

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

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Eray ÖZGÜN

**ÖKALİPTOLÜN İNSAN KAYNAKLI HEPATOMA  
HÜCRELERİNDE PALMİTAT İLE OLUŞTURULAN  
HÜCRESEL HEPATOTOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Oğuz YOLYAPAN**

Referans no: 10560634

EDİRNE – 2023

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

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Eray ÖZGÜN

**ÖKALİPTOLÜN İNSAN KAYNAKLI HEPATOMA**  
**HÜCRELERİNDE PALMİTAT İLE OLUŞTURULAN**  
**HÜCRESEL HEPATOTOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Oğuz YOLYAPAN**

**Destekleyen Kurum: TÜBAP-2021/139**

EDİRNE – 2023



## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda bilgi ve tecrübeleri ile yanımda olan değerli danışman hocam Tıbbi Biyokimya AD öğretim üyesi Doç. Dr. Eray ÖZGÜN'e, Tıbbi Biyokimya AD Başkanı Prof. Dr. Hakan ERBAŐ'a, Tıbbi Biyokimya AD öğretim üyeleri Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, Prof. Dr. İlker DIBIRDIK'a ve Doç. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN'e, Tıbbi Biyokimya AD Arő. Gör. Tuğçe KARABAŐ ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Destekleyen Kurum: Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi (TÜBAP 2021/139).

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI</b> .....	3
<b>OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDANLAR</b> .....	5
<b>İNFLAMASYON VE NÜKLEER FAKTÖR κB (NF-κB)</b> .....	6
<b>ÖKALİPTOL</b> .....	7
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	8
<b>BULGULAR</b> .....	14
<b>TARTIŞMA</b> .....	24
<b>SONUÇLAR</b> .....	27
<b>ÖZET</b> .....	29
<b>SUMMARY</b> .....	31
<b>KAYNAKLAR</b> .....	33
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	38
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	39

## SİMGE VE KISALTMALAR

**EMEM:** Eagle'ın minimum esansiyel medyumu

**HO-1:** Hem oksijenaz-1

**MTT:** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

**NAFLD:** Non-alcoholic fatty liver disease

**NF-κB:** Nükleer faktör κB

**NRF2:** Nükleer faktör eritroid 2-ile ilişkili faktör 2

**ROT:** Reaktif oksijen türleri

## GİRİŞ VE AMAÇ

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD); alkol veya ilaç kullanımı, viral veya otoimmün hastalıklar gibi herhangi bir etiyolojik durum olmadan karaciğerdeki yağ birikimi olarak tanımlanmaktadır (1). Palmitat, yapısında 16 karbon içeren, doymuş bir yağ asididir ve sağlıklı bireylerin ve NAFLD hastalarının karaciğer dokusunda en fazla miktarda yer alan yağ asitlerinden biridir (2). HepG2 hücreleri, kökenini insan karaciğer hepatoma hücrelerinden alan, ticari olarak temin edilebilen ve fonksiyonel açıdan hepatositler ile benzerlikleri bulunan hücrelerdir (3). HepG2 hücrelerinin serbest yağ asidi ile oluşturulan yağlanma modellerinde, primer hepatositler ile benzer özellikler sergilediği belirtilmiş ve palmitat ile oluşturulan deneysel yağlanma modelinin, NAFLD'nin akut ve toksik etkilerinin araştırılması için uygun bir model olduğu bildirilmiştir (4).

Ökalyptol, özellikle okalyptüs yapraklarından elde edilen bir terpenoiddir (5). Ökalyptolün anti-inflamatuvar, antioksidan, ağrı kesici, antimikrobiyal ve antikanser özelliklere sahip olduğu farklı çalışmalarla gösterilmiştir (6,7).

Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik sonucu oluşan oksidatif stres, NAFLD patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (8). Nükleer faktör eritroid 2-ile ilişkili faktör 2 (NRF2), antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin ekspresyonunu artıran ve oksidatif stresin hücresel yanıtını oluşturan önemli bir transkripsiyon faktörüdür (9). NRF2 uyarıldığında sitoplazmadan nükleusa geçerek antioksidan genlerin transkripsiyonunu başlatır (10,11). Hem oksijenaz-1 (HO-1) enzimi hem proteininin metabolizmasında görevli bir enzimdir. HO-1'in hücresel savunmada görev aldığı bilinmektedir. HO-1 geninin en önemli transkripsiyonel düzenleyicisi NRF2'dir (12).

İnflamasyon; fiziksel hasar, iskemik hasar, enfeksiyon ve toksik maddelere maruz kalma gibi doku hasarına yol açan durumlara karşı vücudun verdiği yanıtıdır (13). Nükleer faktör  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) inflamasyonla ilişkili sitokinlerin düzenlenmesinde rol oynayan transkripsiyon faktörüdür (14).

Ökaliptolün palmitatın yol açtığı hepatotoksisite üzerine etkisi bilinmemekte olup, bu çalışmanın amacı; ökaliptolün insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde palmitat ile oluşturulan hücresel hepatotoksisitede hücre canlılığına, yağlanmaya, inflamasyona ve antioksidan savunmaya etkisini araştırmaktır.



## GENEL BİLGİLER

### NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI

Karaciğerdeki yağ oranının %5 üzerine çıkması karaciğer yağlanması olarak adlandırılır. Alkol, virüsler, ilaçlar ve otoimmün hastalıklar gibi etmenler karaciğer yağlanmasına yol açabilir (15). Sınırlı alkol alımının olduğu, viral enfeksiyon veya herhangi bir karaciğer hastalığına ait bulgunun bulunmadığı karaciğerde görülen yağlanmaya NAFLD denir (1).

Türkiye’de NAFLD görülme sıklığının %9,6-42 aralığında olduğu bildirilmiştir (16). Çocukluk çağında obezitenin artması ile birlikte NAFLD görülme sıklığı artmaktadır. Türk toplumunda obez çocuklarda NAFLD’nin görülme sıklığı %23-62 aralığındadır (17). Dünyada NAFLD prevalansının yaklaşık %25 olduğu ve NAFLD’nin en yüksek oranda Orta Doğu ve Güney Amerika kıtasında, en düşük oranda ise Güney Afrika kıtasında görüldüğü bildirilmiştir (18).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı olan bireylerin %80’i obezdir. Serbest yağ asitleri, beyaz yağ dokusundan ve *de novo* lipogenez sonucu dolaşıma verilmektedir. NAFLD’de karaciğer hasarının gelişiminde beyaz yağ dokusu kaynaklı artmış serbest yağ asidi ve kronik inflamasyon önemli rol oynar (19). Bazı besinlerin de NAFLD gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. En çok üzerinde durulan besin ise fruktozdur. Amerika Birleşik Devletleri’nde fruktoz içeren içeceklerin tüketimine, paralel olarak NAFLD insidansı ve prevalansındaki büyüme 1950’den beri 5 kat artmıştır (20). Fruktoz tüketimindeki artışın; barsak mikrobiyotası değişiklikleri, oksidatif stres, inflamatuvar sitokinlerin ve barsak geçirgenliğinin artışı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (21). Şekerlerin, vücutta serbest yağ asitlerinin ve trigliseridlerin sentezini arttırarak NAFLD’ye yol açtığı düşünülmektedir.

Artmış yağ tüketimi ise, serbest yağ asitlerinin girişinde artışa yol açarak NAFLD gelişme riskinin artırır. Ayrıca, tek bir besin grubu açısından zengin diyetler, daha yüksek tokluk kan şekeri seviyelerine ve dolayısıyla daha yüksek bir insülin sekresyonuna neden olur. İnsülin ayrıca *de novo* lipogenez uyarır, NAFLD gelişimine ve hepatik trigliserid birikimine neden olur (20).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının patogenezi günümüzde hala tam olarak açıklanabilmiş değildir. NAFLD gelişiminde insülin direncinin önemli bir rolü olduğu bildirilmektedir. Karaciğerde yağ birikimine neden olan başlıca faktörler arasında; diyet, mikrobiyota, genetik faktörler ve lipojenik transkripsiyon faktörlerinin uyarılması yoluyla *de novo* lipogenez sayılabilir. Yağ birikimi sonucu NF- $\kappa$ B uyarılır. NF- $\kappa$ B'nin uyarılması sonucu, tümör nekroz faktörü alfa, interlökin-6 ve interlökin-1 $\beta$  gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimi artar. Ayrıca tümör nekroz faktörü alfa ve interlökin-6 insülin direncinin gelişmesinde rol oynamaktadır. Karaciğerdeki lipotoksisiteye bağlı olarak mitokondriyal disfonksiyon ve endoplazmik retikulum stresi oluşmaktadır (22). Yağ asitlerinin fazla miktarda bulunması sebebiyle artmış yağ asidi oksidasyonuna bağlı olarak reaktif oksijen türleri (ROT) artar. Artan ROT, mitokondriyal disfonksiyonda önemli rol oynar (23).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının tedavisinde öncelikle diyet ve egzersiz önerilmektedir. Medikal tedaviler daha çok metabolik bozukluğu düzeltme üzerine kurulmuş olup günümüzde direkt olarak NAFLD tedavisi için onaylanmış bir ilaç yoktur (21).

### **Palmitat İle Oluşturulan Deneysel Yağlanma Modeli**

Hücre kültürü çalışmalarının, primer dokulara benzerlikleri, düşük maliyetleri ve uygulama kolaylıkları nedeniyle bilimsel araştırmalarda önemi artmıştır. Hücre çalışmaları, hayvan ve insan dokularının kullanımıyla ilişkili etik sorunları önler. Hücre çalışmaları; aşı üretimi, sitotoksisite testleri, ilaç metabolik yollarının tanımlanması, gen fonksiyonunun incelenmesi ve oluşturulması gibi bir çok alanda kullanılmaktadır (24).

HepG2 hücreleri, insan karaciğer hepatoma hücrelerinden elde edilmiş, günümüzde ticari olarak temin edilebilen ve fonksiyonel açıdan hepatositler ile benzerlikleri bulunan hücrelerdir. HepG2 hücreleri ölümsüz hücre hatlarındandır. Çoğalma kapasitesinin yüksek olması, fenotip kararlılığı ve aynı hücre hattının araştırma boyunca kullanılabilir olması, HepG2 hücrelerinin kullanılmasının temel nedenlerindedir (3).

Palmitat, 16 karbonlu doymuş bir yağ asidi olup, sağlıklıların ve NAFLD olan bireylerin karaciğer dokusundaki trigliseridlerin yapısında en çok bulunan yağ asitlerinden

biridir. Bu sebeple palmitat ile oluşturulan deneysel yağlanma modeli NAFLD'nin araştırılmasında kullanılmakta olan deneysel modellerden biridir (2). HepG2 hücrelerinin palmitat ve palmitat ile oleat karışımı ile oluşturulan yağlanma modellerinde, primer hepatositler ile benzer özellikler sergilediği belirtilmiş ve palmitat ile oluşturulan deneysel yağlanma modelinin palmitat ile oleat karışımı ile oluşturulan deneysel yağlanma modeline göre daha sitotoksik olduğu ve bu sebeple NAFLD'nin akut ve toksik etkilerinin araştırılması için uygun bir model olduğu bildirilmiştir (4).

## **OKSİDATİF STRES VE ANTIOKSİDANLAR**

Fizyolojik koşullarda, ROT tüm aerobik organizmalarda oluşur ve organizma için çok sayıda faydalı rolü olduğu bilinmektedir. Fakat, fazla miktardaki ROT da biyomoleküllere zarar verme potansiyeline sahiptir (25). Oksidatif stres, ROT gibi oksidanlar ile antioksidanlar arasında oluşan bir dengesizlik sonucu oksidanların antioksidanlara göre fazlalığı ile oluşur (8,26). Oksidatif stres, biyolojik sistemlere zarar verir ve günümüzde oksidatif stresin ateroskleroz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, alzheimer ve kanser gibi bir çok hastalığın oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir (27). Ultraviyole ışınları, biyokimyasal reaksiyonlar, stres, sigara, iyonize radyasyon ve çeşitli ilaçlar, serbest radikal oluşumuna yol açan faktörlere örnek gösterilebilir (8). Hücrede ROT mitokondride, peroksizom ve endoplazmik retikulumda üretilir. Aynı zamanda ROT'un sitoplazmik üretimi de gerçekleşir (26).

Antioksidanlar, moleküllerin oksidasyonunun inhibe edilmesini sağlayan moleküllerdir, vücutta serbest radikal oluşumunu önlerler ve temizlenmesini sağlarlar. Antioksidanlar, ROT'un zararlı etkisinin ve oksidatif stresin azaltılmasında hayati rol oynar (28). Antioksidanlar endojen (enzimatik ve non-enzimatik) ve eksojen olarak sınıflandırılır. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimatik antioksidanlara; askorbik asit,  $\beta$ -karoten ve  $\alpha$ -tokoferol ise non-enzimatik antioksidanlara örnek gösterilebilir (29).

Nükleer faktör eritroid 2-ile ilişkili faktör 2, antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin ekspresyonunu artıran ve oksidatif strese karşı hücrel yanıtı oluşturan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. NRF2 yarılanma ömrü kısa olan bir proteindir. Ubikitinasyon ve proteozomal yıkım, NRF2'nin düzenlenmesinde önemli mekanizmalardır. Normal koşullarda NRF2 sitoplazmada Kelch-like ECH-associated protein 1 proteinine bağlanmış haldedir (9). Kelch-like ECH-associated protein 1, NRF2'yi bazal düzeyde tutmakla görevli en önemli moleküldür. Oksidatif stres NRF2 ve Kelch-like ECH-associated protein 1 arasındaki etkileşimin bozulmasına, NRF2'nin ubikitinasyonunun ve proteozomal

degradasyonunun önlenmesine ve nükleusa geçişine neden olur (10). NRF2, HO-1 gibi birçok antioksidan enzimin transkripsiyonunu uyarır (11). ROT ve oksidatif stresin NAFLD patogenezi ile ilişkili olduğu gösterildiğinden NRF2'nin uyarılmasının, NAFLD'nin önlenmesi ve tedavisinde umut verici olabileceği düşünülmektedir (30).

Hem oksijenaz-1 enzimi hem proteininin metabolizmasında görevli bir enzimdir. HO-1'in aktif hale gelmesiyle, hem proteini parçalanır ve bilirubin, karbonmonoksit ve ferröz demir ortaya çıkar. Hem proteininin, HO-1 enzimi aracılığıyla parçalanması sonucunda açığa çıkan ürünlerin inflamasyonu baskıladığı bildirilmiştir. HO-1'in, hücrel savunmada görev aldığı bilinmektedir. HO-1 geninin en önemli transkripsiyonel düzenleyicisi NRF2'dir ve NRF2 uyarılıp nükleusa geçtiğinde, HO-1 düzeyinde artış gerçekleşir (12).

## **İNFLAMASYON VE NÜKLEER FAKTÖR κB**

İnflamasyon, vücudun doku hasarına karşı verdiği yanıtıdır. Fiziksel hasar, iskemik hasar, enfeksiyon ve toksik maddelere maruz kalma gibi durumlarda oluşur. İnflamatuvar yanıt olarak hücrel değişiklikler ve immün yanıtlar oluşur (13). İnflamasyon; yara iyileşmesi, immün sistemin kontrolü ve yeniden doku oluşumunda önemli rol oynar. Savunma sisteminde oluşan bir dengesizlikte ise koruyucu ve iyileştirici rolü olan inflamasyon patolojik durumların gelişmesinde katkıda bulunur (31). İnflamasyona maruziyet süresinin artmasına ve inflamasyonu baskılayan sistemlerde oluşan hasarlara bağlı olarak inflamasyon kronik bir hal alabilir. Kronik inflamasyon, tümör oluşumunda ve gelişiminde büyük rol oynamaktadır (13).

Sitokinler, hücreler arası mesaj üreten kimyasal maddelerdir. İmmün yanıtta yer alan reaksiyonları kontrol ederler. Sitokinlerin aşırı üretilmesi kronik inflamasyona neden olmaktadır (32). İnterlökin-1, interlökin-6 ve tümör nekroz faktör  $\alpha$ , pro-inflamatuvar sitokinlere örnek olarak gösterilebilir (14).

Nükleer faktör kappa B beş farklı proteinden oluşan bir komplekstir. Fizyolojik koşullarda NF- $\kappa$ B proteini inflamatuvar süreçlerde ve hücrenin sağ kalımında rol oynar. Normalde, sitoplazmada inaktif halde tutulur. Fosforilasyon ile serbest kalan NF- $\kappa$ B aktifleşir ve çekirdeğe translokasyonu sonucu hedef proteinlerin sentezini uyarır. NF- $\kappa$ B, sitokinler, büyüme faktörleri, bakteriler, virüsler ve oksidatif stres gibi çeşitli faktörler tarafından aktive edilebilir (33). NAFLD'de inflamatuvar hasarı, pro-inflamatuvar moleküllerin salınmasına neden olan lipopolisakkarit gibi bakteri ürünleri ve serbest yağ asitleri tarafından aktive edilebilen NF- $\kappa$ B sinyal yolu belirler. Aşırı inflamasyon sadece karaciğer hücre hasarına ve fibrozise neden olmakla kalmaz, aynı zamanda karaciğerde lipid birikimine de katkıda

bulunur. NF- $\kappa$ B sinyal yollarının farmakolojik inhibitörler veya genetik müdahale ile bloke olması, NAFLD'nin ilerlemesini hafifletir (34).

## ÖKALİPTOL

Ökalyptol (1,8-Sineol), özellikle ökalyptüs yapraklarından elde edilen bir terpenoidtir. Ökalyptol ayrıca çay ağacı, pelin, biberiye, adaçayı, niuola, cajeput, civan perçemi ve tarçında da bulunur (5,35). Ökalyptol hoş aroması ve tadı nedeniyle, banyoda kullanılan malzemelerde, gargara sıvılarında, böcek kovucularda, kozmetik veya parfümlerde sıklıkla kullanılır (35).

Ökalyptolün moleküler formülü  $C_{10}H_{18}O$  şeklindedir. Molekül ağırlığı 154,25'dir. Sıvı halde bulunur ve renksizdir. Suda çözünmez ancak alkolde çözünebilir. Ökalyptol gibi terpenler, ilaç penetrasyonunu artıran lipofilik moleküllerdir. Ökalyptol, sıçan ve insan karaciğer mikrozomal P450 enzimleri tarafından 2-ekzo-hidroksi-1,8-cineole metabolize edilir ve idrarla atılır. Ökalyptol kan-beyin bariyerini kolayca geçebilir ve beyindeki reseptörler ve enzimler üzerine doğrudan etki edebilir (7).

Ökalyptolün anti-inflamatuvar ve antioksidan etkisi nedeniyle bronşit, sinüzit, bronşiyal astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (6,7). Ökalyptolün anti-diyabetik olduğu da bilinmektedir (36). Ayrıca, ökalyptolün nörodejeneratif hastalıklarda anti-inflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir (6,7).

Ökalyptolün insan lenfosit ve monositlerinde lipopolisakkarit kaynaklı sitokinlerin üretimini engelleyebileceği bildirilmiştir (6). Ökalyptol, interlökin-1 $\beta$  ve tümör nekroz faktörü  $\alpha$  gibi pro-inflamatuvarların güçlü bir inhibitörü olarak rol oynar (7). Ökalyptolün anti-mikrobiyal etkisi olduğu da bildirilmiştir (5,36). Ökalyptolün palmitatın yol açtığı hepatotoksisite üzerine etkisi bilinmemektedir.

## **GEREÇ VE YÖNTEMLER**

Trigliserid ölçümleri için Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Merkez Laboratuvarı Biyokimya Birimi'nden hizmet satın alındı. Western blot membranlarının görüntülenmesi için Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet satın alındı. Diğer tüm deneyler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yapıldı.

### **DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER**

% 0.25 Tripsin- etilendiamin tetra asetik asit (Thermo)

2-merkaptotanol (Sigma)

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

$\alpha$ -Tübülün primer antikoru (Santa Cruz)

Akrilamid (Merck)

Amonyum persülfat (Sigma Aldrich)

Antibiyotik-antimikotik solüsyonu (Thermo)

Bakır (II) sülfat pentahidrat (Sigma)

Bromofenol mavisi (Sigma Aldrich)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma)

Eagle'ın Minimum Esansiyel Medyumu (EMEM)-fenol red içeren (Wisent)

EMEM-fenol red içermeyen (Wisent)

Etilendiamin tetra asetik asit (Sigma)

Fetal Sığır Serumumu (Thermo)

Folin reaktifi (Merck)  
Gliserol (Sigma)  
Glisin (Sigma)  
Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz primer antikoru (Abcam)  
Hidroklorik asit (%37) (Merck)  
Hidrojen peroksit (Merck)  
HO-1 primer antikoru (Santa Cruz)  
IGEPAL CA-630 (Santa Cruz)  
İsopropanol (Sigma)  
Kemilüminesans substrat (Thermo)  
Lamin B1 primer antikoru  
Metanol (Merck)  
NF-κB primer antikoru (Bosterbio)  
N,N-Metilen bis-akrilamid (Merck)  
N,N,N,N-tetrametiletilediamin (Sigma Aldrich)  
NRF2 primer antikoru (Bosterbio)  
Ökalyptol (Sigma)  
Poliviniliden diflorid membran (Roche)  
Pre-stained protein ladder (Thermo)  
Proteaz inhibitör kokteyli (Santa Cruz)  
Sekonder antikorlar (Bosterbio)  
Sodyum dodesil sülfat (Sigma)  
Sodyum hidroksit (Merck)  
Sodyum palmitat (Sigma)  
Sodyum klorür (Sigma)  
Tris baz (Sigma)  
Triton X-100 (Sigma)  
Tuzlu fosfat tamponu tablet (Thermo)  
Tween-20 (Sigma)  
Yağ asidi içermeyen sığır serum albumini (Goldbio)  
Yağsız süt tozu (Sigma)

## **DENEYLERDE KULLANILAN PLASTİK VE CAM MALZEMELER**

Balon joje (Isolab)

Beher (Isolab)

Flasklar (25 cm<sup>2</sup> ve 75 cm<sup>2</sup>) (Nest)

Hücre kazıyıcı (Biosorfa)

Mezür (Isolab)

Mikroplakalar (6 kuyucuklu ve 96 kuyucuklu) (SPL)

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

Steril santrifüj tüpleri (15 ve 50 mL) (Isolab)

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

Steril şırınga filtre (GVS)

## **DENEYLERDE KULLANILAN CİHAZLAR**

-Biyogüvenlik kabini (Thermo Scientific Safe 2020)

-Biyokimya otoanalizörü (Roche Cobas C702)

-Çalkalayıcı (Cleaver Scientific CW23)

-Dikey elektroforez sistemi (Cleaver Scientific Omnipage Mini Vertical System)

-Faz kontrast invert mikroskop (Olympus CKX 53)

-Güç kaynağı (Cleaver Scientific)

-Homojenizatör (Next Advance Bullet Blender Storm)

-Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Daihan Scientific WiseStir)

-Karbondioksitli inkübatör (Thermo Scientific Forma Steri-cycle 371)

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

-Mikrobiyolojik inkübatör (Thermo Scientific Heratherm IMC-18)

-Mikroplaka okuyucu (Biotek µQuant)

-Otomatik pipetler (Eppendorf ve Capp)

-pH metre (Inolab)

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

-Sıvı azot tankı (Air Liquide GT21)

-Su banyosu (GFL 1083)

-Western blotting sistemi (Cleaver Scientific Semi Dry Blotter)

-80 °C Derin dondurucu (Heraeus HERAfreeze)

## **TEMEL HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI**

HepG2 hücreleri %10 fetal sığır serumu içeren EMEM ile %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C'de inkübatörde yaşatıldı. Medium içerisinde mikroorganizmanın üremesini engellemek için %1 antimikotik-antibiyotik solüsyonu kullanıldı. Hücrelere tüm uygulamalar yatay hava akışlı biyogüvenlik kabini içerisinde yapıldı. Çalışmada 10. ve 20. pasaj aralığındaki hücreler kullanıldı. HepG2 hücreleri 75 cm<sup>2</sup> flasklarda çoğaltıldı. Hücrelerin mediumu haftada iki kez değiştirildi. Flasktaki hücre yoğunluğu %80-90'a ulaşıncaya hücreler 1:4-1:6 pasajlandı.

## **ÖKALİPTOL VE PALMİTATIN UYGULANIŞI**

Ökalyptol DMSO'da çözüldü ve hücrelere uygulanan tüm mediumlarda DMSO içeriği %0,2 idi. Sodyum palmitat, steril serum fizyolojikte 70 °C'de çözüldü ve 1 mM palmitat, 0,7 mM yağ asidi içermeyen sığır serum albumini içeren fenol red içermeyen EMEM ile en az 4 saat konjuge edilerek 24 saat süreyle hücrelere uygulandı (37). Kontrol grubuna ise 0,7 mM yağ asidi içermeyen sığır serum albumini içeren fenol red içermeyen EMEM uygulandı.

## **HÜCRE CANLILIĞI ÖLÇÜMÜ**

Öncelikle, ökalyptol 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µM konsantrasyonlarda HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulandı ve ökalyptolün hücre canlılığına etkisi belirlendi. Ardından hücre canlılığının %90 üzeri olduğu ökalyptol konsantrasyonları (10, 25, 50, 100, 250 ve 500 µM) 1 mM palmitat ile aynı anda 24 saat süreyle HepG2 hücrelerine uygulanarak ökalyptolün 1 mM palmitat ile oluşturulan sitotoksisite üzerine etkisi belirlendi. Hücre canlılığı ölçümlerinde MTT yöntemi kullanıldı. MTT yöntemi Ahmedian ve ark (38) 'nın metoduna göre yapıldı. 10<sup>4</sup> hücre 96'lık hücre kültürü plakalarına ekildi. Uygulamalardan 24 saat sonra etken madde içeren medium alınarak yerine 10 µl tuzlu fosfat tamponu içerisinde çözülmüş MTT (5 mg/mL) ve 100 µl fenol red içermeyen EMEM konuldu ve 4 saat inkübe edildi. MTT içeren fenol red içermeyen EMEM alınarak oluşan formazan 200 µl DMSO ve 25 µl Sorenson tamponu (0,1 M glisin ve 0,1 M sodyum klorür; 0,1 M sodyum hidroksit ile pH:10,5'e ayarlanır) ile çözüldü ve oluşan renk mikropilaka okuyucuda spektrofotometrik olarak 570/630 nm'de ölçüldü. Ölçülen absorbanslar kontrol grubunun ortalamasına bölünerek kontrol grubunun yüzdesi olarak verildi.

## **TRİGLİSERİD ÖLÇÜMÜ**

Trigliserid ölçümü için HepG2 hücreleri 25 cm<sup>2</sup> flasklara ekildi. 10, 25, 50, 100, 250 ve 500 µM ökaliptol, 1 mM palmitat ile aynı anda 24 saat süreyle HepG2 hücrelerine uygulandı. Ardından tuzlu fosfat tamponu ile yıkanan hücreler, daha sonra %1 proteaz inhibitörü ve %0,1 Triton X-100 içeren tuzlu fosfat tamponu ile kazındı ve homojenize edildi. Ardından 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve üst kısımdaki süpernatant deneylerde kullanıldı. Hücre içi trigliserid düzeyleri Roche Cobas C702 marka otoanalizörün orijinal kitleri kullanılarak ölçüldü. Aynı süpernatantlardan Lowry ve ark (39)'nın yöntemine göre protein ölçümü yapıldı. Trigliserid sonuçları proteine oranlandı ve kontrol grubunun ortalamasına bölünerek kontrolün katı olarak verildi.

## **WESTERN BLOT YÖNTEMİ**

250 ve 500 µM ökaliptol, 1 mM palmitat ile aynı anda 24 saat süreyle HepG2 hücrelerine uygulandı. Deneysel prosedür sonrası hücreler soğuk tuzlu fosfat tamponu ile yıkandı. NRF2 ve NF-κB düzeylerinin ölçümü hem sitoplazmik hem de nükleer fraksiyonda; HO-1 düzeylerinin ölçümü ise tam hücre lizatından yapıldı. Nükleer ve sitoplazmik fraksiyon elde edilmesi için Suziki ve ark (40)'nın metodu kullanıldı. Protein düzeyleri Lowry ve ark (39)'nın yöntemine göre ölçüldü. Her bir ölçüm için eşit miktarda protein dikey elektroforez jeline yüklendi. Proteinler sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılarak yarı-ıslak aktarım sisteminde membrana aktarıldı. Öncelikle %5 süt tozu ile bloklanan membranlar, primer antikorlarla (NRF2 için 1:2000, NF-κB için 1:5000 ve HO-1 için 1:200 dilüsyon) +4 °C'de gece boyu ve ardından sekonder antikorlarla (1:10000 dilüsyon) 1 saat boyunca inkübe edildi. Membran üzerindeki spesifik proteinlerin görüntülenmesi kemilüminesans substrat eklenerek yapıldı. Image J ile bant yoğunlukları hesaplandı (41) ve sonuçlar yükleme kontrolü olarak sitoplazmik ve nükleer fraksiyon ve tam hücre lizatı için sırasıyla kullanılan gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (1:5000 dilüsyon), lamin B1 (1:10000 dilüsyon) ve α-tübülin (1:1000 dilüsyon) proteinlerine oranlanarak aynı deneyde ve aynı membranda bulunan kontrolün katı olarak verildi.

## **İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME**

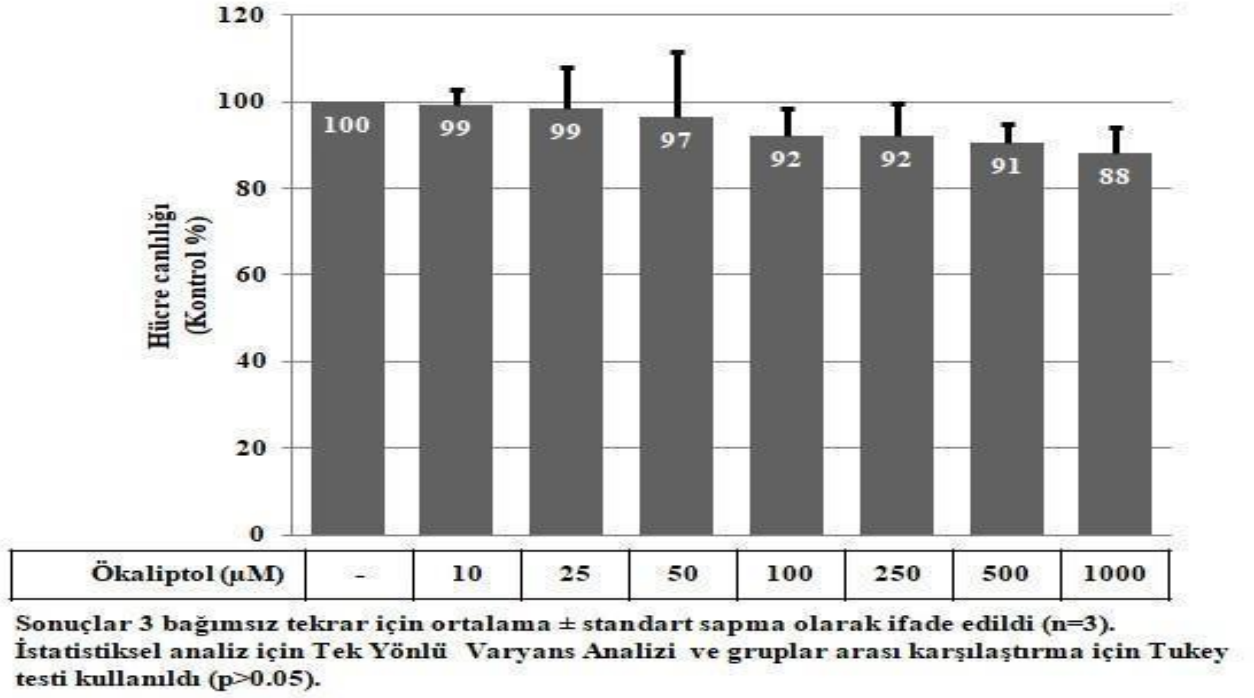
SPSS 20 programı (Lisans no: 10240642) kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı. Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey Testi kullanıldı.

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edildi.  $p<0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



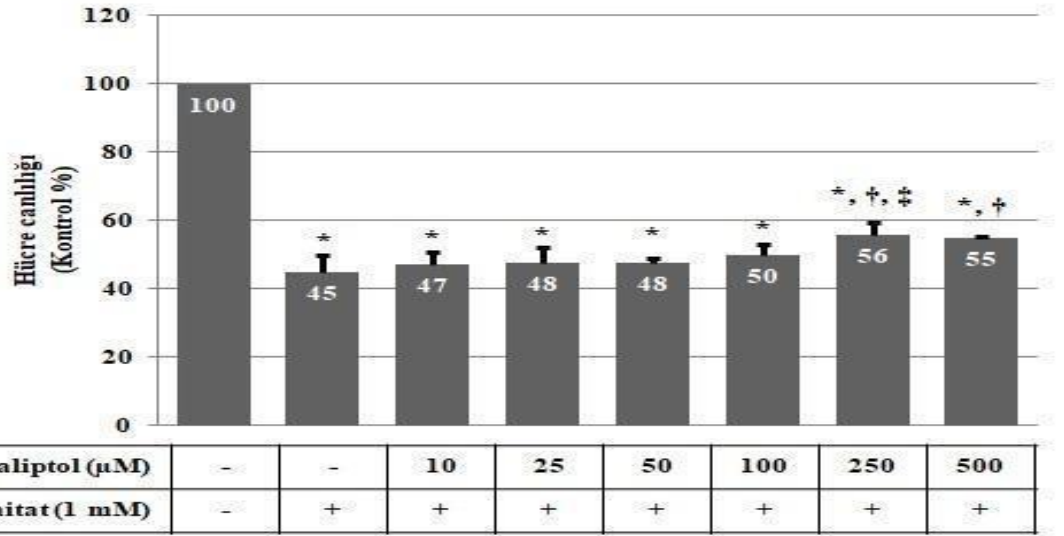
## **BULGULAR**

HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulan ökaliptol konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 1’de görülmektedir. 24 saat uygulama sonrası HepG2 hücrelerindeki hücre canlılıkları kontrole göre, 10 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde %99±4, 25 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde %99±9, 50 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde %97±15, 100 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde %92±6, 250µM ökaliptol uygulanan hücrelerde %92±8, 500 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde %91±4, 1000 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde %88±6’ydı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ökaliptol konsantrasyonlarının hiçbiri hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmede (tümü için  $p>0.05$ ).



**Şekil 1. Ökaliptolün HepG2 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi**

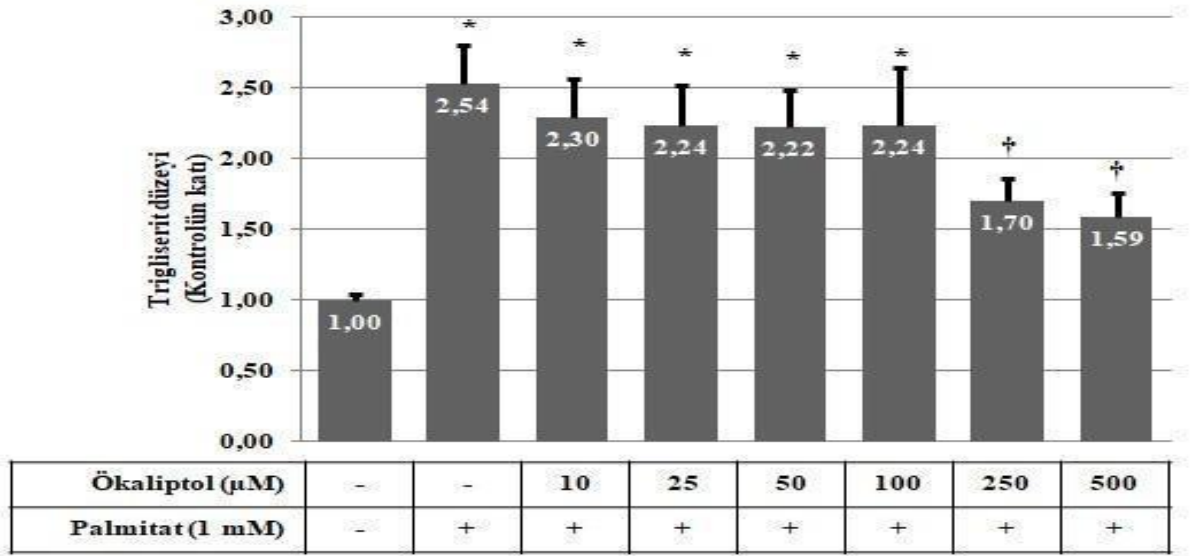
Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökaliptolün hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 2’de görülmektedir. 24 saat uygulama sonrası HepG2 hücrelerindeki hücre canlılıkları kontrole göre; 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde %45±5; 1 mM palmitat + 10 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde %47±3, 1 mM palmitat + 25 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde %48±4, 1 mM palmitat + 50 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde %48±1, 1 mM palmitat + 100 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde %50±3, 1 mM palmitat + 250 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde %56±4 ve 1 mM palmitat + 500 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde %55±0 bulundu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 1 mM palmitat uygulanan tüm gruplarda hücre canlılığı anlamlı olarak azaldı (tümü için p<0.05). 250 µM ve 500 µM ökaliptol uygulamaları, 1mM palmitat uygulanan hücrelerde hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdı (her ikisi için p<0.05). 1 mM palmitat + 250 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde hücre canlılığı, 1 mM palmitat + 10 µM ökaliptol uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak yüksekti (p<0,05).



Sonuçlar 3 bağımsız tekrar için ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi (n=3). İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.  
 \*: Kontrol ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ .  
 †: 1 mM palmitat uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ .  
 ‡: 1 mM palmitat + 10 μM ökaliptol uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ .

## Şekil 2. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökaliptolün hücre canlılığına etkisi

Şekil 3’de, palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökaliptolün trigliserid düzeyleri üzerine etkisi gösterilmektedir. Kontrol grubunun ortalamasına oranlanan gruplara ait trigliserit sonuçları kontrolün katı olarak verildi. 24 saat uygulama sonrası HepG2 hücrelerinin trigliserid düzeyleri; kontrol grubunda  $1,00 \pm 0,05$ , 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde  $2,54 \pm 0,26$ ; 1 mM palmitat + 10 μM ökaliptol uygulanan hücrelerde  $2,30 \pm 0,27$ , 1 mM palmitat + 25 μM ökaliptol uygulanan hücrelerde  $2,24 \pm 0,28$ , 1 mM palmitat + 50 μM ökaliptol uygulanan hücrelerde  $2,22 \pm 0,26$ , 1 mM palmitat + 100 μM ökaliptol uygulanan hücrelerde  $2,24 \pm 0,41$ , 1 mM palmitat + 250 μM ökaliptol uygulanan hücrelerde  $1,70 \pm 0,16$  ve 1 mM palmitat + 500 μM ökaliptol uygulanan hücrelerde  $1,59 \pm 0,17$  bulundu. 1 mM palmitat, 1 mM palmitat + 10 μM ökaliptol, 1 mM palmitat + 25 μM ökaliptol, 1 mM palmitat + 50 μM ökaliptol ve 1 mM palmitat + 100 μM ökaliptol uygulanan hücrelerde trigliserid düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (tümü için  $p < 0.05$ ). 250 μM ve 500 μM ökaliptol uygulamaları, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde trigliserid düzeylerini anlamlı olarak azalttı (her ikisi için  $p < 0.05$ ).



Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi (n=3).

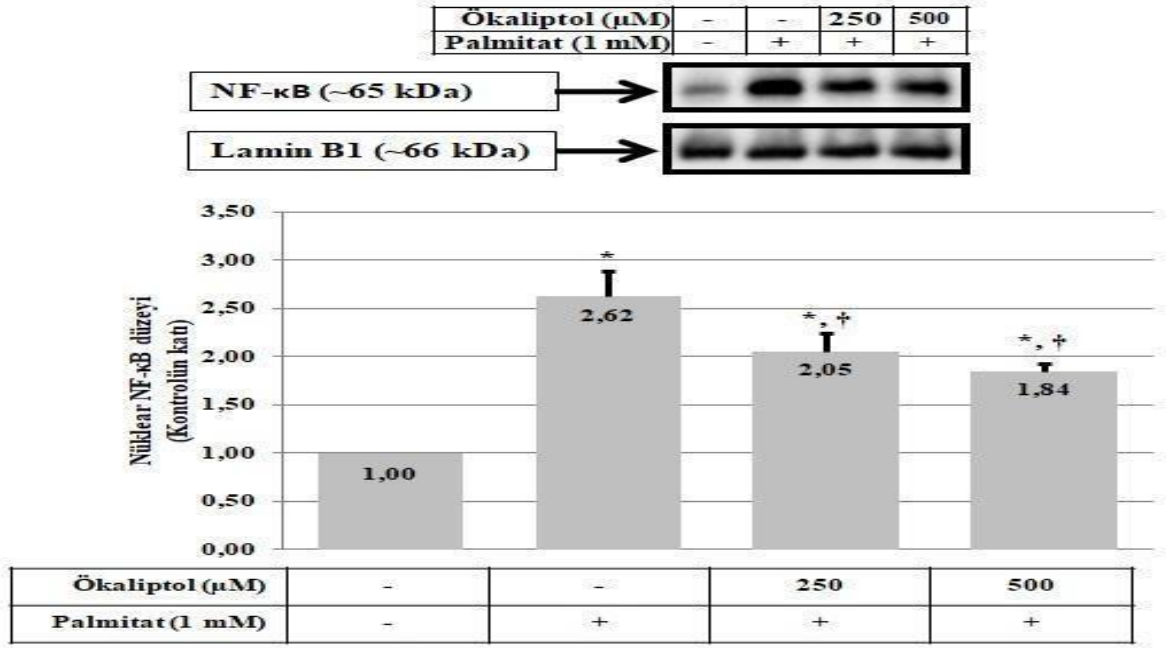
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.

\*: Kontrol ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ .

†: 1 mM palmitat uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ .

**Şekil 3. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökaliptolün trigliserid düzeylerine etkisi.**

Şekil 4’de, palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökaliptolün nükleer fraksiyonda bulunan NF- $\kappa$ B düzeyleri üzerindeki etkisi görülmektedir. 24 saat uygulama sonrası HepG2 hücrelerinin nükleer fraksiyonda bulunan NF- $\kappa$ B düzeyleri; 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrolün  $2,62 \pm 0,26$  katı, 1 mM palmitat + 250  $\mu$ M ökaliptol uygulanan hücrelerde kontrolün  $2,05 \pm 0,19$  katı ve 1 mM palmitat + 500  $\mu$ M ökaliptol uygulanan hücrelerde kontrolün  $1,84 \pm 0,08$  katı olarak bulundu. 1 mM palmitat uygulanan tüm hücrelerde nükleer fraksiyonda bulunan NF- $\kappa$ B düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak yüksekti (tümü için  $p < 0.05$ ). 250  $\mu$ M ve 500  $\mu$ M ökaliptol uygulamaları, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde nükleer NF- $\kappa$ B düzeylerini anlamlı olarak azalttı (her ikisi için  $p < 0.05$ ).



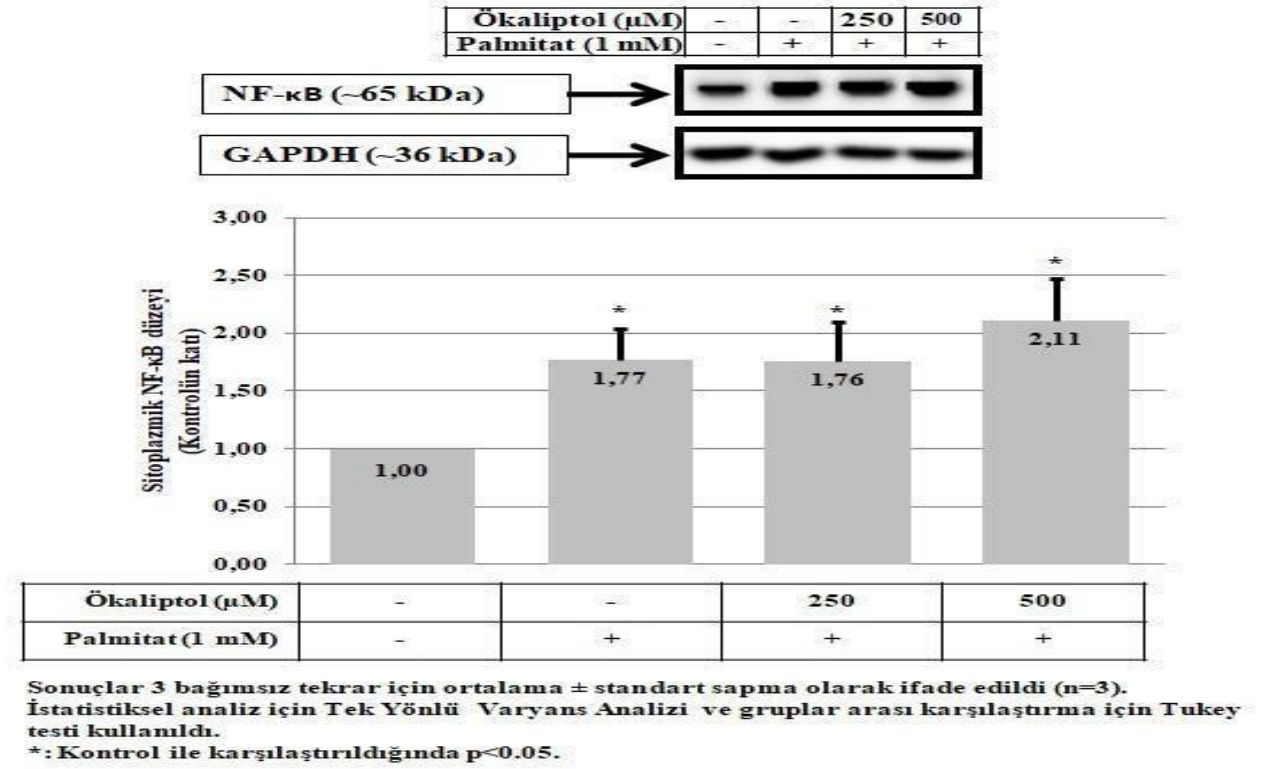
Sonuçlar 3 bağımsız tekrar için ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi ( $n=3$ ). İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.

\*: Kontrol ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$ .

†: 1 mM palmitat uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında  $p<0.05$ .

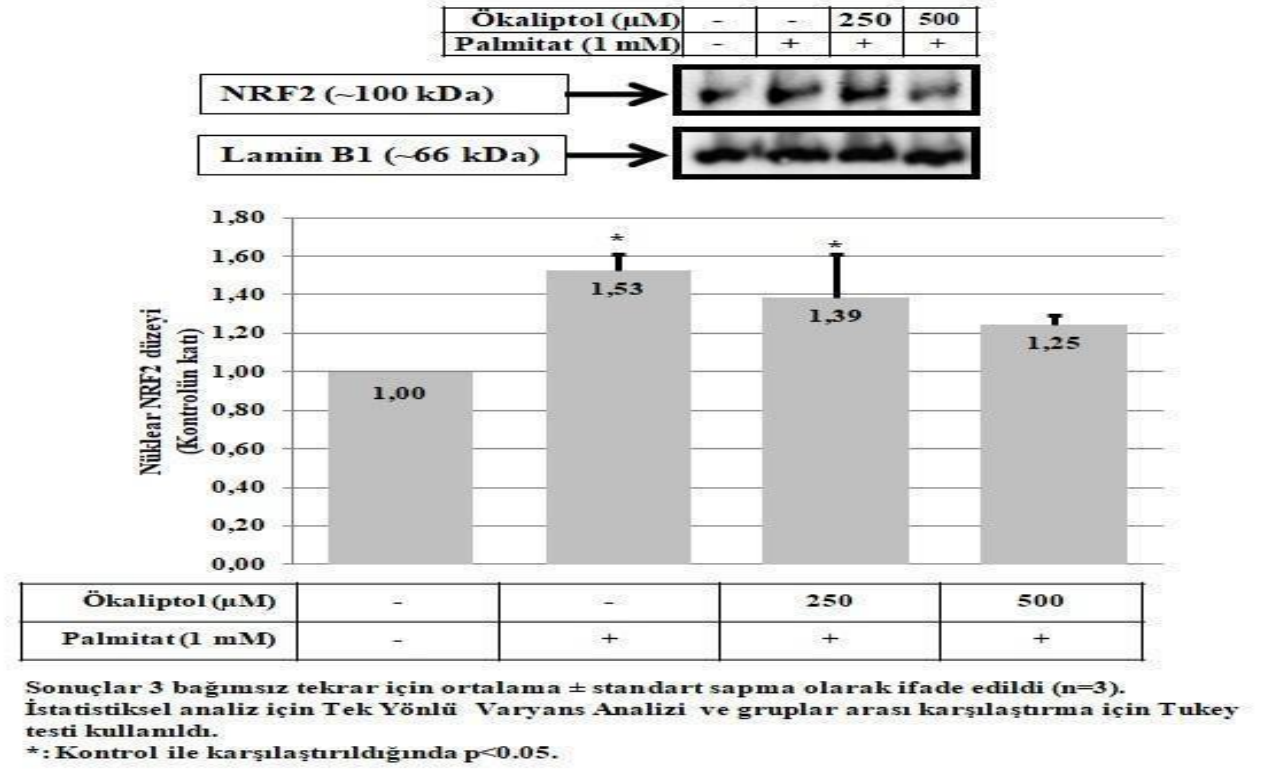
**Şekil 4. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökaliptolün nükleer fraksiyonda bulunan NF-kappa B düzeylerine etkisi.**

Şekil 5'de, palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökaliptolün sitoplazmik fraksiyonda bulunan NF- $\kappa$ B düzeyleri üzerindeki etkisi görülmektedir. 24 saat uygulama sonrası HepG2 hücrelerinin sitoplazmik fraksiyonda bulunan NF- $\kappa$ B düzeyleri; 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrolün  $1,77\pm 0,28$  katı, 1 mM palmitat + 250  $\mu\text{M}$  ökaliptol uygulanan hücrelerde kontrolün  $1,76\pm 0,34$  katı, 1 mM palmitat + 500  $\mu\text{M}$  ökaliptol uygulanan hücrelerde kontrolün  $2,11\pm 0,36$  katı olarak bulundu. 1 mM palmitat uygulanan tüm hücrelerde sitoplazmik fraksiyonda bulunan NF- $\kappa$ B düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak yüksekti (tümü için  $p<0.05$ ).



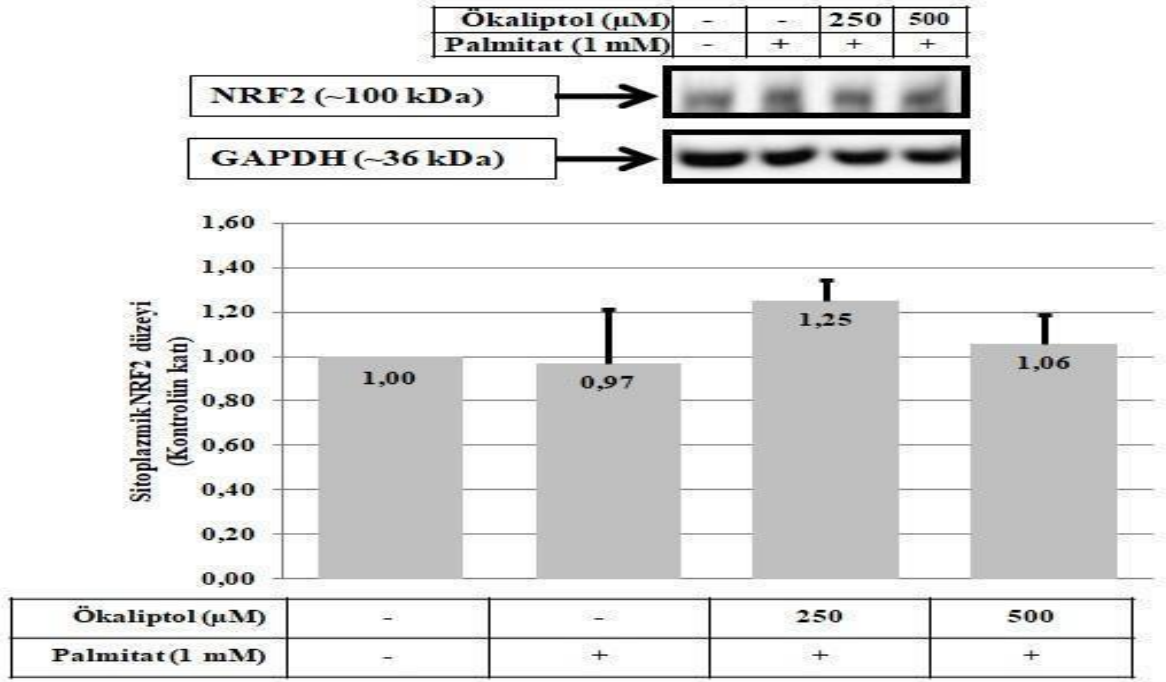
**Şekil 5. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökaliptolün sitoplazmik fraksiyonda bulunan NF-kappa B düzeylerine etkisi.**

Şekil 6'da, palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökaliptolün nükleer fraksiyonda bulunan NRF2 düzeylerine etkisi görülmektedir. 24 saatlik uygulama sonrası HepG2 hücrelerinin nükleer fraksiyonda bulunan NRF2 düzeyleri; 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrolün  $1,53 \pm 0,09$  katı, 1 mM palmitat + 250  $\mu\text{M}$  ökaliptol uygulanan hücrelerde kontrolün  $1,39 \pm 0,22$  katı, 1 mM palmitat + 500  $\mu\text{M}$  ökaliptol uygulanan hücrelerde kontrolün  $1,25 \pm 0,05$  katı olarak bulundu. 1 mM palmitat ve 1 mM palmitat + 250  $\mu\text{M}$  ökaliptol uygulanan hücrelerde nükleer fraksiyonda bulunan NRF2 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (her ikisi için  $p < 0.05$ ).



**Şekil 6. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökaliptolün nükleer fraksiyonda bulunan nükleer faktör eritroid 2-ile ilişkili faktör 2 düzeylerine etkisi.**

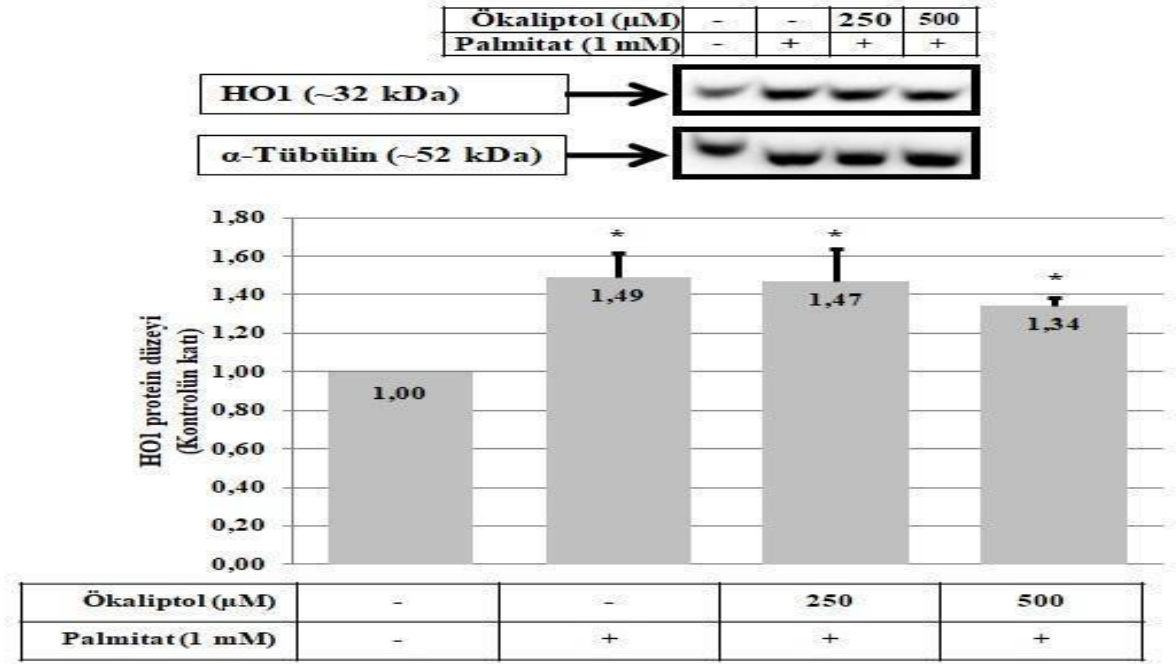
Şekil 7’de, palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökaliptolün sitoplazmik fraksiyonda bulunan NRF2 düzeylerine etkisi görülmektedir. 24 saatlik uygulama sonrası HepG2 hücrelerinin sitoplazmik fraksiyonda bulunan NRF2 düzeyleri; 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrolün  $0,97 \pm 0,24$  katı, 1 mM palmitat + 250  $\mu\text{M}$  ökaliptol uygulanan hücrelerde kontrolün  $1,25 \pm 0,09$  katı, 1 mM palmitat + 500  $\mu\text{M}$  ökaliptol uygulanan hücrelerde kontrolün  $1,06 \pm 0,13$  katı olarak bulundu. Gruplar arasında sitoplazmik fraksiyonda bulunan NRF2 düzeyleri arasında anlamlı bir fark yoktu (tümü için  $p > 0.05$ ).



Sonuçlar 3 bağımsız tekrar için ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi (n=3). İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı ( $p>0.05$ ).

**Şekil 7. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökaliptolün sitoplazmik fraksiyonda bulunan nükleer faktör eritroid 2-ile ilişkili faktör 2 düzeylerine etkisi.**

Şekil 8’de, palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökaliptolün HO-1 düzeylerine etkisi görülmektedir. 24 saatlik uygulama sonrası HepG2 hücrelerinin HO-1 düzeyleri; 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre HO-1 düzeyi  $1,49\pm 0,13$  kat, 1 mM palmitat + 250  $\mu\text{M}$  ökaliptol uygulanan hücrelerde kontrolün  $1,47\pm 0,16$  kat, 1 mM palmitat + 500  $\mu\text{M}$  ökaliptol uygulanan hücrelerde kontrolün  $1,34\pm 0,04$  katı olarak bulundu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 1 mM palmitat uygulanan tüm gruplarda HO-1 düzeyleri anlamlı olarak yüksekti (tümü için  $p<0.05$ ).



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

Şekil 8. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökaliptolün heme oksijenaz 1 düzeylerine etkisi.

Tablo-1’de çalışmamıza ait sonuçlar gösterilmiştir.

**Tablo 1. Çalışmada elde edilen tüm sonuçlar**

		Kontrol	10 µM Öka	25 µM Öka	50 µM Öka	100 µM Öka	250 µM Öka	500 µM Öka	1000 µM Öka	
Hücre Canlılığı (% Kontrol )	Ökaliptolün Hücre Canlılığına Etkisi	1	100	98,40	93,78	88,33	89,75	87,35	87,07	83,15
		2	100	95,87	92,75	87,77	87,56	87,73	89,53	86,28
		3	100	103,21	109,62	113,99	99,21	100,93	95,26	95,03
	Ökaliptolün Palmitat ile Yağlanmada Hücre Canlılığına Etkisi	Kontrol		1 mM Pal	1 mM Pal + 10 µM Öka	1 mM Pal + 25 µM Öka	1 mM Pal + 50 µM Öka	1 mM Pal + 100 µM Öka	1 mM Pal + 250 µM Öka	1 mM Pal + 500 µM Öka
		1	100	40,16	50,75	47,51	46,70	53,42	53,92	54,48
		2	100	49,23	43,82	44,04	47,46	47,68	59,93	55,30
3	100	46,21	47,15	52,31	49,10	48,94	53,79	55,20		
		Kontrol	1 mM Pal	1 mM Pal + 10 µM Öka	1 mM Pal + 25 µM Öka	1 mM Pal + 50 µM Öka	1 mM Pal + 100 µM Öka	1 mM Pal + 250 µM Öka	1 mM Pal + 500 µM Öka	
Trigliserit Düzeyleri (Kontrolün katı)		1	1,03	2,76	2,60	2,54	2,52	2,40	1,89	1,79
		2	1,02	2,61	2,09	1,98	2,02	2,55	1,59	1,51
		3	0,95	2,24	2,20	2,20	2,14	1,77	1,63	1,48
NF-κB düzeyi (Kontrolün katı)	Nükleus	Kontrol		1 mM Pal	1 mM Pal + 250 µM Öka			1 mM Pal + 500 µM Öka		
		1	1	2,45	1,83			1,76		
		2	1	2,49	2,18			1,84		
	3	1	2,92	2,13			1,93			
	Sitoplazma	Kontrol		1 mM Pal	1 mM Pal + 250 µM Öka			1 mM Pal + 500 µM Öka		
		1	1	2,04	2,15			2,46		
2		1	1,77	1,61			2,14			
3	1	1,49	1,52			1,74				
NRF-2 düzeyi (Kontrolün katı)	Nükleus	Kontrol		1 mM Pal	1 mM Pal + 250 µM Öka			1 mM Pal + 500 µM Öka		
		1	1	1,63	1,54			1,20		
		2	1	1,47	1,13			1,24		
	3	1	1,49	1,50			1,30			
	Sitoplazma	Kontrol		1 mM Pal	1 mM Pal + 250 µM Öka			1 mM Pal + 500 µM Öka		
		1	1	0,74	1,14			0,92		
2		1	0,96	1,32			1,09			
3	1	1,22	1,29			1,17				
HO-1 düzeyi (Kontrolün Katı)		Kontrol		1 mM Pal	1 mM Pal + 250 µM Öka			1 mM Pal + 500 µM Öka		
		1	1	1,61	1,59			1,39		
		2	1	1,5	1,54			1,35		
		3	1	1,36	1,29			1,3		

**HO-1:** Hem oksijenaz-1; **NF-κB:** Nükleer faktör κB; **NRF-2:** Nükleer faktör eritroid 2-ile ilişkili faktör 2; **Öka:** Ökaliptol; **Pal:** Palmitat

## TARTIŞMA

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, viral enfeksiyon, alkol kullanımı veya karaciğerde görülen herhangi bir hastalığa ait etiyolojik bulgu olmadan, karaciğerde gelişen yağlanma ile karakterize bir hastalıktır (1). Dünyada NAFLD prevalansının yaklaşık %25 civarında olduğu bildirilmektedir (18).

Ökalyptol (1,8-Sineol), esas olarak ökalyptüs yapraklardan elde edilen uçucu bir yağdır. Literatürde ökalyptolün, anti-inflamatuvar, anti-mikrobiyal ve solunum sistemine yararlı etkileri olduğu bildirilmektedir (5,35,42). Çalışmamızda ökalyptolün insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde palmitat ile oluşturulan hücrel hepatotoksisitede hücre canlılığına, yağlanmaya, inflamasyona ve antioksidan savunmaya etkisini araştırmayı amaçladık.

Rodenak-Kladniew ve ark. (43) 24 saat süreyle HepG2 hücrelerine uygulanan ökalyptolün, 0-4 mM arasında hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmedini bildirmiştir. Bu çalışma ile uyumlu olarak çalışmamızda da HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle 1000 µM'a kadar uyguladığımız ökalyptol konsantrasyonları hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmedi. Bu sonuçlar ışığında ilerleyen deneylerde hücre canlılığının %90'ın üzerinde olduğu 10-500 µM ökalyptol konsantrasyonları HepG2 hücrelerine 1 mM palmitat ile birlikte uygulandı.

Doymuş yağ asidi olan palmitatın hepatositlere uygulanmasının, NAFLD'nin akut ve toksik etkilerinin araştırılması amacıyla kullanılabilir deneysel bir NAFLD modeli olduğu ve HepG2 hücre hattının bu modelde primer hepatositler ile benzer özellikler gösterdiği bildirilmiştir (4). Literatürde 1 mM palmitatın HepG2 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı ve hücre içi trigliserid düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir (44,45). Bu çalışmalarla benzer olarak, çalışmamızda, palmitat uygulamasının hücre canlılığını azalttığını ve hücre içi

trigliserid düzeylerini ise artırdığını bulduk. Bu bulgularımız, HepG2 hücrelerinde palmitatın hücrenel sitotoksosite ve yağlanma oluştu kanıtlamaktadır.

Literatürde ökaliptolün hepatosit spesifik fosfataz ve tensin analogu knock-out farelerde oluşan non-alkolik steatohepatit üzerine etkili olduğu bildirilmekle (46) birlikte ökaliptolün palmitat ile oluşturulan hepatotoksosite üzerine etkisi bilinmemektedir. Çalışmamızda 250 ve 500  $\mu$ M ökaliptol uygulamaları, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde, hücre canlılığını arttırırken, trigliserid düzeylerini ise azalttı. Bu bulgularımız ökaliptolün, palmitatın yol açtığı sitotoksositeyi ve yağlanmayı azalttığını göstermektedir.

Fizyolojik koşullarda NF- $\kappa$ B proteini inflamatuvar süreçlerde ve hücre sağ kalımında rol oynar . Sitokinler, büyüme faktörleri, bakteriler, virüsler ve oksidatif stres gibi çeşitli faktörler NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonuna yol açabilir (33). Literatürde HepG2 hücrelerinde palmitat uygulamasının NF- $\kappa$ B'yi aktive ettiği gösterilmiştir (47-49). Çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak palmitat uygulanan hücrelerde hem sitoplazmik hem de nükleer fraksiyonlarda NF- $\kappa$ B düzeylerinin arttığını gösterdik. Bu bulgularımız palmitatın HepG2 hücrelerinde, hem NF- $\kappa$ B sentezinin artmasına hem de NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonuna bağlı nükleusa geçişine yol açtığını göstermektedir.

Ökaliptolün anti-inflamatuvar özelliklerinin olduğu ve bu anti-inflamatuvar özelliklerinin NF- $\kappa$ B sinyal yolağı ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (7). Çalışmamızda ökaliptolün palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde NF- $\kappa$ B sinyal yolağı üzerine etkisini ilk kez araştırdık ve ökaliptolün uyguladığımız her iki konsantrasyonda da sitoplazmadaki NF- $\kappa$ B düzeylerini anlamlı olarak değiştirmemesine rağmen nükleer NF- $\kappa$ B düzeylerini azalttığını bulduk. Bu bulgularımız ökaliptolün HepG2 hücrelerinde palmitatın yol açtığı NF- $\kappa$ B aktivasyonunu azalttığını göstermektedir.

Nükleer faktör eritroid 2-ile ilişkili faktör 2, antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin ekspresyonunu artıran ve oksidatif stresin hücrenel yanıtını oluşturan önemli bir transkripsiyon faktörüdür (9). Literatürde ROT ve elektrofillerin NAFLD patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilmiş olup, NRF2'nin uyarılmasının, NAFLD'nin önlenmesi ve tedavisinde umut verici olabileceği bildirilmektedir (11,30). Çalışmamızda palmitatın NRF2'nin nükleusa girişini ve HO-1 düzeylerini arttırdığını gösterdik ve bu bulgumuz palmitatın NRF2 sinyal yolağı aktivasyonuna yol açtığını göstermektedir. Bulgularımız ile benzer olarak Park ve ark. (50), palmitatın fare hepatoma hücrelerinde KEAP yıkımını arttırarak NRF2 aktivasyonuna yol açtığını ve HO-1 sentezini arttırdığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde literatürde, palmitatın NRF2-HO-1 yolağını uyardığı pankreas beta

hücrelerinde (51), iskelet kası hücrelerinde (52), renal tübüler epitel hücrelerinde (53) de gösterilmiştir. Bununla birlikte literatürde palmitatın karaciğer kaynaklı hücrelerde NRF2 ve HO-1 düzeylerini değiştirmediğini (54) veya azalttđđını (55) bildiren çalışmalar da vardır.

Çalışmamızda ökaliptolün, palmitata bağlı artan nükleer NRF2 ve HO-1 düzeyleri üzerine anlamlı bir etkisi yoktu. Literatürde ökaliptolün karaciğerde NRF2 aktivasyonuna yol atıęđı bildirilmiştir (56). Çalışmamızda ökaliptolün sitotoksisiteyi, yağlanmayı ve inflamasyonu azaltırken, palmitatın yol atıęđı NRF2/HO-1 aktivasyonunu anlamlı olarak azaltmaması, ökaliptolün tek başına da NRF2 aktivasyonuna yol açmasından olabilir.

Sonuç olarak çalışmamız, ökaliptolün, palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde sitotoksisiteyi, yağlanmayı ve inflamasyonu azaltırken, antioksidan savunma üzerine ise anlamlı bir etkisinin olmadđđını gösterdi. Bu sonuçlarımız, ökaliptolün palmitatın yol atıęđı hepatoksisiteyi önlemede etkili olabileceğini göstermektedir.

## SONUÇLAR

Bu çalışmada, ökaliptolün insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde palmitat tarafından indüklenen hücresel hepatotoksisitede hücre canlılığına, yağlanmaya, inflamasyona ve antioksidan savunmaya etkisini araştırmayı amaçladık. 24 saat boyunca uygulandığında HepG2 hücrelerinde %90'nın üzerinde canlılığın görüldüğü ökaliptol konsantrasyonlarını bulduk ve 24 saat boyunca 1 mM palmitat ile birlikte uyguladık. 1 mM palmitat uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT testiyle değerlendirildi, ayrıca yağlanma üzerindeki etkisi trigliserid ölçümleriyle gösterildi. Bu ökaliptol konsantrasyonlarından palmitatın yol açtığı sitotoksisiteyi ve yağlanmayı en fazla azaltan ökaliptol konsantrasyonları belirlendi. Bu konsantrasyonlar, 24 saat boyunca 1 mM palmitat ile birlikte HepG2 hücrelerine uygulanarak NF-κB, NRF2 ve HO-1 düzeyleri western blot yöntemi ile ölçüldü.

Bu çalışmada elde ettiğimiz tüm sonuçlar aşağıda yer almaktadır:

1. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM ve 1000 µM ökaliptol hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmedir.
2. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 1 mM palmitat uygulanan tüm gruplarda hücre canlılığı anlamlı olarak azaldı. 10 µM, 25 µM, 50µM ve 100 µM ökaliptol uygulamaları, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmedir. 250 µM ve 500 µM ökaliptol uygulamaları, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdı. 1 mM palmitat + 250 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde hücre canlılığı, 1 mM palmitat + 10 µM ökaliptol uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak yüksekti.

3. 1 mM palmitat, 1 mM palmitat + 10 µM ökaliptol, 1 mM palmitat + 25 µM ökaliptol, 1 mM palmitat + 50 µM ökaliptol ve 1 mM palmitat + 100 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde trigliserid düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak yüksekti. 10 µM, 25 µM, 50µM ve 100 µM ökaliptol uygulamaları, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde trigliserid düzeylerini anlamlı olarak değıştirmede. 250 µM ve 500 µM ökaliptol uygulamaları, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde trigliserid düzeylerini anlamlı olarak azalttı.
4. 1 mM palmitat uygulanan tüm hücrelerde nükleer fraksiyonda bulunan NF-κB düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak yüksekti. 250 µM ve 500 µM ökaliptol uygulamaları, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde nükleer NF-κB düzeylerini anlamlı olarak azalttı.
5. 1 mM palmitat uygulanan tüm hücrelerde sitoplazmik fraksiyonda bulunan NF-κB düzeyleri kontrole göre yüksekti. 250 µM ve 500 µM ökaliptol uygulamaları, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde sitoplazmik NF-κB düzeylerini anlamlı olarak değıştirmede.
6. 1 mM palmitat ve 1 mM palmitat + 250 µM ökaliptol uygulanan hücrelerde nükleer fraksiyonda bulunan NRF2 düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak yüksekti. 1 mM palmitat + 500 µM ökaliptol uygulanan hücreler ile kontrol grubu arasında nükleer NRF2 düzeyleri açısından anlamlı fark yoktu. 250 µM ve 500 µM ökaliptol uygulamaları, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde nükleer NRF2 düzeylerini anlamlı olarak değıştirmede.
7. Grupların sitoplazmik fraksiyonda bulunan NRF2 düzeyleri arasında anlamlı fark yoktu.
8. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 1 mM palmitat uygulanan grupların tümünde HO-1 düzeyleri anlamlı olarak yüksekti. 250 µM ve 500 µM ökaliptol uygulamaları, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde HO-1 düzeylerini anlamlı olarak değıştirmede.

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı, ökaliptolün insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde palmitat ile oluşturulan hücresel hepatotoksisitede hücre canlılığına, yağlanmaya, inflamasyona ve antioksidan savunmaya etkisini araştırmaktır.

Deneysel modeli oluşturmak için; HepG2 hücreleri 1 mM palmitat ile 24 saat inkübe edildi ve ökaliptol konsantrasyonları palmitat ile aynı anda hücrelere uygulandı. Hücre canlılığı 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür testi ile değerlendirildi. Yağlanmanın değerlendirilmesi için hücre içi trigliserid düzeyleri ölçüldü. Nükleer faktör  $\kappa$ B, nükleer faktör eritroid 2-ile ilişkili faktör 2 ve hem oksijenaz-1 düzeyleri western blot yöntemiyle ölçüldü.

1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrole göre karşılaştırıldığında, hücre canlılığı anlamlı olarak azalırken; trigliserid, sitoplazmadaki ve nükleustaki nükleer faktör  $\kappa$ B, nükleustaki nükleer faktör eritroid 2-ile ilişkili faktör 2 ve hem oksijenaz-1 düzeyleri ise anlamlı olarak arttı. 250  $\mu$ M ve 500  $\mu$ M ökaliptol uygulaması, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde; hücre canlılığında anlamlı olarak artışa ve trigliserid ve nükleustaki nükleer faktör  $\kappa$ B düzeylerinde ise anlamlı olarak azalmaya yol açtı.

Sonuç olarak çalışmamız, ökaliptolün, palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde sitotoksisiteyi, yağlanmayı ve inflamasyonu azaltırken, antioksidan savunma üzerine ise anlamlı bir etkisinin olmadığını gösterdi. Bu sonuçlarımız, ökaliptolün palmitatın yol açtığı hepatoksisiteyi önlemede etkili olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, ökaliptol, palmitat, nükleer faktör  $\kappa$ B, nükleer faktör eritroid 2-ile ilişkili faktör 2, hem oksijenaz-1.



## **EFFECT OF EUCALYPTOL ON PALMITATE-INDUCED CELLULAR HEPATOTOXICITY IN HUMAN-DERIVED HEPATOMA CELLS**

### **SUMMARY**

This study aims to investigate the effects of eucalyptol on cell viability, steatosis, inflammation, and antioxidant defense in palmitate-induced cellular hepatotoxicity in human hepatoma cells.

HepG2 cells were incubated with 1 mM palmitate for 24 hours to induce the experimental model and eucalyptol concentrations were applied to the cells simultaneously with palmitate. Cell viability was evaluated with the 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide test. Intracellular triglyceride levels were measured to evaluate steatosis. Nuclear factor  $\kappa$ B, nuclear factor erythroid 2-related factor 2, and heme oxygenase-1 levels were measured by the western blot method.

While cell viability was decreased significantly; triglyceride, nuclear factor  $\kappa$ B in the cytoplasm and nucleus, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in the nucleus, and heme oxygenase-1 levels were significantly increased in 1 mM palmitate-treated cells when compared to the control. 250  $\mu$ M and 500  $\mu$ M eucalyptol treatments caused a significant increase in cell viability and a significant decrease in triglyceride and nuclear factor  $\kappa$ B levels in the nucleus, in 1 mM palmitate-treated cells.

In conclusion, our study showed that while eucalyptol reduced cytotoxicity, steatosis, and inflammation in palmitate-treated HepG2 cells, it had no significant effect on antioxidant

defense. These results show that eucalyptol can be effective in preventing palmitate-induced hepatotoxicity.

**Keywords:** Non-alcoholic fatty liver disease, eucalyptol, palmitate, nuclear factor  $\kappa$ B, nuclear factor erythroid 2-related factor 2, heme oxygenase-1.



## KAYNAKLAR

1. Uçar K, Göktaş Z. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve kafein. *J Nutr Diet.* 2018;46(2):183–91.
2. Song Z, Song M, Lee DYW, 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.
3. Gunn PJ, Green CJ, Pramfalk C, Hodson L. In vitro cellular models of human hepatic fatty acid metabolism: differences between Huh7 and HepG2 cell lines in human and fetal bovine culturing serum. *Physiol Rep.* 2017;5(24):e13532.
4. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor J-E. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact.* 2007;165(2):106–16.
5. Maćzka W, Duda-Madej A, Górny A, Grabarczyk M, Wińska K. Can eucalyptol replace antibiotics? *Molecules.* 2021;26(16):4933.
6. Cui Y, Zhang Q, Yin K, Song N, Wang B, Lin H. DEHP-induce damage in grass carp hepatocytes and the remedy of Eucalyptol. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;206: 111151.
7. Seol GH, Kim KY. Eucalyptol and its role in chronic diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2016;929:389–98.
8. Yılmaz OF. Oksidatif stres ve karaciğer hastalıkları. *Muş Alparslan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2021;1(1):8–15.

9. Zenkov NK, Kozhin PM, Chechushkov AV, Martinovich GG, Kandalintseva NV, Menshchikova EB. Mazes of Nrf2 regulation. *Biochemistry* . 2017;82:556–64.
10. Dodson M, de la Vega MR, Cholanians AB, Schmidlin CJ, Chapman E, Zhang DD. Modulating nrf2 in disease: timing is everything. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2019;59:555–75.
11. Küçükler S, Özdemir S, Çomaklı S, Kandemir F. Effects of chrysin against isoniazid-induced lung injury in rats. *Kocatepe Vet J*. 2020;13(2):161-71.
12. Lin Q, Weis S, Yang G, Weng Y-H, Helston R, Rish K, et al. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem*. 2007;282(28):20621–33.
13. Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med*. 2019;18:121–6.
14. Kulms D, Schwarz T. NF-kappaB and cytokines. *Vitam Horm*. 2006;74:283–300.
15. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol*. 2015;62(1):47–64.
16. Sarıgül F, Deniz M. Prevalence and related risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in HIV/AIDS patients. *KLİMİK Derg*. 2021;34(S1):50–5.
17. Hazer İ, Kabukçu HO, Yağcı M, Ertürk Z, Yıldırım GK, Kirel B. The association of lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease in children with obesity. *Türk Pediatri Ars*. 2020;55(3):263–9.
18. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73–84.
19. Milić S, Lulić D, Štimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol*. 2014;20(28):9330–7.
20. Gerges SH, Wahdan SA, Elsherbiny DA, El-Demerdash E. Non-alcoholic fatty liver disease: An overview of risk factors, pathophysiological mechanisms, diagnostic procedures, and therapeutic interventions. *Life Sci*. 2021;271:119220.
21. Alkol dışı karaciğer hastalığı (NAFLD) klinik rehberi. Ankara: Türk Karaciğer Araştırma Derneği;2021.

22. Cobbina E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Rev.* 2017;49(2):197–211.
23. Uçar K, Ayaz A. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında potansiyel tedavi yaklaşımı: e vitamini. *J Nutr Diet.* 2021;49(1):82–90.
24. Arzumanian VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV. The curious case of the hepg2 cell line: 40 years of expertise. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23):13135.
25. Gutteridge JMC, Halliwell B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;502(2):183–6.
26. Rives C, Fougerat A, Ellero-Simatos S, Loiseau N, Guillou H, Gamet-Payrastre L, et al. Oxidative stress in NAFLD: role of nutrients and food contaminants. *Biomolecules.* 2020;10(12):1702.
27. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(9):689–709.
28. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol.* 2020;94(3):651–715.
29. Sarman E, Gülle K. Resveratrol güçlü bir antioksidan mı? Bingöl Üniversitesi Sağlık Dergisi. 2021;2(1):57–63.
30. Xu D, Xu M, Jeong S, Qian Y, Wu H, Xia Q, et al. The role of nrf2 in liver disease: novel molecular mechanisms and therapeutic approaches. *Front Pharmacol.* 2019;9:1428.
31. Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, et al. Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016.
32. Akdoğan M, Yöntem M. Sitokinler. *Online türk sağlık bilim derg.* 2018;3(1):36-45.
33. Sel M. Effects of polyphenol-rich plant products on the nuclear factor-kappa B pathway. *Istanb Bilim Univ Florence Nightingale J Med.* 2018;4(4):208–12.
34. Zhao W, Yan Y, Xiao Z, Wang M, Xu M, Wang Z, et al. Bicyclol ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in mice via inhibiting MAPKs and NF-κB signaling pathways. *Biomed Pharmacother.* 2021;141:111874.

35. Cai Z-M, Peng J-Q, Chen Y, Tao L, Zhang Y-Y, Fu L-Y, et al. 1,8-Cineole: a review of source, biological activities, and application. *J Asian Nat Prod Res.* 2021;23(10):938–54.
36. Mishra P, Gupta P, Srivastava AK, Poluri KM, Prasad R. Eucalyptol/  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex loaded gellan/PVA nanofibers as antifungal drug delivery system. *Int J Pharm.* 2021;609:121163.
37. 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.
38. Ahmadian S, Barar J, Saei AA, Fakhree MAA, Omid Y. Cellular toxicity of nanogenomedicine in MCF-7 cell line: MTT assay. *J Vis Exp.* 2009;(26).pii:1191.
39. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265–75.
40. Suzuki K, Bose P, Leong-Quong RY, Fujita DJ, Riabowol K. REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC Res Notes.* 2010;3(1):1-6.
41. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671–5.
42. Gondim F de L, Serra DS, Cavalcante FSÁ. Effects of Eucalyptol in respiratory system mechanics on acute lung injury after exposure to short-term cigarette smoke. *Respir Physiol Neurobiol.* 2019;266:33–8.
43. Rodenak-Kladniew B, Castro A, Stärkel P, Galle M, Crespo R. 1,8-Cineole promotes G0/G1 cell cycle arrest and oxidative stress-induced senescence in HepG2 cells and sensitizes cells to anti-senescence drugs. *Life Sci.* 2020;243:117271.
44. Yakşi E, Özgün E. The effect of rosmarinic acid on cell viability, steatosis, paraoxonase-1, and paraoxonase-3 protein levels in palmitate-induced non-alcoholic fatty liver disease model in HepG2 cells. *Namık Kemal Tıp Dergisi.* 2021;9(2):135–42.
45. Sayılan Özgün G, Özgün E, Tabakçioğlu K, Süer Gökmen S, Eskiocak S. İnsan kaynaklı karaciğer (HepG2) hücrelerinde palmitat ile oluşturulan yağlanmanın paraoksonaz-1 ve paraoksonaz-3 enzimlerine etkisi. *Arch Clin Exp Med.* 2019;4(3):118–21.
46. Murata S, Ogawa K, Matsuzaka T, Chiba M, Nakayama K, Iwasaki K, et al. 1,8-cineole ameliorates steatosis of pten liver specific ko mice via akt inactivation. *Int J Mol Sci.* 2015;16(6):12051–63.

47. Okada H, Takabatake R, Honda M, Takegoshi K, Yamashita T, Nakamura M, et al. Peretinoin, an acyclic retinoid, suppresses steatohepatitis and tumorigenesis by activating autophagy in mice fed an atherogenic high-fat diet. *Oncotarget*. 2017;8(25):39978–93.
48. Syed AA, Reza MI, Shafiq M, Kumariya S, Singh P, Husain A, et al. Naringin ameliorates type 2 diabetes mellitus-induced steatohepatitis by inhibiting RAGE/NF- $\kappa$ B mediated mitochondrial apoptosis. *Life Sci*. 2020;257:118118.
49. Qiu T, Yang X, Wang J, Pan C, Chu X, Xiong J, et al. Obesity-induced elevated palmitic acid promotes inflammation and glucose metabolism disorders through GPRs/NF- $\kappa$ B/KLF7 pathway. *Nutr Diabetes*. 2022;12(1):23.
50. Park JS, Kang DH, Lee DH, Bae SH. Concerted action of p62 and Nrf2 protects cells from palmitic acid-induced lipotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;466(1):131–7.
51. Zhu Y, Ren C, Zhang M, Zhong Y. Perilipin 5 reduces oxidative damage associated with lipotoxicity by activating the pi3k/erk-mediated nrf2-are signaling pathway in ins-1 pancreatic  $\beta$ -cells. *Front Endocrinol* . 2020;11:166.
52. Faridvand Y, Haddadi P, Nejabati HR, Ghaffari S, Zamani-Gharehchamani E, Nozari S, et al. Sulforaphane modulates CX3CL1/CX3CR1 axis and inflammation in palmitic acid-induced cell injury in C2C12 skeletal muscle cells. *Mol Biol Rep*. 2020;47:7971–7.
53. Jiang X-S, Cai M-Y, Li X-J, Zhong Q, Li M-L, Xia Y-F, et al. Activation of the Nrf2/ARE signaling pathway protects against palmitic acid-induced renal tubular epithelial cell injury by ameliorating mitochondrial reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction. *Front Med*. 2022;9:939149.
54. Chen W, Lu Y, Hu D, Mo J, Ni J. Black mulberry (*Morus nigra* L.) polysaccharide ameliorates palmitate-induced lipotoxicity in hepatocytes by activating Nrf2 signaling pathway. *Int J Biol Macromol*. 2021;172:394–407.
55. Ding X, Jian T, Li J, Lv H, Tong B, Li J, et al. Chicoric acid ameliorates nonalcoholic fatty liver disease via the ampk/nrf2/nfb signaling pathway and restores gut microbiota in high-fat-diet-fed mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:9734560.
56. Jiang Z, Guo X, Zhang K, Sekaran G, Cao B, Zhao Q, et al. The essential oils and eucalyptol from *L. prevent acetaminophen-induced liver injury by activating nrf2-keap1 and enhancing apap clearance through non-toxic metabolic pathway*. *Front Pharmacol*. 2019;10:782.

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller	Sayfa no
Şekil 1. Ökalyptolün HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi.....	15
Şekil 2. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökalyptolün hücre canlılığına etkisi.....	16
Şekil 3. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökalyptolün trigliserid düzeylerine etkisi.....	17
Şekil 4. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökalyptolün nükleer fraksiyonda bulunan NF-Kappa B düzeylerine etkisi .....	18
Şekil 5. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökalyptolün sitoplazmik fraksiyonda bulunan NF-kappa B düzeylerine etkisi. ....	19
Şekil 6. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökalyptolün nükleer fraksiyonda bulunan Nükleer faktör eritroid 2-ile ilişkili faktör 2 düzeylerine etkisi.....	20
Şekil 7. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökalyptolün sitoplazmik fraksiyonda bulunan Nükleer faktör eritroid 2-ile ilişkili faktör 2 düzeylerine etkisi.....	21
Şekil 8. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinde ökalyptolün heme oksijenaz 1 düzeylerine etkisi.....	22

## ÖZGEÇMİŞ

