

Atf İçin: Atabay Dingil MN, İşgör MM, 2022. *In Vitro* Hepatik Oksidatif Hasarda Karvakrolün Etkinliğinin Araştırılması. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(2): 1034-1044.

To Cite: Atabay Dingil MN, İşgör MM, 2022. Investigation of the Efficacy of Carvacrol in *In Vitro* Hepatic Oxidative Damage. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(2): 1034-1044.

***In Vitro* Hepatik Oksidatif Hasarda Karvakrolün Etkinliğinin Araştırılması**

Meryem Nur ATABAY DİNGİL¹, Mehmet Mustafa İŞGÖR^{1*}

ÖZET: Nonalkolik karaciğer yağlanması (NAFLD) karaciğerde, özellikle trigliserit olmak üzere yağ birikimi ile karakterize, yaygın görülen bir hastalıktır. Hastalığın tedavisinde araştırmalar, doğal kaynaklardan elde edilen antioksidan moleküllere yoğunlaşmıştır. Bu bağlamda çalışmamızda, kekiğin etken maddesi karvakrolün in vitro hepatoprotektif etkinliği araştırılmıştır. Araştırmamızda materyal olarak insan hepatosit hücre hattı (HepG2, ATCCHB-8065) kullanılmıştır. Deneme grupları kontrol (K), palmitat eklenen grup (P), karvakrol eklenen grup (C) ve palmitat ile birlikte karvakrol eklenen grup (+C) olarak tasarlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda palmitat (150, 300 ve 450 µM) ve karvakrol (1, 5, 10 ve 50 µM) 24 saat sürelerle hücrelere uygulanarak etkin konsantrasyon tespitleri MTT viyabilite testi ile ortaya konulmuştur. Hücrelerden elde edilen lizatlardan hücre içi glutatyon ve nitrit düzeyi spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Yine bu örneklerdeki aldoz redüktaz düzeyleri (AR) ELISA metoduyla araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen viyabilite verilerine göre, palmitatın 300 µM konsantrasyonunun kontrole göre % 45 oranında hücre kayıplarına neden olduğu, karvakrolün 5 µM konsantrasyonunun hücrelere uygulanımıyla bu kayıpların % 41 oranında önlediği tespit edilmiştir. Çalışmada palmitat ve karvakrolün GSH düzeyinde önemli bir değişiklik oluşturmadığı ancak NO düzeylerini anlamlı düzeyde azalttığı tespit edilmiştir. Yine hücre içi AR protein düzeyini palmitat arttırırken, karvakrolün bu artışı % 1.7 oranında önlediği belirlenmiştir. Tüm bu veriler doğrultusunda karvakrolün nonalkolik steatozis gibi yağlanmaya bağlı karaciğer hastalıklarında potansiyel bir etken madde olarak düşünülebileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nonalkolik karaciğer yağlanması, palmitat, karvakrol, oksidatif stres, aldoz redüktaz

Investigation of the Efficacy of Carvacrol in *In Vitro* Hepatic Oxidative Damage

ABSTRACT: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); is a common disease characterized by accumulation of fat in the liver, especially triglycerides. Research in the treatment of the disease has focused on antioxidant molecules derived from natural sources. In this context, hepatoprotective effect of carvacrol has been tried to be demonstrated by in vitro experiments. Human hepatocyte cell line (HepG2, ATCCHB-8065) was used in the study. Experimental groups were designed as control (K), palmitate added group (P), carvacrol added group (C) and palmitate and carvacrol added group (+ C). Different concentrations of palmitate (150, 300 and 450 µM) and carvacrol (1, 5, 10 and 50 µM) were applied to the cells for 24 hours and effective concentration determinations were determined by MTT viability test. Intracellular glutathione and nitrite levels were analyzed spectrophotometrically from lysates obtained from cells. Besides, aldose reductase levels (AR) in these samples were investigated by ELISA method. According to the viability data obtained from the study, it was found that 300 µM concentration of palmitate caused 45% cell losses compared to the control, and 5 µM concentration of carvacrol prevented 41% of these cell losses. In this study, palmitate and carvacrol did not produce a significant change in GSH levels but it significantly reduced NO levels. In addition, palmitate increased intracellular AR protein level, while carvacrol inhibited this increase by 1.7%. According to all these data, it was concluded that carvacrol can be considered as a potential active agent in fatty liver diseases such as nonalcoholic fatty liver disease.

Keywords: Nonalcoholic fatty liver disease, palmitate, carvacrol, oxidative stress, aldose reductase

¹ Meryem Nur ATABAY DİNGİL ([Orcid ID: 0000-0001-7940-3213](https://orcid.org/0000-0001-7940-3213)), Mehmet Mustafa İŞGÖR ([Orcid ID: 0000-0002-1729-4717](https://orcid.org/0000-0002-1729-4717)), Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilimdalı, Hatay, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehmet Mustafa İŞGÖR, e-mail: mmisgor@gmail.com

Bu çalışma Meryem Nur ATABAY DİNGİL'in Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir (Tez No:590490, Yıl 2019).

GİRİŞ

Nonalkolik karaciğer yağlanması (NAFLD); genetik bozukluklar dışında temelde enerji alımı ve fiziksel hareketsizliğin sebep olduğu, obezite, insülin direnci ve diğer metabolik komplikasyonlarla yakından ilişkili steatohepatit ile karakterize bir hastalıktır. Steatohepatitin oluşum mekanizması tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, akut inflamasyon ve oksidatif stresin hastalığın ilerlemesini tetiklediği bilinmektedir.

Karaciğer dokusu enerji metabolizmasında, özellikle glukoz ve lipid homeostazında büyük bir rol oynar. Özellikle tip II diabetes mellitus (T2DM) olan diyabetin, genellikle hepatik steatoz veya NAFLD gelişmesine yol açabilecek, hepatik trigliserit birikimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Cusi, 2009; Xu ve ark., 2009). NAFLD, insülin direnciyle yakından ilişkilidir ve metabolik sendromun hepatik belirtisi olarak kabul edilmektedir (Marchesini ve ark., 2001; Kotronen ve Yki-Jarvinen, 2008). Hipertansiyon ve hipertrigliseridemi NAFLD ile bağlantılıdır ve son çalışmalar bunun kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olduğunu göstermektedir (Assy ve ark., 2000; Donati ve ark., 2004; Ekstedt ve ark., 2006; Targher, 2007).

İki anahtar enzimden oluşan polyol yolağı, aldoz redüktaz (AR) ve sorbitol dehidrogenazdan (SDH) oluşur ve bu enzimler çeşitli diyabetik komplikasyonların patogeneğinde rol oynamaktadır. Bu baypas yolunda, koenzim nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'ın indirgenmiş formuna (NADP) eş zamanlı oksidasyonu ile birlikte AR tarafından glukoz sorbitole dönüştürülür. Daha sonrasında ise sorbitol dehidrogenaz (SDH) enzimi sorbitol'ü fruktoza dönüştürür. Aldoz redüktaz enziminin diyabet ve diğer hastalıkların yanı sıra, karaciğer hastalıklarında da lipid homeostazisi, hepatit ve fibrozis gelişimiyle ilişkili olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (Brown ve ark., 2005; Qiu ve ark., 2012). Yapılan çalışmaların birçoğunda, AR enzim inhibisyonunun NAFLD patogenezinin önlenmesinde yararlı olabileceği öngörülmektedir (Ekstedt, 2006).

Karvakrol, 5-izopropil-2-metilfenolün kimyasal adı ile monoterpenik bir fenoldür. Timol ile izomerik olan bu organik bileşik, thymus, kekik, coridothymus, thymbra, satureja ve lippia dahil olmak üzere çok sayıda aromatik esansiyel yağ üreten bitki türlerinde bol miktarda üretilmektedir (Suntres ve ark., 2015). Klinik uygulamalarda potansiyel kullanımı için karvakrolün biyolojik ve farmakolojik özelliklerini belirleyen önemli araştırmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda karvakrolün antioksidan (Guimarães ve ark., 2010; Aristatile ve ark., 2011), antibakteriyel (Du ve ark., 2008), antitümör (Fan ve ark., 2015), anti-enflamatuar (Lima ve ark., 2013), asetilkolin esteraz (AChE) inhibisyonu (Jukic ve ark., 2007), hepatotoksik (Yin ve ark., 2012) ve hepatoprotektif (Mohseni ve ark., 2019) gibi çeşitli biyoaktiviteleri olduğu belirtilmiştir.

Bu bağlamda çalışmamızda, *in vitro* karaciğer hücrelerinde palmitat uyarımlı hasarın önlenmesinde, yöremiz florasının baskın türlerinden olan kekiğin antioksidan bileşiği karvakrolün etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Hücre Kültürü

Araştırmada insan orijinli HepG2 karaciğer hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, polietilenimin (sodyum borat buffer içerisinde 0.2 mg/ml, pH 8.3) ile kaplı 25 cm² lik flasklarda ve içeriğinde %10 oranında ısı ile inaktif edilmiş fetal sıgır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin ve penisilin/streptomisin/amfoterisin B karışımı bulunduran DMEM besi ortamında, 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava bulunduran steril inkübatörde üretilmiştir. Hücreler flask tabanına % 80-90 oranında yayıldıklarında tripsinize (%0.025 Tripsin/EDTA) edilerek kaldırılıp 1:5 oranında pasajlanmıştır. Tripan mavisi boyası ile hücre sayımı mikroskop altında bir hemositometre yardımıyla belirlenmiştir. Daha sonra deneme

grupları için ihtiyaç duyulan hücre sayısı (4×10^5 hücre/kuyucuk) 24'lü pleytlere eklenerek çalışma başlatılmıştır. Deney grupları kontrol (K), palmitat uygulanan grup (P), karvakrol uygulanan grup (C) ve palmitat ile birlikte karvakrol uygulanan grup (+C) şeklinde düzenlenmiştir.

Viyabilite Testi

Çalışma Papachristou ve ark., (2013) uyguladığı metod takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu metotta kısaca farklı konsantrasyonlarda karvakrol (1, 5, 10 ve 50 μM) ve palmitat (150, 300 ve 450 μM) hücrelere uygulanmasından 24 saat sonra hücre kuyucuklarındaki medium alınarak üzerlerine içerisinde 20 μL MTT ayırıcı (5 mg/ml PBS'te çözdürülmüş) bulunan 200 μL taze komple besiyeri eklenmiştir. Hücreler bu solüsyonla 90 dakika 37°C 'de inkübe edilmiş ve MTT kristalleri 100 μL 0.04 M HCL/isopropanol ile 15 d süreyle 37°C 'de çözdürülmüştür. Süre sonunda ependorflara alınan örnekler 12000 rpm ve $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edilerek ve 570 nm ışık dalga boyunda mikropleyt (μQuant ELISA reader) okuyucuda okutulup elde edilen değerler kaydedilmiştir.

Protein Düzeyleri Analizleri

Çalışmada AR protein düzeyi hazır ticari kit (Finetest, PRC) protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Standartların absorbans değerlerinden grafik çizilerek elde edilen formülasyonla numunelerin AR düzeyleri hesaplanmıştır. Elde edilen değerler ng/ml cinsinden verilmiştir.

Glutasyon (GSH) Analizi

Glutasyon (GSH) düzeylerinin ölçümü, Sedlak ve Lindsay (1968) metodunun takibiyle gerçekleştirilmiştir. Metodun prensibi, reaksiyona eklenen 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)'in sülfidril grupları vasıtasıyla indirgenmesi ile 1 mol'lük sülfidri, 1 mol 2-nitro-5-merkaptobenzoik asite karşılık gelmesi esasına dayanmaktadır.

Nitrik oksit (NO) Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışmada nitrit düzeyleri, Cortas ve Wakid (1990)'ın uyguladığı Griess metodu ile spektrofotometrik olarak ortaya konulmuştur.

Hücre Görüntüleri

Karaciğer hücrelerine karvakrol ve palmitatın 24 saat süreyle uygulanımları sonucu hücre görüntüleri bir invert mikroskop (Olympus CK40, JP) ile 10x objektifiyle görüntülenmiştir.

İstatistiksel Metot

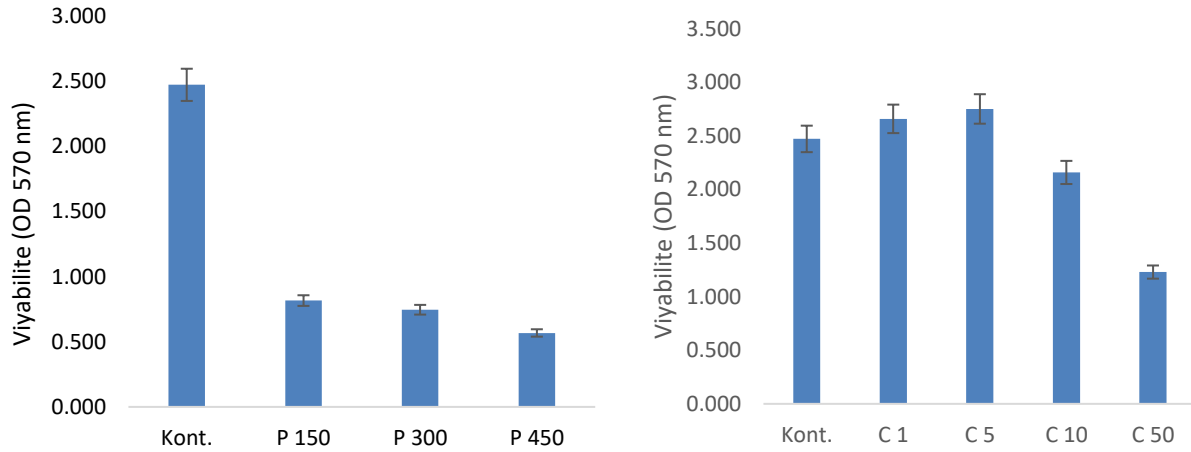
Araştırmada elde edilen veriler, SPSS 20.0 (Statistical Package for Social Sciences) programında, One-way ANOVA varyans analizi yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Duncan testi ile belirlenmiştir. Elde edilen verilerden $p < 0.05$ ve altı sonuçlar istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Değerler ortalama \pm standart hata (SE) şeklinde verilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

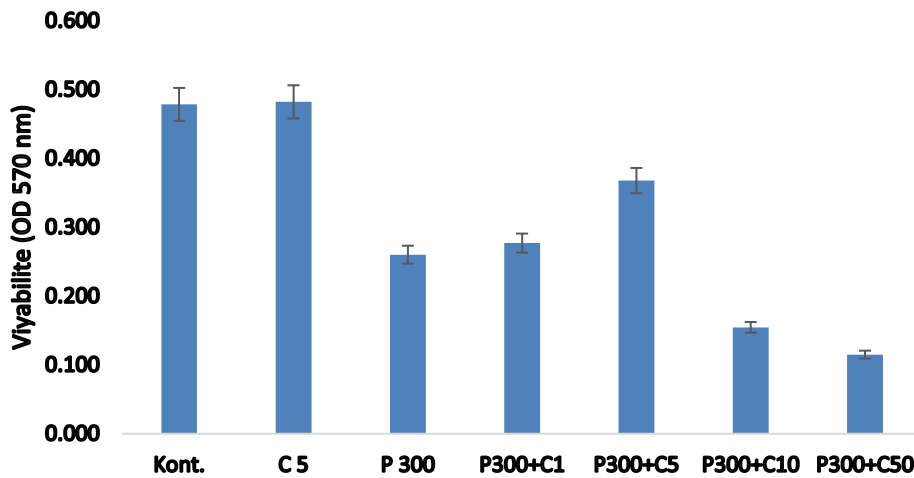
Karaciğer yağlanması terimi, karaciğer, steatoz, steatohepatit ve sirozun yağ infiltrasyonu ile karakterize geniş bir hastalık yelpazesini ifade eder (Chalasanı ve ark., 2012). NAFLD asemptomatik yapısı nedeniyle teşhis edilmesi zordur. Bitkisel kökenli doğal ürünlerin, önemli yan etkiler göstermeden hepatik lipid birikimini önlediği yaygın olarak bildirilmiştir. Bu nedenle, NAFLD tedavisinde bu bitkilerin değerlerinin değerlendirilmesi önemli bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir. Son zamanlarda, sağlığa fayda sağlayabilecek ve refahı artıracak gıdalardaki fonksiyonel moleküllerle ilgili yapılan çalışmaların sayısı oldukça artmıştır (Abuajah ve ark., 2015).

Karvakrol (2-metil-5-izopropilfenol), Lamiaceae familyasının Thymus (Can Baser, 2008) gibi uçucu yağlarında bulunan çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip doğal bir fenolik

monoterpendir (Bakır ve ark., 2016). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, sıçanlarda nano kapsüllenmiş ve nano emülsiyon formlarında karvakrol kullanımının zayıflatılmış tiyoasetamid (TAA) kaynaklı karaciğer hasarında etkili sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Hussein ve ark., 2017). Araştırmamızda elde edilen verilere göre, hücre canlılığında kontrol grubuna göre palmitatın doz bağımlı olarak artış gösteren hücre kayıplarına neden olduğu tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre hücre canlılık oranı, kontrol grubuna göre karvakrolün 1 ve 5 μ M konsantrasyonları artış gösterirken, 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarında ise azalma göstermiştir. Bununla birlikte hücre ortamına palmitat uygulanımı sonrası karvakrol ilavesi yapılan grupta hücre kayıplarının anlamlı düzeyde önlendiği tespit edilmiştir.

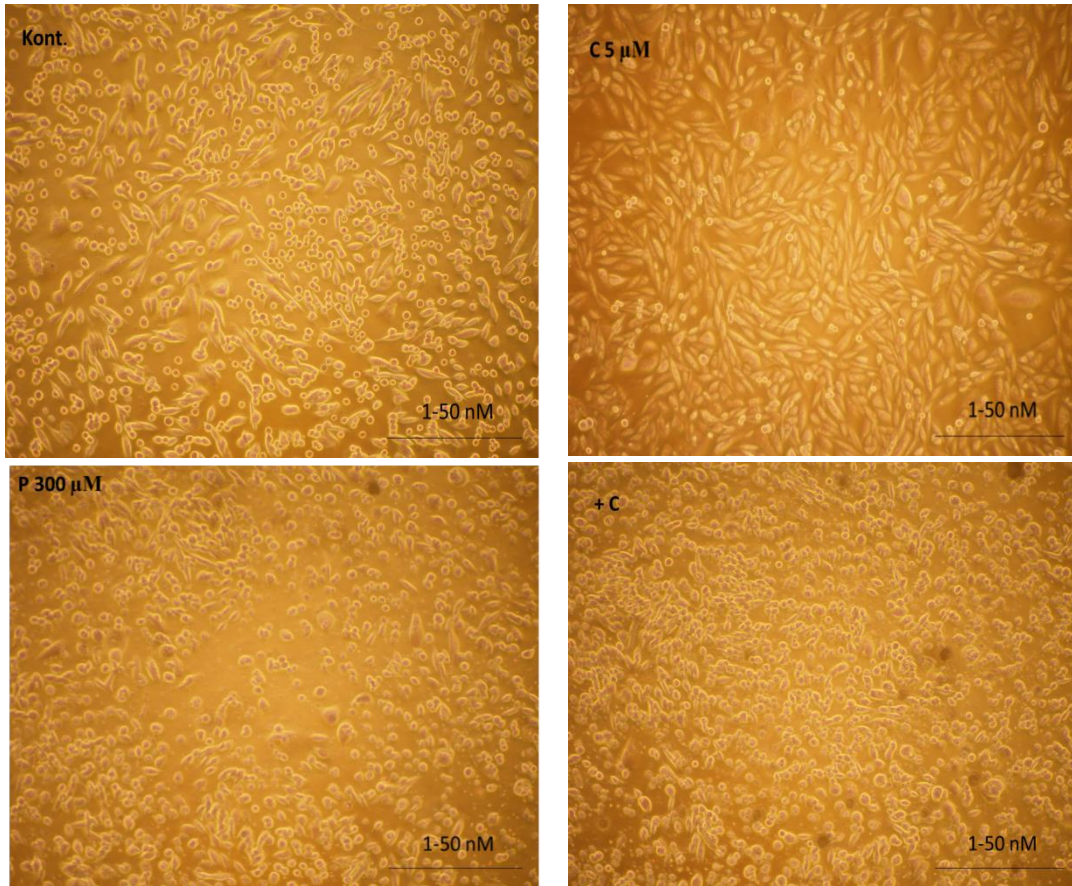


Şekil 1. Farklı konsantrasyonlardaki palmitate ve karvakrolün hücre canlılığı üzerine etkileri (24 saat)



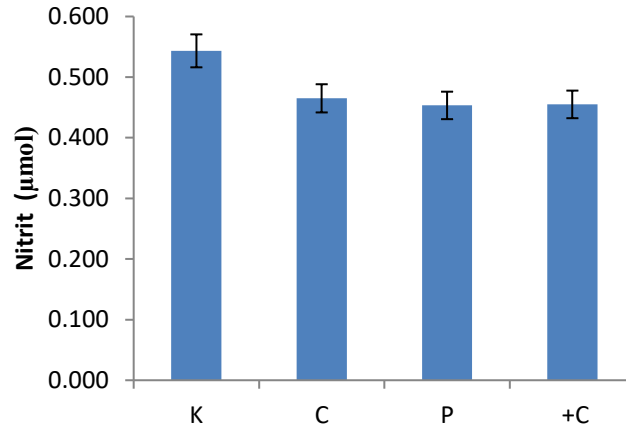
Şekil 2. Palmitat uygulanımı sonrası carvacrol uygulanan gruptaki hücre canlılığı (24 saat)

Ayrıca, çalışmadan alınan fotoğraf görüntülerinde, palmitatın 300 μ M konsantrasyonda hücrelere uygulanımı sonrası hücre sayılarının dramatik derecede azaldığı görülmüştür. Yine karvakrolün hücrelere 5 μ M uygulanımı sonrası hücre yoğunluğunun kontrol hücre görüntülerine kıyasla anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, palmitatla birlikte karvakrol uygulanımının olduğu gruptaki hücre görüntüleriyle tek başına palmitat kullanılan gruptaki hücre görüntüleri karşılaştırıldığında, karvakrolün anlamlı düzeyde hücre kayıplarını önlediği görülmüştür.



Şekil 3. Gruplara etken madde uygulanımı sonrası elde edilen hücre görüntüleri (10x, skala bar 1-50 nm)

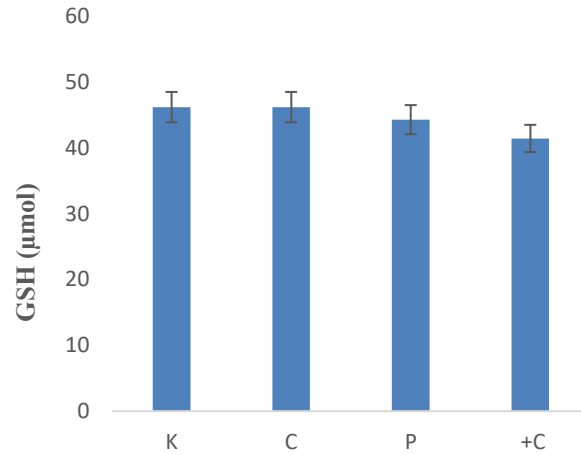
Nitrik oksit; nitrik oksit sentaz enzimlerinin aktivasyonu ile L- arjininden nitratın indirgenmesiyle üretilir (Hong ve ark., 2008). Nitrik oksitin endotel hücreleri, düz kas hücreleri, karaciğer hücreleri ve bağ doku hücreleri dahil olmak üzere birçok değişik hücre tiplerinde sitotoksik etki gösterdiği bilinmektedir. İnsülin direncinin artışı, NO üretimini atırır veya substrat tüketimine bağlı olarak NAFLD'nin başlangıç safhasındaki süperoksit ve hidroksil radikallerinin oluşumuna bağlı olarak inflamatuvar sitokinlerin salımına neden olabilir. Artan yangı sitokinleri hepatositlerde apoptozu tetikleyerek karaciğer hasarının ilerlemesine neden olur (Iwakiri ve ark., 2008). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada NAFLD'nin erken aşamalarında, 6 hafta yüksek yağlı diyet verilen farelerde eNOS aktivitesinin azalması, oksidatif stress artışıyla ve NO biyoayarlanımının azaltılmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte aynı araştırmada siklooksijenaz aktivitesi artışına bağlı olarak yangısal olmayan hepatik vasküler direnç veya fibröz gelişimi şekillenmiştir (Gonzalez-Paredes ve ark., 2016). Yaptığımız çalışmada, nitrit düzeyinin tek başına karvakrol eklenen grupta kontrole göre % 14 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Yalnızca palmitat eklenen grupta ise kontrole göre nitrit düzeyinin % 16 oranında azaldığı bulunmuştur. Bununla birlikte nitrit seviyesinin palmitatla birlikte carvacrol eklenen grupta, tek başına palmitat eklenen gruba göre önemsiz düzeyde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. Hücrelere carvacrol ve palmitat uygulananın nitrit düzeyleri üzerine etkileri (24 saat)

Reaktif oksijen türleri (ROS) normal hücrel metabolizma sonucu canlı organizmalar tarafından üretilir. Düşük ila orta derecede konsantrasyonlarda, fizyolojik hücre işlemlerinde işlev görürler, ancak yüksek konsantrasyonlarda, lipidler, proteinler ve DNA gibi hücre bileşenlerinde ters modifikasyonlar oluştururlar ve bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır. Oksidatif stresin birçok patolojik durumda rol oynadığı bilinmektedir. Oksidatif stres ve lipid peroksit seviyeleri NAFLD'li hastalarda artar ve NAFLD'de antioksidan enzim tüketimi veya oksidatif faktör üretimine yol açar (Jarukamjorn ve ark., 2016). Ayrıca, vücuttaki aşırı serbest radikaller NAFLD'li hastaların hemen hepsinde gözlenen sitotoksitate ile ilgili çeşitli proteinlerin anormal ekspresyonuna yol açarlar (Yeşilova ve ark., 2005). Bu nedenle, oksidatif stresin inhibisyonu, NAFLD'nin müdahalesi için önemli stratejilerden biridir (Spahis ve ark., 2017).

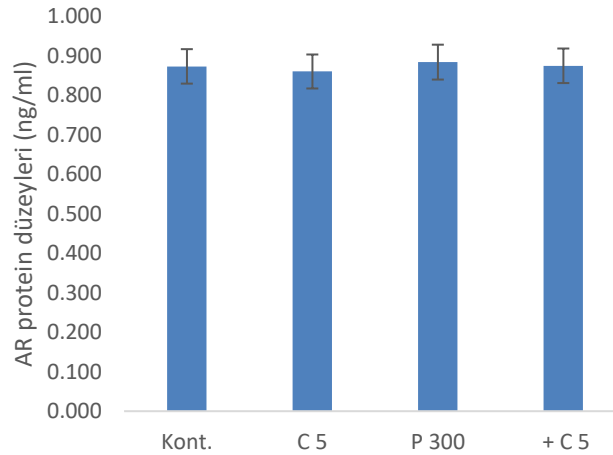
Gelişmiş canlılarda hücreler, reaktif oksijen türlerinin bertaraf edilmesi için enzimatik (CAT-katalaz GSH-Px-glutasyon peroksidaz ve SOD-süperoksit dismutaz vb.) ve nonenzimatik (GSH, vitamin E ve C, karotenoid bileşikler, lipoik asit ve naturel flavonoidler vb.) antioksidanlara sahiptirler (Mates ve ark., 1999). Mohebbati ve ark., (2018) yaptıkları adriyamisin uyarımlı karaciğer toksikasyonu modelinde karvakrolün özellikle katalaz aktivitesini arttırarak ve malondialdehit seviyesini azaltarak hepatosit kayıplarını önlediğini ortaya konulmuştur. Chenet ve ark., (2019) hidrojen peroksit uyarımlı beyin hücre oksidatif stresi modelinde, karvakrolün hem oksijenaz enzim inhibisyonunun yanı sıra, NfκB'nin downregülasyonu ve antioksidan belirteçlerin uyarımı ile nöroprotektör etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. De Santana ve ark., (2017) gerçekleştirdikleri asetik asit uyarımlı kolit modelinde, karvakrolün SOD ve GSH gibi antioksidan parametreleri önemli düzeyde arttırarak koruyucu etkinlik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen verilere göre ise, GSH düzeyinin karvakrol eklenen grupta kontrole göre pek değişmediği tespit edilmiştir. Tek başına palmitat eklenen grupta ise karvakrolün kontrole göre GSH düzeyini % 4 oranında azalttığı bulunmuştur. Yine GSH seviyesinin palmitatla birlikte karvakrol eklenen grupta sadece palmitat eklenen gruba göre % 6.5 oranında azalttığı tespit edilmiştir.



Şekil 5. Carvacrol ve palmitatın birlikte uygulanımı sonrasında hücre içi GSH düzeyleri (24 saat)

Fizyolojik koşullar altında, karaciğerde nispeten az oranda AR ifadesi gerçekleşmektedir (Markus ve ark., 1983). Ancak, AR ifadesinin hastalık durumlarında değiştiği gözlemlenmiştir. Konuyla ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında, hepatik steatozlu tip II diyabetik fareler (Qiu ve ark., 2012) ve metiyonin kolin eksik diyet kaynaklı nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı olan farelerin (Qiu ve ark., 2013) karaciğer dokusunda AR ekspresyon seviyelerinde önemli artışlar olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, AR'nin nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının gelişiminde önemli rol oynayabileceği ve inhibisyonunun hepatik steatozu iyileştirebileceği belirtilmiştir (Chen ve ark., 2015). Bir diğer çalışmada ise, AR'nin inhibisyonunun HepG2 hücrelerinde lipid damlacık birikimini belirgin şekilde azalttığı ve etanolün neden olduğu hepatik steatozu önleyici etki gösterebileceği öne sürülmüştür (Qiu ve ark., 2017).

Hepatik aldoz redüktaz ekspresyonu, alkolik ve nonalkolik steatozis, hepatitis ve karaciğer kanserlerinde artar. Qui ve ark., (2013) yaptıkları nonalkolik yağlı karaciğer sendromu modelinde AR'nin lentivirüs uyarımlı gen sessizleştirilmesinde serum alanin aminotransferaz ve hepatik lipoperoksitlerin ekspresyonunun azaldığını rapor etmişlerdir. Yine aynı araştırmada AR noksanlığının hepatik sitokrom p 450'nin hem mRNA ekspresyonunun hem de protein düzeylerini azaltarak oksidatif stres uyarımlı IL-1 β ve TNF- α stimülasyonunu baskıladığını ortaya koymuşlardır. Khan ve ark., (2019) alkolik karaciğer toksite modelinde karvakrolün antioksidan belirteçleri uyararak ve sitokrom p 450 ekspresyonunu inhibe ederek hücre kayıplarını önlediğini rapor etmişlerdir. Sunulan çalışmada, hücre içi aldoz redüktaz protein düzeyleri, kontrol grubuna göre karvakrolün tek başına eklenen grupta % 1.5 oranında azalırken, tek başına palmitat eklenen grupta ise %1.3 artış tespit edilmiştir. Ancak palmitat uygulanımı sonrası karvakrol uygulanan grupta ise karvakrolün aldoz redüktaz protein düzeyini palmitat grubuna göre % 1.7 oranında azalttığı bulunmuştur.



Şekil 6. Carvacrol ve palmitatın birlikte uygulanımı sonrasında hücre içi AR protein düzeyleri (24 saat)

SONUÇ

Araştırmada nonalkolik steatozda karvakrolün hepatoprotektif etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmada model oluşturmak için insan orijinli HepG2 hücrelerine palmitat uygulanmış ve palmitatın önemli derecede hücre kayıplarına neden olduğu görülmüştür. Palmitatın hücre kayıplarına neden olmasında ki temel sebeplerin aldoz redüktaz ve nitrik oksit artışına bağlı olabileceği ortaya konulmuştur. Karvakrolün ise bu hücre kayıplarını anlamlı derecede önlediği tespit edilmiştir. Literatürde elde edilen verilerle kıyaslandığında, araştırmada hücrelere uygulanan karvakrolün özellikle nitrik oksit miktarının azaltılması ve aldoz redüktaz enziminin inhibisyonuna bağlı olarak bu etkiyi gösterdiği söylenebilir. Tüm bu bilgilere ve araştırmanın sonuçlarına bakıldığında, karvakrolün nonalkolik karaciğer yağlanması tedavisinde potansiyel bir alternatif olabileceği kanısına varılmıştır. Ancak molekülün etkinliğinin tam olarak ortaya konulabilmesi için *in vivo* ve ileri düzey çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Yazar Katkısı

Çalışma konusu dizaynı, çalışmanın takibi ve sonuçların değerlendirilmesinde M.Mustafa İşgör, çalışmanın yürütülmesi, deneylerin ve analizlerin gerçekleştirilmesi, verilerin eldesi ve makale yazımı kısımlarında Meryem Nur Atabay makaleye katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- Abujah CI, Ogbonna AC, Osuji CM, 2015. Functional Components and Medicinal Properties of Food: A Review. *J. Food Sci. Technol.*, 52: 2522–2529.
- Aristatile B, Al-Numair KS, Al-Assaf AH, Pugalendi KV, 2011. Pharmacological Effect of Carvacrol on D-Galactosamine Induced Mitochondrial Enzymes and DNA Damage by Single Cell Gel Electrophoresis. *Journal of Natural Medicines*, 65(3–4): 568–577.
- Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G, 2000. Fatty Infiltration of Liver in Hyperlipidemic Patients. *Dig Dis Sci*, 45: 1929–1934.
- Bakır M, Geyikoglu F, Colak S, et al., 2016. The Carvacrol Ameliorates Acute Pancreatitis-Induced Liver Injury via Antioxidant Response. *Cytotechnology*, 68: 1131–1146.
- Brown KE, Broadhurst KA, Mathahs MM, et al, 2005. Immunodetection of Aldose Reductase in Normal and Diseased Human Liver. *Histol Histopathol*, 20: 429–436.

- Can Baser K, 2008. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *CPD*, 14: 3106–3119.
- Chalasanani N, Younossi Z, Lavine JE, et al, 2012. 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*, 55(6): 2005–2023.
- Chen T, Shi D, Chen J, Yang Y, Qiu M, Wang W, Qiu L, 2015. Inhibition of Aldose Reductase Ameliorates Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice via Modulating The Phosphorylation of Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α . *Mol Med Rep*, 11(1): 303-8.
- Chenet AL, Duarte AR, de Almeida FJS, Andrade CMB, de Oliveira MR, 2019. Carvacrol Depends on Heme Oxygenase-1 (HO-1) to Exert Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Mitochondria Related Protection in The Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line Exposed to Hydrogen Peroxide. *Neurochem Res*, 44(4): 884-896.
- Cortas NK, Wakid NW, 1990. Determination of Inorganic Nitrate in Serum and Urine by A Kinetic Cadmium-Reduction Method. *Clin Chem*, 36(8 Pt 1):1440-3.
- Cusi K, 2009. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Opinion in Endocrinology. Diabetes and Obesity*, 16(2): 141–149.
- De Santana Souza MT, Teixeira DF, de Oliveira JP, Oliveira AS, Quintans-Júnior LJ, Correa CB, Camargo EA, 2017. Protective Effect of Carvacrol on Acetic Acid-Induced Colitis. *Biomed Pharmacother*. 96: 313-319.
- Donati G, Stagni B, Piscaglia F, Venturoli N, Morselli-Labate AM, Rasciti L, et al., 2004. Increased Prevalence of Fatty Liver in Arterial Hypertensive Patients with Normal Liver Enzymes: Role of Insulin Resistance. *Gut*, 53: 1020–1023.
- Du WX, Olsen CW, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH, Levin CE, Friedman M, 2008. Antibacterial Activity Against E.Coli O157:H7, Physical Properties, and Storage Stability of Novel Carvacrol-Containing Edible Tomato Films. *Journal of Food Science*, 73(7) : M378–M383.
- Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, et al., 2006. Long-Term Follow-Up of Patients with NAFLD and Elevated Liver Enzymes. *Hepatology*, 44: 865–873.
- Fan K, Li X, Cao Y, Qi H, Li L, Zhang Q, Sun H, 2015. Carvacrol Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cells. *Anticancer Drugs*, 26(8): 813-23.
- Gonzalez-Paredes FJ, Hernandez Mesa G, Morales Arraez D et al., 2016. Contribution of Cyclooxygenase End Products and Oxidative Stress to Intrahepatic Endothelial Dysfunction in Early Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One*, 11(5): e0156650.
- Guimarães AG, Oliveira GF, Melo MS, Cavalcanti SC, Antonioli AR, Bonjardim LR, Quintans-Júnior L.J, 2010. Bioassay-Guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 107(6): 949–957.
- Hong JK, Yun BW, Kang JG, Raja MU, Kwon E, Sorhagen K, et al., 2008. Nitric Oxide Function and Signalling in Plant Disease Resistance. *J. Exp. Bot.*, 59: 147–154.
- Hussein J, El-Banna M, Mahmoud KF, et al., 2017. The Therapeutic Effect of Nano-Encapsulated and Nano-Emulsion Forms of Carvacrol on Experimental Liver Fibrosis. *Biomed Pharmacother.*, 90: 880–887.
- Iwakiri Y, Grisham M, Shah V, 2008. Vascular Biology and Pathobiology of The Liver: Report of A Single-Topic Symposium. *Hepatology*, 47(5): 1754–1763.

- Jarukamjorn K, Jearapong N, Pimson C, Chatuphonprasert WA, 2016. High-Fat, High-Fructose Diet Induces Antioxidant Imbalance and Increases The Risk and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Scientifica (Cairo)*, 2016:5029414.
- Jukic M, Politeo O, Maksimovic M, Milos M, Milos M, 2007. In Vitro Acetylcholin Esterase Inhibitory Properties of Thymol, Carvacrol and Their Derivatives Thymoquinone and Thymohydroquinone. *Phytother Res*, 21(3):259-61.
- Khan I, Bhardwaj M, Shukla S, Min SH, Choi DK, Bajpai VK, Huh YS, Kang SC, 2019. Carvacrol Inhibits Cytochrome P450 and Protects Against Binge Alcohol-Induced Liver Toxicity. *Food Chem Toxicol*, 131: 110582.
- Kotronen A, Yki-Jarvinen H, 2008. Fatty Liver: A Novel Component of The Metabolic Syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28: 27–38.
- Lima Mda S, Quintans-Júnior LJ, de Santana WA, MartinsKaneto C, PereiraSoares MB, Villarreal CF, 2013. Anti-Inflammatory Effects of Carvacrol: Evidence For a Key Role of Interleukin-10. *Eur J Pharmacol*, 699(1-3): 112-7.
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al., 2001. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Feature of The Metabolic Syndrome. *Diabetes*, 50: 1844–1850.
- Markus HB, Raducha M, Harris H, 1983. Tissue Distribution of Mammalian Aldose Reductase and Related Enzymes. *Biochemical Medicine*, 29(1): 31–45.
- Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN, 1999. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clin. Biochem.*, 32: 595-603.
- Mohebbati R, Paseban M, Soukhtanloo M, Jalili-Nik M, Shafei MN, Yazdi AJ, Rad AK, 2018. Effects of Standardized Zataria Multiflora Extract and Its Major Ingredient, Carvacrol, on Adriamycin-Induced Hepatotoxicity in Rat. *Biomed J*, 41(6): 340-347.
- Mohseni R, Karimi J, Tavilani H, Khodadadi I, Hashemnia M, 2019. Carvacrol Ameliorates The Progression of Liver Fibrosis Through Targeting of Hippo and TGF- β Signaling Pathways in Carbon Tetrachloride (CCl₄) Induced Liver Fibrosis in Rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 41(1):163-171.
- Papachristou F, Chatzaki E, Petrou A, et al, 2013. Time Course Changes of Anti- and Pro-Apoptotic Proteins in Apigenin-Induced Genotoxicity. *Chin Med* 8: 9.
- Qiu L, Cai C, Zhao X, Fang Y, Tang W, Guo C, 2017. Inhibition of Aldose Reductase Ameliorates Ethanol-Induced Steatosis in Hepg2 Cells. *Mol Med Rep*, 15(5): 2732-2736.
- Qiu L, Lin J, Xu F, Gao Y, Zhang C, Liu Y, Luo Y and Yang JY, 2012. Inhibition of Aldose Reductase Activates Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and Ameliorates Hepatosteatorosis in Diabetic Db/Db Mice. *Exp Diabetes Res*, 2012: 789730.
- Qiu L, Lin J, Ying M, Chen W, Yang J, Deng T, Chen J, Shi D, Yang JY, 2013. Aldose Reductase is Involved in The Development of Murine Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis. *PLoS One*. 8(9):e73591.
- Sedlak J, Lindsay RH, 1968. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. *Anal Biochem*, 25(1):192-205.
- Spahis S, Delvin E, Borys JM, Levy E, 2017. Oxidative Stress As a Critical Factor in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. *Antioxid Redox Signal.*, 26(10):519-541.
- Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M, 2015. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 55(3): 304-18.

- Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, et al., 2007. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Its Association with Cardiovascular Disease Among Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care*,30: 1212–1218.
- Xu J, Zhang J, Cai S, Dong J, Yang JY, Chen Z, 2009. Metabonomics Studies of Intact Hepatic and Renal Cortical Tissues from Diabetic Db/Db Mice Using High-Resolution Magic-Angle Spinning ¹H NMR Spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(6-7): 1657–1668.
- Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A, Uygun A, Cakir E et al., 2005. Systemic Markers of Lipid Peroxidation and Antioxidants in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Gastroenterol*, 100:850-5.
- Yin QH, Yan FX, Zu XY, Wu YH, Wu XP, Liao MC, Deng SW, Yin LL, Zhuang YZ, 2012. Antiproliferative and Proapoptotic Effect of Carvacrol on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG-2. *Cytotechnology*, 64(1): 43-51.