



İn vitro lipopolisakkarit uyarımlı karaciğer yangı modelinde Alfa-Terpineol'ün etkinliğinin araştırılması

Ayşe Pınar Tunçer¹ , Altuğ Küçükgül^{2*} , Mehmet Mustafa İşgör³ 

^{1,2,3} Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya AD, Hatay, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 12.01.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 21.03.2022

Özet: Terpinoller monoterpen bileşikler olup, birçok çalışmada antioksidan özelliklerinden dolayı antikanser, antikonvulsant ve antiülser gibi biyolojik etkileri ortaya konulmuştur. Araştırmanın amacını, LPS'in karaciğer hücrelerine uygulanarak oluşturulan yangı modelinde, α -terpineol'ün antiinflamatuvar ve antiapoptotik biyofonksiyonlarının araştırılması oluşturmıştır. Denemede insan orijinli HepG2 (ATCC® HB-8065) hücreleri materyal olarak seçilmiştir. LPS ve α -terpineol, hücrelere farklı konsantrasyonlarda 24 saat uygulanmıştır ve etkin konsantrasyonları, hücre canlılık testleriyle (MTT) gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, TNF- α , IL-1 β , IL-10, Kaspaz 3, Bax ve Bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri tam zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) araştırılmıştır. LPS'in 50 ng/ml konsantrasyonu %11,5 oranında hücre kayıplarına neden olduğu belirlenmiş ve modelleme için bu konsantrasyon seçilmiştir. Ancak, 10 μ M konsantrasyonda α -terpineolün hücre kayıplarını % 2.12 oranında önlediği bulunmuştur. Çalışmada, LPS'in TNF- α ve IL-1 β gen ekspresyonlarını arttırdığı, α -terpineol uygulamasının ise bu durumu tersine çevirdiği tespit edilmiştir. Yine, IL-10 gen ekspresyonu yüksek LPS konsantrasyonu ile baskılanırken, α -terpineol tarafından anlamlı düzeyde uyarıldığı da ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, LPS'in kaspaz 3 ve Bax gen ekspresyonlarını arttırdığı, ancak α -terpineol'ün bu stimülasyonu baskıladığı tespit edilmiştir. Bcl-2 gen ekspresyonları ise LPS tarafından baskılanırken, α -terpineol tarafından uyarıldığı bulunmuştur. Özetle, α -terpineol'ün kısa süreli ve düşük olan proliferatif konsantrasyonunun özellikle patojen kaynaklı karaciğer rahatsızlıklarında alternatif bir tedavi ajanı olabileceği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: α -terpineol, apoptoz, inflamasyon, lipopolisakkarit

Investigation of the efficiency of Alpha-Terpineol in the in vitro lipopolisaccharide stimulated liver inflammation model

Abstract: Terpeneols are monoterpene compounds, and biological effects like anticancer, anticonvulsant and antiulcer have been demonstrated in many studies due to their antioxidant properties. The aim of the research was to investigate the anti-inflammatory and antiapoptotic biofunctions of α -terpineol in LPS induced inflammation model of liver cells. HepG2 (ATCC® HB-8065) cells of human origin were selected as material. LPS and α -terpineol were applied to cells at different concentrations for 24 hours, and their effective concentrations were determined by cell viability tests (MTT). Afterwards, gene expression levels of TNF- α , IL-1 β , IL-10, Caspase 3, Bax and Bcl-2 were investigated by qRT-PCR method. LPS at 50 ng/ml, caused 11.5% cell loss and was chosen for modeling. However, α -terpineol at 10 μ M concentration prevented 2.12% of cell loss. In the study, LPS increased TNF- α and IL-1 β gene expressions, and α -terpineol application reversed this situation. Again, while IL-10 was suppressed by high LPS concentration, it was significantly stimulated by α -terpineol. Besides, LPS increased caspase 3 and Bax gene expressions, but α -terpineol suppressed this stimulation. Bcl-2 gene expressions were suppressed by LPS and stimulated by α -terpineol. In summary, short-term and low proliferative concentration of α -terpineol can be an alternative treatment agent, especially in pathogen-induced liver disorders.

Keywords: α -terpineol, apoptosis, inflammation, lipopolysaccharide

Giriş

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı en yaygın görülen karaciğer hastalığıdır ve dünya nüfusunun yaklaşık % 25'inde görülmektedir (Younossi ve ark. 2016). Hastalığın gelişiminde obezite ve hareketsiz bir yaşam tarzı, besin alımının bileşimi (örn. Mısır şurubundaki fruktoz), diyabet, insülin direnci, disbiyoz ve genetik yatkınlıklar gibi çeşitli faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir (Machado ve

ark. 2016). Hepatositlerde lipit ara maddelerinin birikimi, hepatosellüler lipotoksisteye neden olarak hücrel stres, işlev bozukluğu ve sonuç olarak da hücre ölümüne sebep olmaktadır (Hirsova ve ark. 2015). Lipopolisakkarit gram negatif bakterilerin hücre dışı membranında bulunan ve endotoksin olarak adlandırılan bir moleküldür (Wolff 1904). LPS, bağlayıcı proteinine bağlanarak myeloid farklılaşma faktörünü ve CD 14 uyarımlarını gerçekleştirerek,

Yazışma adresi / Correspondence: Altuğ Küçükgül, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya AD, Hatay-Türkiye e-posta: altugkucukgul@hotmail.com

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0001-8198-2760 • ²0000-0003-4387-6814 • ³0000-0002-1729-4717

TLR4 yolağını aktiveştirir. Bu yolun uyarımı TNF- α (Tümör nekroz faktör alfa), IL-6 (interlökin 6), IL-12 (interlökin 12), ve IL-1 β (interlökin 1 beta), gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salınımına neden olarak etkilenen dokuda yangıyı uyarır (Yang ve ark. 2000).

Terpineoller doğal olarak bulunabilen doymamış monosiklik mono-terpenoid alkollerdir. Bu bileşikler nergis ve frezya gibi çiçeklerde, mercanköşk, kekik, biberiye ve limon gibi bitkilerde yaygın olarak bulunurlar (Bauer ve ark. 2001; Sell 2003). Terpineoller, özellikle α -Terpineol ve Terpinen-4-ol olarak en sık kullanılan bileşikler olup, insanlar, hayvanlar ve ayrıca bitkiler üzerinde çok çeşitli farklı biyolojik etkiler göstermektedirler. Sadece parfüm, kozmetik ve ev temizlik ürünlerinde değil aynı zamanda yiyecek ve içeceklerin tatlandırılmasında da kullanılan popüler koku bileşenleridir. Aynı zamanda çeşitli önemli biyolojik ve tıbbi özelliklere de sahiptirler (Sales ve ark. 2020). Son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında, bu bileşiğin anti-hipertansif (Sabino ve ark. 2013), antiproliferatif (Lampronti ve ark. 2006), antiinflamatuvar (Held ve ark. 2007), antioksidan (Brand ve ark. 2001), antiülser (Khaleel ve ark. 2018) ve antikarsinojenik (Hassan ve ark. 2010) gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu görülmüştür.

Verilen bu bilgilerin ışığında, araştırmada E.coli'den izole edilen LPS'in karaciğer hücrelerine etkin konsantrasyonda uygulanarak oluşturulan yangı modelinde alfa terpineolün antiinflamatuvar ve antiapoptotik gibi biyofonksiyonlarının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü

Araştırmada materyal olarak sürekli hücre hattı HepG2 (ATCC® HB-8065™) hücreleri kullanıldı. Hücreler daha sonra içeriğinde % 10 oranında ısı maruziyetli fetal siçir serumu (FBS) ve penisilin/ streptomisin/amfoterisin B karışımı bulunan, düşük glikoz konsantrasyonlu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's) kültür vasatında üretildi. Çalışma grupları her bir kuyucuğa ml'de 1×10^6 hücre gelecek şekilde oluşturuldu. Deneme Kontrol (K), LPS uygulanan grup (L), α -Terpineol uygulanan grup (T), LPS ile birlikte α -Terpineol uygulanan grup (T+L) olmak üzere 4 gruptan oluşturuldu.

Uygulamada kullanılan etken maddeler ve viyabilite testleri

Araştırmada *Escherichia coli* O111:B4 suşundan elde edilen lipopolisakarit (LPS- Sigma, EU) ve α - terpineol (Sigma, EU) ticari olarak temin edildi ve hü-

re besiyerlerinde çözdürülerek çalışmada kullanıldı. Hücrelere farklı konsantrasyonlarda LPS (1, 10 ve 50 ng/ml) ve α -terpineol (10, 25 ve 50 μ M) 24 saat süreyle uygulanarak, bu maddelerin etkin konsantrasyonları Küçükgül ve Erdoğan (2014); rapor ettiği metod takip edilerek, MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) viyabilite testleriyle tespit edildi.

RNA izolasyonu ve qRT-PCR

İnkübasyon sonu hücrelerden mRNA eldesi RNA izolasyon reaktifi ile üretici firmanın protokolü takip edilerek gerçekleştirildi (Trizol, Sigma,,EU). RNA miktarı ve saflığı (OD260/OD280 nm oranı) spektrofotometrede (UV mini 1240, Shimadzu, JP) belirlendi. PCR reaksiyonu için cDNA sentezi ve PCR basamaklarını birlikte gerçekleştirebilecek "tek basamak özellikli ve "syber green" problu ticari kit temin edildi. (Verso-one step Sybr green master mix, Thermo, EU). Araştırılan genlere spesifik bir çift primerler (**β -actin, Forward** 5'-CGT GGC CAT CTC TTG CTC GAA G-3',reverse, 5'-CAT CGT CAC CAA CTG GGA CGA C-3'; **Kaspaz 3 Forward** 5'-TTT GGGG AGT AGA TTG CAG GG-3', reverse, 5'-TGC ACA TCC ACG ATT TGA TT-3' ; **IL-1 β Forward** 5'-GGT CAT TCT CCT GGA AGG AGG TCT GTG GGC -3',reverse, 5'-GCA AGG GCT TCA GGC AGG CCG CG-3'; **TNF- α Forward** 5'-CAG AGG GAA GAG 5'-TTC CCC AG-3', reverse 5'-CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG-3'; **Bax Forward** 5'-GTT TCA TCC AGG ATC GAG CAG-3', reverse 5'-CAT CTT CTT CCA GAT GGT GA-3'; **Bcl-2 Forward** 5'-CCT GTG GAT GAC TGA GTA CC-3', reverse 5'-GAG ACA GCC AGG AGA AAT CA-3'; **IL-10 Forward** 5'-AAG TCT CAA GGG GCT GGG TCA GCT A-3', reverse 5'-ATG CCC CAA GCT GAG ACC CAA GAC CCA-3')ilave edilerek thermal saykırda (Bio RAD CFX96) cDNA (tamamlayıcı DNA) dönüşümünü takiben ve PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Elde edilen verilerle DDCT = (Cthedef gen – Ctbeta actin) denek grubu – (Cthedef gen – Ctbeta actin) kontrol grubu formülü kullanılarak, her bir gen için 2-DDCT formülünde yerine konularak mRNA transkripsiyon düzeyi misli olarak baskılanma ya da uyarılma şeklinde belirlendi.

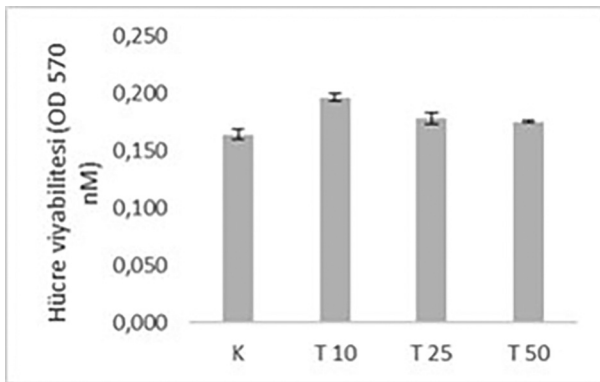
İstatistiksel Metot

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

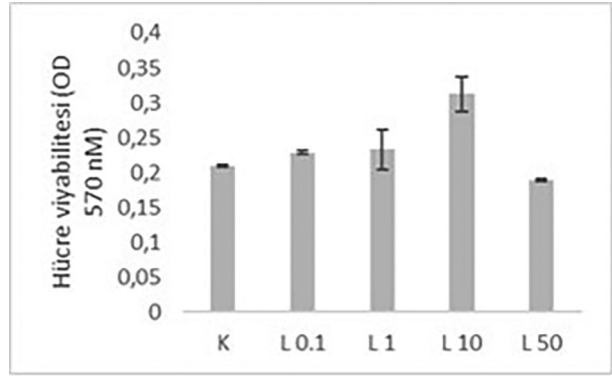
Bulgular

Hücre canlılığı test sonuçları

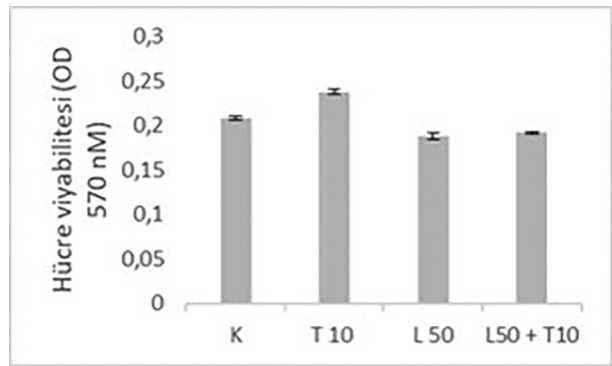
HepG2 hepatomalara farklı konsantrasyonlarda LPS ve α -terpineol 24 saat süreyle uygulandı. İnkübasyon süresi sonrası kuyucuklardaki hücrelerin viyabilite kontrolleri MTT yöntemiyle gerçekleştirildi. Kontrol grubu ($0,164 \pm 0,009$) ile karşılaştırıldığında α -terpineol'ün 10, 25 ve 50 μ m konsantrasyonlarında, hücre sayısını % 20 ($0,196 \pm 0,007$), % 8 ($0,178 \pm 0,01$) ve % 6.6 ($0,175 \pm 0,02$) oranlarında arttırdığı tespit edildi ($p < 0,05$) (Şekil 1). Hücre canlılık testlerine göre karaciğer hücrelerine uygulanan LPS, kontrol grubuna ($0,209 \pm 0,04$) göre düşük konsantrasyonlarda (0,1, 1 ve 10 ng/ml) hücre sayısını sırasıyla % 9 ($0,228 \pm 0,05$), % 11 ($0,233 \pm 0,64$) ve % 49 ($0,312 \pm 0,64$) oranlarında arttırdığı tespit edildi. Ancak LPS'in yüksek konsantrasyonunun (50 ng/ml) hücrelerde toksik etki yaparak % 11.5 ($0,188 \pm 0,04$) oranında kayıplara neden olduğu ortaya konuldu ($p < 0,05$). Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak etkin konsantrasyonun 50 ng/ml olarak seçildi ve çalışmanın devamında bu konsantrasyon referans olarak kullanıldı (Şekil 2). Etkin konsantrasyonda LPS ve α -terpineol'ün hücre üzerine etkilerine bakıldığında kontrol grubuna göre ($0,209 \pm 0,05$) LPS 50 ng/ml konsantrasyonda uygulanan grupta ($0,188 \pm 0,07$) hücre canlılığının %10 düzeyinde kayıplara neden olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). Bununla birlikte, LPS ile birlikte α -terpineol (10 μ m) uygulanan grup ($0,192 \pm 0,04$) ile LPS grubu karşılaştırıldığında hücre kayıplarında %2.12 düzeyinde geri çevirme olduğu ortaya konulmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 3).



Şekil 1. Alfa-terpineol uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkileri



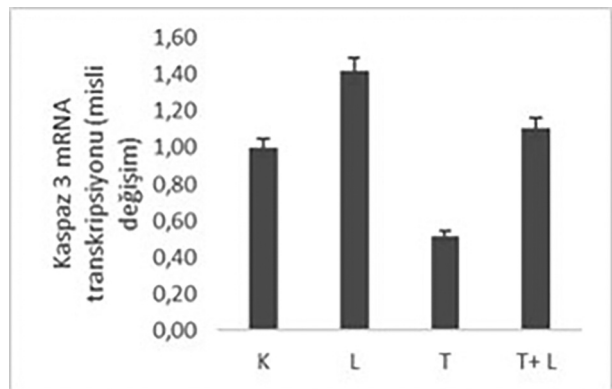
Şekil 2. LPS uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkileri



Şekil 3. Etkin konsantrasyonlardaki LPS ve α -terpineol uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkileri

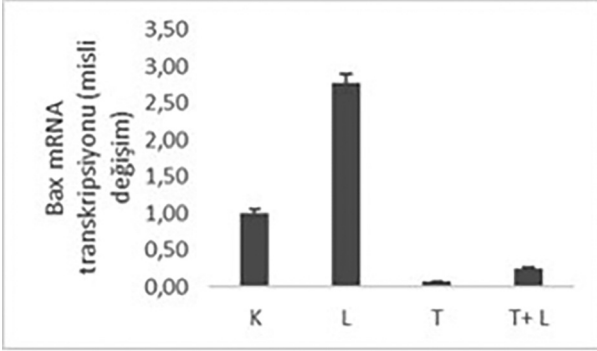
Gen ekspresyon analiz sonuçları

Araştırmada etkin konsantrasyonda α -terpineol'ün kontrol grubuna göre kaspaz 3 ekspresyonunu yaklaşık 2 kat baskıladığı tespit edilirken, LPS'in kaspaz 3 düzeyini kontrol grubuna göre 1,42 kat uyardığı bulundu. Bununla birlikte α -terpineolün LPS ile aynı zamanlı uygulanan grupta bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında, bu artışın 1,28 kat misli değişimlerle baskılandığı ortaya konuldu (Şekil 4).



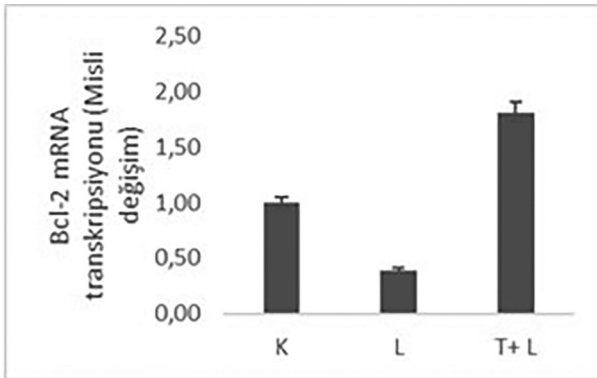
Şekil 4. Deneme gruplarındaki Kaspaz 3 gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).

Ayrıca, α -terpineol uygulanan grupta kontrol grubuna göre Bax ekspresyonunun 14 kat baskılandığı tespit edildi. Çalışmada gen ekspresyon analizlerine göre etkin konsantrasyondaki LPS'in Bax düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 2.78 kat arttırdığı bulundu. Alfa-terpineolün LPS ile aynı zamanlı uygulanan grupta ise bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında 11.4 kat misli değişimlerle baskılandığı ortaya konuldu (Şekil 5).



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

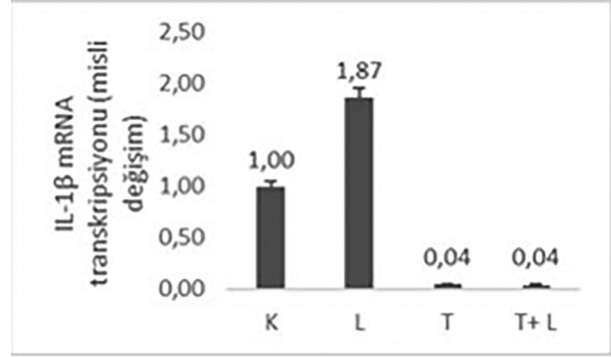
Çalışmada, gen ekspresyon analizlerine göre LPS uygulananı Bcl-2 düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 2.6 kat azaltırken α -terpineol ile birlikte LPS uygulananı bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında 4.6 kat misli değişimlerle arttırdığı ortaya konuldu (Şekil 6).



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

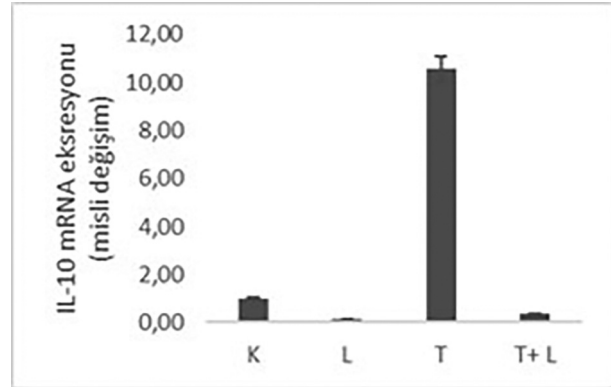
Bunun yanısıra, α -terpineol uygulanan grupta kontrol grubuna IL-1 β ekspresyonu 25 kat baskılandığı LPS'in IL-1 β düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 1.87 kat uyardığı bulundu. Alfa-terpineolün LPS ile uygulandığı grupta ise bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıl-

dığında yaklaşık 50 kat misli değişimlerle baskılandığı tespit edildi (Şekil 7).



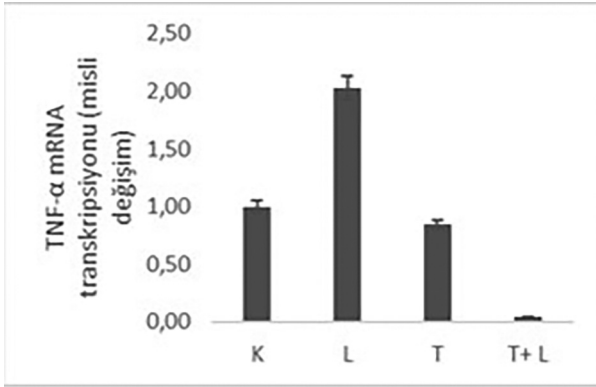
Şekil 7. Deneme gruplarındaki IL-1 β gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).

Alfa-terpineolün kontrol grubuna göre IL-10 ekspresyonunu 10.56 kat arttırdığı tespit edildi. Çalışmada gen ekspresyon analizlerine göre etkin konsantrasyondaki LPS'in IL-10 düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 8.33 kat azalttığı bulundu. Bununla birlikte α -terpineolün LPS ile aynı zamanlı uygulanan grupta bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında yaklaşık 3.08 kat misli değişimlerle uyardığı ortaya konuldu (Şekil 8).



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

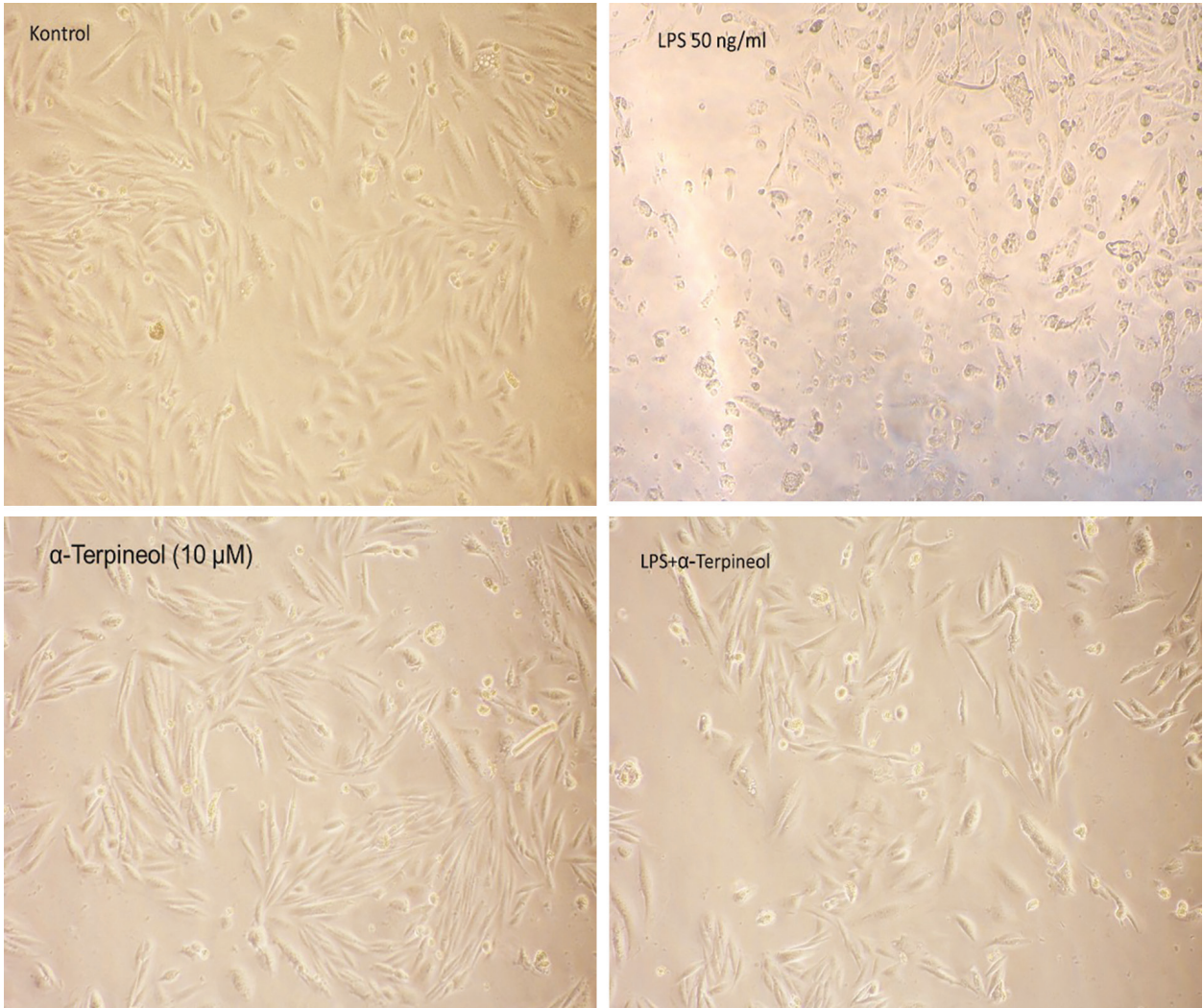
Araştırmada etkin konsantrasyonda α -terpineolün kontrol grubuna göre TNF- α ekspresyonunu 1.19 kat azalttığı tespit edilirken, LPS 'in TNF- α düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 2.03 kat arttırdığı bulundu. Bununla birlikte α -terpineolün LPS ile aynı zamanlı uygulanan grupta bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında yaklaşık 50 kat misli değişimlerle baskılandığı ortaya konuldu (Şekil 9).



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

Hücre Görüntüleri

Karaciğer hücrelerine LPS ve α -terpineol'ün 24 saat maruziyeti sonrası çalışma gruplarındaki hücreler invert mikroskopun (Olympus CK40,JP) 20x objektifiyle görüntüledi (Scala bar 1-50 nm.) Çalışmada kontrol hücrelerinin morfolojilerinin normal hepatosit yapısında oldukları ve flask tabanına homojen yayıldıkları görülmektedir. LPS uygulanan grupta hücrelerin morfolojik olarak deformasyona uğradığı ve bununla birlikte yoğun hücre kayıplarının olduğu görülmektedir. Çalışmada yalnız α -terpineol eklenen grup hücrelerinin gerek morfoloji gerekse de yoğunluk olarak kontrol hücrelerine yakın olduğu görülmektedir. Diğer bir sonuç, LPS+terpineol grubu sadece LPS uygulanan gruptaki hücrelerle kıyaslandığında, LPS'in meydana getirdiği morfoloji ve yoğunluk değişimlerini dikkate değer bir şekilde iyileştirdiği görülmektedir (Şekil 10).



Şekil 10. LPS ve α -terpineol uygulanan hücre görüntüleri (20 x, skala bar 1-50 nm).

Tartışma ve Sonuç

Son 10 yılda yapılan birçok çalışmada, bağırsak mikrobiyotası ile obezite /insülin direnci arasında nedensel bir bağlantı kurulmuştur. Ayrıca diyetle indüklenen obezitenin bağırsak mikrobiyotasına bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla insülin direncini arttırdığı da bilinmektedir. Bağırsak florası bakterilerinden gelen LPS, TLR4 aktivasyonu ile insülin direncine yol açan kronik subklinik inflamatuvar süreci başlatmakta ve obeziteye sebep olmaktadır. Araştırmamızda elde ettiğimiz hücre canlılık testlerinde etkin konsantrasyonda LPS'in hücre kayıplarına neden olduğu, ancak yine etkin konsantrasyonda uygulanan α -terpineol'ün bu kayıpları anlamlı derecede azalttığı ortaya konulmuştur. Bununla birlikte literatür tarandığında tespit ettiğimiz etkin konsantrasyonun (10 μ M) birçok çalışmaya göre kısa süreli kullanımı ve daha düşük konsantrasyonda olduğu görüldü. Birçok çalışmada, α -terpineol'ün çalışmamızdakinden yüksek konsantrasyonlarda uygulananının göreceli olarak karaciğer yağlanmasına sebep olduğu rapor edilmiştir. Örneğin; Choi ve ark. (2013); yaptıkları *in vivo* çalışmada farelere 2 hafta süreyle 100 μ g/ml konsantrasyonda oral olarak α -terpineol verdiklerinde karaciğer dokusunda yağ infiltrasyonu olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda viyabilite analizleri verilerine benzer olarak, birçok çalışmada LPS'in farklı hücre tiplerine sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Stone ve ark. 2003; Nishio ve ark. 2013; Shi ve ark. 2016; Ting ve ark. 2019). Konu ile ilgili literatür tarandığında hücre canlılık testi sonuçları büyük oranda homoloji göstermektedir.

Araştırmada LPS'in karaciğer hücrelerinde pro inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β ve TNF- α) gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde uyardığı tespit edildi. Çalışmada diğer bir sitokin olan ve anti inflamatuvar yanıtta rolü bulunan IL10 ekspresyonu LPS tarafından baskılanmıştı. Yine araştırmada yangı parametrelerindeki bu olumsuz tablo α -terpineol tarafından anlamlı düzeyde iyileştirildiği de görüldü. Çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasının çeşitli mekanizmalar yoluyla NAFLD'ye katkıda bulunduğunu göstermektedir (Chalasanı ve ark. 2018). Bunlar enerji homeostazının düzenlenmesi için kısa zincirli yağ asitleri karbonhidrat fermantasyonu yoluyla karaciğerde de novo lipogenezi indüklenmesi (Lucas ve ark. 2018) endokannabinoid sistemin modülasyonu (Armstrong vd. 2014); çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) ve karaciğer lipid ihracatının sentezi için gerekli kolin metabolizmasının modülasyonu (Ashtari ve ark. 2015); safra asidi homeostazının modülasyonu

(Buzzetti ve ark. 2016); endojen etanol oluşumu ve (Mazzotti ve ark. 2016) karaciğer makrofajlarında pro-enflamatuar sitokinlerin üretimini aktive eden ve hepatositlerin iltihaplanmasına neden olan lipopolisakkaritin (LPS) artışı olarak sıralanabilir (Poeta ve ark. 2017). Gram negatif bakterilerin hücre duvarı bileşeni olan LPS'in, TNF- α ve IL-6, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz 2 (COX2) ve nükleer faktör-kappaB gibi birçok enflamatuar aracı molekülün ekspresyonu için sinyalleme kaskatını başlattığı bilinmektedir (Rossol ve ark. 2011). Bağırsak mikrobiyotası ve bağırsak bariyeri bozulma olaylarının özünde PRR'lerin aktivasyonu ile IL-1 IL, IL-6 ve TNF- α gibi sitokinlerin üretiminin ve ekspresyonunun uyarılması bulunmaktadır (Buzzetti ve ark. 2016). Aynı zamanda, enflamasyonu, metabolizmayı, hücre canlılığını ve çeşitli sitokinlerin üretimini düzenleyen nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B)'nin hücre içi enflamatuar yolunu aktive eder. Hem TNF- α hem de NF- κ B aktive edilir ve birlikte insülin direncini arttırmalar ve karaciğer iltihabına katılırlar (Duarte ve ark. 2015). Sitokin salınımının yanı sıra, TLR aktivasyonu; NF- κ B hücre içi enflamatuar yolunu uyararak, insülin direncine ve obeziteye neden olan makrofajların stimülasyonunu indükler (Chakraborti 2015). İnsülin direnci ve obezite varlığı, vücut tarafından daha fazla serbest lipid metaboliti üretildiği ve daha fazla pro-inflamatuar sitokinlerin dolaştığı anlamına gelir. Pro-inflamatuar sitokinler ve lipotoksisite faktörleri hepatositlerde inflamasyon, apoptoz ve fibrozisin gelişmesine katkıda bulunur (Buzzetti ve ark. 2016).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı'nda NF- κ B aktivasyonunun en çok parankimal olmayan hücrelerde görüldüğü, TNF- α , IL-1 β ve diğer sitokinlerin aktivasyonu yoluyla hücrelerde pro-enflamatuar yolların uyarımı gerçekleştiği bilinmektedir (Dela Peña ve ark. 2005). Sousa ve ark. (2020); α -terpineol enantiyomerlerinin yüksek yağlı diyet uygulanan farelerde antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerini araştırdıkları çalışmada 50mg/kg α -terpineol'ün pro-inflamatuar sitokinlerden TNF- α ve IL-1 β serum düzeylerini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Cintira ve ark. (2008); yaptıkları fare NAFLD modelinde, antikor veya antisens oligonükleotitler kullanılarak IL-10 inhibisyonunun, karaciğerdeki TNF- α ve IL-6 ekspresyonunu uyardığı ve insülin direncini arttırdığı gözlemlenmiştir. Yine, Nogueira ve ark. (2014); yaptıkları makrofajlarda α -terpineol'ün özellikle LPS uyarımlı proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 β ve TNF- α artan düzeylerini baskıladığını rapor etmişlerdir. α -terpineol'ün enflamatuar medyatörlerin üretimini baskıladığı ve bu etkiyi NF- κ B, p38 veya ERK/MAPK

yalokları üzerinden gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Nogueira ve ark. 2014). Bir diğer çalışmada ise De Oliveira ve ark. (2012); α -terpineolün sitokin kaskadını inhibe ettiği, TNF- α ve IL-1 β gibi enflamatuar medyatörlerin üretimini azalttığı ve NO salımını inhibe ettiği, böylelikle de antienflamatuar ve antihipertensif etkinlik gösterdiği bildirilmiştir

Araştırmamızda karaciğer hücrelerinde LPS'in kaspaz 3 ve bax gibi proapoptotik parametreleri uyardığı, bununla birlikte anti apoptotic olan Bcl-2gen ekspresyonunu ise baskılayarak hücre kayıplarına neden olduğu tespit edildi. Yine koruyucu etken madde olarak α -terpineol'ün bu olumsuz durumu geri çevirerek hücreleri kurtardığı da yapılan gen ekspresyon analizleriyle ortaya konuldu. İnflamatuar yanıt faktörleri hücre içi NF κ B ve AP-1 aktivasyonuna neden olarak TNF- α transkripsiyonunu tetikler ve apoptoz sürecinin başlamasına neden olur (Bubici ve ark. 2004). Zhu ve ark. (2006); LPS gibi faktörlerin uyarımıyla TNF- α reseptörüne bağlandığında kaspaz 3'ü dolaylı olarak kaspaz 8 üzerinden uyurabildiği gibi doğrudanda uyararak mitokondriyal membran permeabilitesini bozarak sitokrom c'nin sitoplazmaya translokasyonunu uyararak intrinsik apoptozu tetiklediğini rapor etmişlerdir. Bax proteininin mitokondriye translokasyonu apoptozda kritik bir adımdır (Valentijn ve ark. 2003). Bax genelde sitozolda bulunur. Ancak apoptoz sürecinde protein Bcl2/Bcl xl proteinleriyle interaksyona girerek onların mitokondriye geçişlerini engeller (Capano ve ark. 2002). Zhang ve ark. (2007); yaptıkları çalışmada nöron hücrelerine uyguladıkları TNF- α 'nın bax stimülasyonuna neden olarak apoptozu indüklediklerini rapor etmişlerdir. Pourbakhsh ve ark. (2014); yaptıkları etanol uyarımlı karaciğer harabiyeti modelinde içeriğinde terpineol bulunan *Nigella sativa* bitkisinin esansiyel yağlarının Bax ekspresyonunu baskılayarak, Bcl-2 ekspresyonunu indüklediğini rapor etmişlerdir. Yine aynı çalışmada ekstrinsik apoptozunda baskılanmasında esansiyel yağların kaspaz 8'i baskılayarak etki gösterdiğide rapor edilmiştir. Araştırmanın tüm verileri dikkate alındığında karaciğer hücrelerinin LPS ile maruziyeti sonrası inflamasyon ve buna bağlı olarak apoptoz gelişmiştir. Bununla birlikte hücrelere proliferatif etkin konsantrasyonda uygulanan α -terpineol'ün ise inflamatuvar yanıt sitokinlerini baskılayarak yangıyı önlemiş ve buna bağlı olarak apoptozu engellediği görülmüştür.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde α -terpineolün mikrobiyota patojenleri tarafından meydana getirilen yangı ve hücre kayıplarına karşı alternatif bir etken madde olarak kullanılabilmesi kanısına varıldı. Bununla birlikte literatür tarandığında, tes-

pit ettiğimiz proliferatif etkin konsantrasyonun (10 μ M) birçok çalışmaya göre kısa süreli kullanımı ve daha düşük konsantrasyonda olduğu görüldü. Birçok çalışmada, α -terpineol'ün çalışmamızdakinden yüksek konsantrasyonlarda uygulanımının göreceli olarak karaciğer yağlanmasına sebep olduğu rapor edilmiştir. Ancak konunun tam aydınlatılabilmesi ve ortaya konulabilmesi için in vivo ve ileri düzey araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler: Bu çalışmanın yapılması amacıyla Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 05/09/2019 tarihinde (toplantı no:11, karar sayısı:15) etik kurul izni alınmıştır.

Teşekkürler: Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından 13/09/2019 tarihinde (toplantı no:20, karar sayısı:87) alınan kararlar doğrultusunda tez çalışması olarak desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Armstrong MJ, Adams LA, Canbay A, Syn WK. (2014) Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 59, 1174–1197.
- Ashtari S, Pourhoseingholi MA, Zali MR. (2015) Non-alcohol fatty liver disease in Asia: prevention and planning. *World J Hepatol*. 7, 1788–1796.
- Bauer K, Garbe D, Surburg H. (2001) *Common Fragrance and Flavor materials: Preparations, properties, and uses*. Fourth edition. New York: Wiley online books.
- Brand C, Ferrante A, Prager RH, Riley TV, Carson CF, Finaly-Jones JJ, et al. (2001) The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro. *Inflamm. Res*. 50(4), 213–219.
- Bubici C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G. (2004) NF-kappaB and JNK: An intricate affair. *Cell Cycle*. 3, 1524–9.
- Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. (2016) The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 65, 1038–1048.
- Capano M and Crompton M. (2002) Biphasic translocation of Bax to mitochondria. *Biochem J*. 367, 169–78.
- Chakraborti CK. (2015) New-found link between microbiota and obesity. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 6, 110–119.
- Chalasanani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, Harrison SA, Brunt EM, Sanyal AJ. (2018) The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 67, 328–357.
- Choi Y, Sim WC, Choi HK, Lee S, Lee BH. (2013) α -Terpineol induces fatty liver in mice mediated by the AMP-activated kinase and sterol response element binding protein pathway. *Food and Chemical Toxicology*. 55, 129–136.
- Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP, Moraes JC, de Souza CT, Milanski M, Morari J, Gambero A, Saad MJ and Velloso LA. (2008)

- Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *Journal of Hepatology*. 48, 628–637.
- De Oliveira MG, Marques RB, de Santana MF, Santos AB, Brito FA, Barreto EO, De Sousa DP, Almeida FR, Badauê-Passos D Jr, Antonioli AR, Quintans-Júnior LJ. (2012) α -terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 111(2), 120-5.
- Dela Peña A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G. (2005) NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology*. 129, 1663–1674.
- Duarte N, Coelho IC, Patarrão RS, Almeida JI, Penha-Gonçalves C, Macedo MP. (2015) How inflammation impinges on NAFLD: a role for Kupffer cells. *BioMed Res Int*. 2015, 984578.
- Hassan SB, Muhtasib HG, Goeransson H, Larsson R. (2010) Alpha-terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF- κ B signaling. *Anticancer Res*. 30(6), 1911-1920.
- Held S, Schieberle P, Somoza V. (2007) Characterization of alpha-terpineol as an anti-inflammatory component of orange juice by in vitro studies using oral buccal cells. *J. Agric. Food Chem*. 55(20), 8040-8046.
- Hirsova P and Gores GJ. (2015) Death receptor-mediated cell death and proinflammatory signaling in nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 1, 17–27.
- Khaleel C, Tabanca N, Buchbauer G. (2018) α -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. *Open Chem*. 16: 349–361.
- Kucukgul A and Erdogan S. (2014) Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects lung epithelial cells against H₂O₂-induced inflammation and oxidative stress. *HealthMED*. 8(3), 329-338.
- Lampronti I, Saab AM, Gambari A. (2006) Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *Int. J. Oncol*. 29(4), 989-995.
- Lucas C, Lucas G, Lucas N, Krzowska-Firych J, Tomasiewicz K. (2018) A systematic review of the present and future of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Hepatol*. 4, 165–174.
- Machado MV and Diehl AM. (2016) Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 150, 1769–77.
- Mazzotti A, Caletti MT, Sasdelli AS, Brodosi L, Marchesini G. (2016) Pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease: lifestyle-gut-gene interaction. *Dig Dis. Suppl* 1, 3–10.
- Nishio K, Horie M, Yoko MA, Hitoshi S, Yoshihisa I, Yasukazu H, Niki YE. (2013) Attenuation of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytotoxicity by tocopherols and tocotrienols. *Redox Biology*. 1(1):97-103.
- Nogueira MNM, Aquino SG, Rossa JC, Spolidorio DMP. (2014) Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1b, IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm. Res*. 63, 769–778.
- Poeta M, Pierri L, Vajro P. (2017) Gut-liver axis derangement in non-alcoholic fatty liver disease. *Children (Basel)*. 4(8), 66.
- Pourbakhsh H, Taghiabadi E, Abnous K, Timcheh Hariri A, Hosseini SM, Hosseinzadeh H. (2014) Effect of Nigella sativa fixed oil on ethanol toxicity in rats. *Iran J Basic Med Sci*. 17(12), 1020-1031.
- Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S. (2011) LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Critical Reviews in Immunology*. 31(5), 379-446.
- Sabino CK, Ferreria-Filho ES, Mendes MB, Da Silva-Filho JC, et al. (2013) Cardiovascular effects induced by α -terpineol in hypertensive rats. *Flavour Frag. J*. 28(5), 333-339.
- Sales A, Felipe LO, Bicas JL. (2020) Production, Properties, and Applications of α -Terpineol. *Food and Bioprocess Technology*. doi: 10.1007/s11947-020-02461-6.
- Sell C. (2003) A Fragrant Introduction to terpenoid chemistry, 1st ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Shi H, Yang YG, Binlin L, Xiaoyu SG, Lu YJS. (2016) The in vitro effect of lipopolysaccharide on proliferation, inflammatory factors and antioxidant enzyme activity in bovine mammary epithelial cells. *Animal Nutrition*. 2, 99-104.
- Sousa GM, Cazarin CBB, Maróstica Junior MR, et al. (2020) The effect of α -terpineol enantiomers on biomarkers of rats fed a high-fat diet. *Heliyon*. 6(4), e03752.
- Stone WL, Qui M, Smith M. (2003) Lipopolysaccharide enhances the cytotoxicity of 2-chloroethyl ethyl sulfide. *BMC Cell Biology*. 4, 1-7.
- Ting Ge Y, Zhong AQ, Xu GF, Lu Ying. (2019) Resveratrol Protects BV2 Mouse Microglial Cells Against LPS-induced Inflammatory Injury by Altering the miR-146a-5p/TRAF6/NF- κ B Axis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 41(5), 549-557.
- Valentijn AJ, Metcalfe AD, Kott J, Streuli CH, Gilmore AP. (2003) Spatial and temporal changes in Bax subcellular localization during anoikis. *J Cell Biol*. 162, 599-612.
- Wolff A, 1904. Über Grundgesetze der Immunität. *Zentralbl Bakteriol*. 37, 390–397.
- Yang H, Young DW, Gusovsky F and Chow JC. (2000) Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated tolllike receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J Biol Chem*. 275, 20861–20866.
- Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. (2016) Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 64, 73–84.
- Zhang L, Xing D, Liu L, Gao X, Chen M. (2007) TNF- α Induces Apoptosis Through JNK/Bax Dependent Pathway in Differentiated, but not Naïve PC12 Cells. *Cell Cycle*. 6(12), 1479-1486.
- Zhu J, Liu M, Kennedy RH, Liu SJ. (2006) TNF α -induced impairment of mitochondrial integrity and apoptosis mediated by caspase-8 in adult ventricular myocytes. *Cytokine*. 34, 96-105.