.04.2019
39. Adomako-Bonsu AG, Chan SL, Pratten M, Fry JR. Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. Toxicol In Vitro 2017;40:248-55.

40. Ding Y, Zhang Z, Yue Z, Ding L, Zhou Y, Huang Z, et al. Rosmarinic Acid Ameliorates H2O2-Induced Oxidative Stress in L02 Cells Through MAPK and Nrf2 Pathways. Rejuvenation Res. In press 2018.

41. Petersen M, Simmonds MS. Rosmarinic acid. Phytochemistry 2003;62(2):121–5.

42. Osakabe N, Takano H, Sanbongi C, Yasuda A, Yanagisawa R, Inoue K, et al. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. Biofactors 2004;21(1-4):127–31.

43. Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. Free Radic Res 2016;40(2):223-31.

44. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2004;369(1):78-88.

45. Yeung DT, Lenz DE, Cerasoli DM. Human paraoxonase I: A potential bioscavenger of organophosphorus nerve agents. In: Mackness B, Mackness M, Aviram M, Paragh G (Eds.). The Paraoxonases: their role in disease development and xenobiotic metabolism. 1st Ed. Dordrecht: Springer; 2008. p.151-70.

46. Rosenblat M, Sapir O, Aviram M. Glucose inactivates paraoxonase 1 (PON1) and displaces it from high density lipoprotein (HDL) to a free PON1 form. In: Mackness B, Mackness M, Aviram M, Paragh G (Eds.). The paraoxonases: their role in disease development and xenobiotic metabolism. 1st Ed. Dordrecht: Springer; 2008. p.35-49.

47. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21(4):542-7.

48. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. J Lipid Res 2005;46(6):1239-47.

49. Ozgun E, Ozgun GS, Tabakcioglu K, Gokmen SS, Sut N, Eskiocak S. Effect of lipoic acid on paraoxonase-1 and paraoxonase-3 protein levels, mRNA expression and arylesterase activity in liver hepatoma cells. Gen Physiol Biophys 2017;36(4):465-70.

50. She ZG, Chen HZ, Yan Y, Li H, Liu DP. The human paraoxonase gene cluster as a target in the treatment of atherosclerosis. Antioxid Redox Signal 2012;16(6):597-632.

51. http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo_country=tr Erişim tarihi: 24.04.2019

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

53. 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).pii:1191.

54. Yao HR, Liu J, Plumeri D, Cao YB, He T, Lin L, et al. Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids. Am J Transl Res 2011; 3(3):284-91.

55. Mamedova LK, Yuan K, Laudick AN, Fleming SD, Mashek DG, Bradford BJ. Toll-like receptor 4 signaling is required for induction of gluconeogenic gene expression by palmitate in human hepatic carcinoma cells. J Nutr Biochem 2013;24(8):1499-507.

56. Jang E, Shin MH, Kim KS, Kim Y, Na YC, Woo H, et al. Anti-lipoapoptotic effect of Artemisia capillaris extract on free fatty acids-induced HepG2 cells. BMC Complement Altern Med 2014;14:253.

57. Xu S, Nam SM, Kim JH, Das R, Choi SK, Nguyen TT, et al. Palmitate induces ER calcium depletion and apoptosis in mouse podocytes subsequent to mitochondrial oxidative stress. Cell Death Dis 2015;6:e1976.

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

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

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

61. Perez-Fons L, Garzón MT, Micol V. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) polyphenols on membrane phospholipid order. J Agric Food Chem 2009;58(1):161-71.

62. Wu J, Zhu Y, Li F, Zhang G, Shi J, Ou R, et al. Spica prunellae and its marker compound rosmarinic acid induced the expression of efflux transporters through activation of Nrf2-mediated signaling pathway in HepG2 cells. J Ethnopharmacol 2016;193:1-11.

63. Ma ZJ, Yan H, Wang YJ, Yang Y, Li XB, Shi AC, et al. Proteomics analysis demonstrating rosmarinic acid suppresses cell growth by blocking the glycolytic pathway in human HepG2 cells. Biomed Pharmacother. 2018;105:334-49.

64. Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. Life Sci 2006;79(21):2056-68.

65. Desai S, Baker SS, Liu W, Moya DA, Browne RW, Mastrandrea L, et al. Paraoxonase 1 and oxidative stress in paediatric non-alcoholic steatohepatitis. Liver Int 2014;34(1):110-17.

66. Kudchodkar BJ, Lacko AG, Dory L, Fungwe TV. Dietary fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. J Nutr 2000;130(10):2427-33.

67. Boshtam M, Emami Razavi A, Pourfarzam M, Ani M, Naderi GA, Basati G, et al. Serum paraoxonase 1 activity is associated with fatty acid composition of high density lipoprotein. Dis Markers 2013;35(4):273-80.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller **Sayfa no**

Şekil 1. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında karaciğerde yağlanma mekanizması. 4
Şekil 2. Rosmarinik asidin kimyasal yapısı. 7
Şekil 3. Rosmarinik asidin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi. 17
Şekil 4. Palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde rosmarinik asidin hücre canlılığına etkisi. 18
Şekil 5. Palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde rosmarinik asidin trigliserit düzeylerine etkisi. 19
Şekil 6. Palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde rosmarinik asidin yağlanma üzerine etkisi. 21
Şekil 7. Rosmarinik asidin HepG2 hücrelerinde paraoksonaz 1 ve 3 düzeylerine etkisi. 22
Şekil 8. Palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde rosmarinik asidin paraoksonaz 1 ve 3 düzeylerine etkisi. 23

ÖZGEÇMİŞ

27.10.1989 tarihinde Kırklareli'de doğdum. İlk ve orta eğitimimi Lüleburgaz'da tamamladım. 2007 yılında Lüleburgaz Anadolu Lisesi'sini bitirdim. 2007 yılında girdiğim Haliç Üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulu'ndan 2011'de mezun oldum. 2011 yılından beri özel hastanelerde ve kamu hastanelerinde hemşire olarak çalışmaktayım ve 2015 yılından beri Kırklareli Devlet Hastanesi'nde Eğitim Birim Sorumlusu olarak görev yapmaktayım. 2016 yılından beri Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimi almaktayım.

EKLER

Ek 1

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2017/95	
	PROTOKOL ADI	Palmitat ile Yağlanma Oluşturulan İnsan Kaynaklı Hepatoma Hücrelerinde Rosmarinik Asidin Paraoksonaz-1 ve Paraoksonaz-3 Protein Ekspresyonlarına Etkisi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Yrd. Doç. Dr. Eray ÖZGÜN	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 06/05** **Tarih:29.03.2017**
	Fakültemiz Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Eray ÖZGÜN'ün sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Esra YAKŞİ'nin tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.
ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E (H)	(E) H	
Yrd. Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Başkan Yardımcısı	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E H	E H	İzinli
Yrd. Doç. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E (H)	(E) H	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E H	E H	İzinli
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E (H)	(E) H	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E (H)	(E) H	
Öğretim. Gör. Uzm. Dr. Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Cafer Sadık ZORKUN Üye	Kardiyoloji	T.Ü.T.F. Kardiyoloji A.D.	E	E (H)	(E) H	
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOCAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	İzinli
Prof. Dr. Niyazi Cenk SAYIN Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E (H)	(E) H	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	İzinli
Avukat Baki KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E H	E H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a.
Dekan Yrd.