

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



**İN VİTRO HEPATİK OKSİDATİF HASARDA CARVACROL'ÜN  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meryem Nur ATABAY

**Danışman**

Dr.Öğr.Üyesi Mehmet Mustafa İŞGÖR

**HATAY-2019**

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

**İN VİTRO HEPATİK OKSİDATİF HASARDA CARVACROL'ÜN  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meryem Nur ATABAY

**Danışman**

Dr.Öğr.Üyesi Mehmet Mustafa İŞGÖR

**HATAY-2019**

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

**İN VİTRO HEPATİK OKSAİDATİF HASARDA CARVACROL'ÜN  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi  
Meryem Nur ATABAY

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından .../.../...günü sözlü yapılan  
tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi:**

Jüri Başkanı:

Üye:

Üye:

Bu tez, Enstitümüz Biyokimya(Vet)Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

.../.../2019

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezım süresince bilgilerini ve deneyimini benden esirgemeyen danıőmanım Doktor Öğretim Üyesi Mehmet Mustafa İŞGÖR'e, tezime yapmıő olduğu katkılardan dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Altuğ KÜÇÜKGÜL'e ve Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalının değerli öğretim üyelerine teşekkürlemlerini sunarım. Yaőamınmın her aőamasında olduğu gibi Yüksek Lisans öğretimimde de emeğini ve desteğini esirgemeyen anne ve babam Elif-Ahmet ATABAY'a, teşekkürlerimi bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

Kabulve Onay.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ÖZET .....	IX
ABSTRACT.....	X
1.GİRİŞ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Nonalkolik Karaciğer Yağlanması.....	2
2.2.Polyol Yolağı Ve Aldoz Redüktaz Enzimi .....	5
2.2.1.Polyol Yolağı.....	5
2.2.2 Aldoz Redüktaz Enzimi.....	6
2.3.Carvacrol.....	8
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
3.1.Hücre Kültürü .....	11
3.2.Çalışmada Kullanılan Kimyasallar .....	11
3.3.Viyabilite Testi .....	12
3.4.Hücre Lizatlarının Hazırlanması.....	12
3.5.Protein Düzeyleri Analizleri .....	12
3.6.Glutasyon(GSH)Analizi.....	13
3.7.Nitrik Oksit (NO) Düzeylerinin Belirlenmesi .....	13
3.8.Hücre Görüntüleri .....	14
3.9.İstatiksel Metot .....	14
4.BULGULAR.....	15
4.1.Viyabilite Bulguları.....	15
4.1.1.Farklı Konsantrasyonlarda Palmitatın Viyabilite Üzerine Etkileri .....	15
4.1.2.Farklı Konsantrasyonlarda Karvakrolün Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri .....	16

4.1.3.Karvakrol Ve Palmitatın Birlikte Kullanımının Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri. ....	17
4.2.Protein Düzeyi Bulguları.....	17
4.2.1.Aldoz Redüktaz Protein Düzeyi.....	18
4.3.Spektrofotometrik Analiz Bulguları.....	18
4.3.1.GSH Düzeyi Bulguları.....	19
4.4.Nitrit Miktarı Bulguları.....	20
4.5.Hücre Görüntü Bulguları.....	20
4.5.1.Kontrol grubu hücre görüntüsü.....	21
4.5.2.Carvacrol'ün 5 µM konsantrasyonda uygulandığı grup hücre görüntüsü.....	22
4.5.3. Palmitatın 300 µM konsantrasyonda uygulandığı grup hücre görüntüsü.....	23
4.5.4. Palmitat (300 µM) ve carvacrol'ün (5 µM) birlikte uygulandığı gruptaki hücre görüntüsü.....	24
5.TARTIŞMA .....	25
6.SONUÇ.....	29
7.KAYNAKLAR .....	30
ÖZGEÇMİŞ .....	35

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.2.1.Aldozredüktaz ve sorbitol dehidrogenaz reaksiyonları.....	4
Şekil 2.2. AldozRedüktaz Enzimi ve Polyol Yolağı.....	7
Şekil 2.3.Carvacrol'ün kimyasal yapısı.....	9
Şekil 4.1.Farklı konsantrasyonlardaki palmitatın hücre canlılığı üzerine etkileri (24 saat).....	15
Şekil 4.2.Farklı dozlardaki carvacrol'ün hücre canlılığına etkileri (24 saat).....	16
Şekil 4.3.Palmitat uygulanımı sonrası carvacrol uygulanan gruptaki hücre canlılığı (24 saat).....	17
Şekil 4.4.Deney gruplarında hücre içi AR protein düzeyleri (24 saat).....	18
Şekil4.5.Deney gruplarında hücre içi GSHdüzeyleri(24 saat).....	19
Şekil 4.6.Hücelere carvacrol ve palmitat uygulanımının nitrit düzeyleri üzerine etkileri (24 saat).....	20
Şekil 4.7.Kontrol grubu hücre fotoğrafı .....	21
Şekil 4.8. Carvacrol'ün 5 µM konsantrasyonda eklendiği gruptaki hücre fotoğrafı... ..	22
Şekil 4.9. Palmitatın 300 µM konsantrasyonda eklendiği gruptaki hücre fotoğrafı.....	23
Şekil 4.10.Palmitat (300 µM) ve carvacrol'ün (5 µM) birlikte uygulandığı gruptaki hücre fotoğrafı .....	24

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge.3.1. Deneysel çalışma düzeni.....	11
---	----



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKR	: Aldo –KetoRedüktaz
AR	: AldoRedüktaz
AChE	:AsetilkolinEsteraz
CAR	: Carvacrol
CAT	: Katalaz
DMEM	: Dulbecco’sModifiedEagle’sMedium
DTNB	:5,5-ditiyobis-(2-nitro benzoik asit)
FBS	:Fötal Sığır Serum
FDA	: Federal İlaç İdaresi
GF	:Büyüme Faktörü
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz x
HNE	:4-Hidroksinonenal
LPS	: Lipopolisakkarit
NAFLD	:Nonalkolik karaciğer hastalığı
NFk $\beta$	:Nükleer Faktör Kappa Beta
NO	: Nitrik Oksit
PMSF	: Fenilmetansülfonilflorit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDH	: SorbitolDehidrogenaz
STZ	: Streptozotosin
SOD	: Süper oksitdismutaz
TCAA	: Triklor Asetik Asit
T2DM	:Tip 2 DiyabetesMellitus
T1DM	:Tip 1 DiyabetesMellitus
TG	: Trigliserit

## ÖZET

### **İn Vitro Hepatik Oksidatif Hasarda Carvacrol'ün Etkinliğinin Araştırılması**

Non-alkolik steatohepatit (NASH); karaciğerde, özellikle trigliserit olmak üzere yağ birikimi ile karakterize, yaygın görülen bir hastalıktır. NASH insülin direnciyle yakından ilişkilidir ve metabolik sendromun hepatic belirtisi olarak kabul edilmektedir. Hastalığın tedavisinde araştırmalar doğal kaynaklardan elde edilen antioksidan moleküllere yoğunlaşmıştır. Bu bağlamda araştırmamızda üniversitemizin de bulunduğu bölge bitki florasında bulunan kekiğin etken maddesi carvacrol hastalığın tedavisi amacıyla in vitro denemelerle ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Çalışmada materyal olarak insan hepatosit hücre hattı ( HepG-2, ATCCHB-8065 ) kullanıldı. Hücreler “Dulbecco's Modified Eagle Medium” (DMEM) besiyeri ortamında üretildi. Deneme grupları kontrol (kont.), palmitat eklenen grup (P), carvacrol eklenen grup (C) ve palmitat ile birlikte carvacrol eklenen grup (+C) olarak tasarlandı. Farklı konsantrasyonlarda palmitat (150, 300 ve 450  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) ve carvacrol (1, 5 10 ve 10  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) 24 saat sürelerle hücrelere uygulanarak etkin konsantrasyon tespitleri MTT viyabilite testi ile ortaya konuldu. Hücrelerden elde edilen homojenatlardan hücre içi glutatyon (GSH) ve nitrit düzeyi (NO) spektrofotometrik olarak analiz edildi. Yine bu örneklerdeki aldozredüktaz düzeyleri (AR) ELİSA metoduyla araştırıldı. Çalışmadan elde edilen viyabilite verilerine göre palmitatın 300  $\mu\text{M}$  konsantrasyonu kontrole göre % 45 oranında hücre kayıplarına neden olduğu, carvacro'lün ise 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$  konsantrasyonunun hücrelere uygulanımıyla bu kayıpların % 41 oranında önlediği tespit edildi. Çalışmada palmitat ve carvacro'lün GSH düzeyinde önemli bir değişiklik oluşturmadığı ancak NO düzeylerini anlamlı düzeyde azalttığı bulundu. Yine hücre içi AR protein düzeyini palmitat arttırırken, carvacrol bu artışı % 1.7 oranında önlediği tespit edildi.

Tüm bu verilen doğrultusunda carvacro'lün non-alkolik steatozis gibi yağlanmaya bağlı karaciğer hastalıklarında potansiyel bir etken madde olarak düşünülebileceği kanısına varılmıştır. Bu savın tam olarak söylenebilmesi için ise *in vivo* ve daha ileri moleküler araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

**Anahtar kelimeler:**Non-alkolik steatozis, palmitat, carvacrol, oksidatif stres, aldozredüktaz.

## ABSTRACT

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

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH); is a common disease characterized by accumulation of fat in the liver, especially triglycerides. NASH is closely associated with insulin resistance and is considered as a hepatic symptom of metabolic syndrome. Research in the treatment of the disease has focused on antioxidant molecules derived from natural sources. In this context, carvacrol, the active ingredient of thyme in plant flora of the region where our university is located, has been tried to be demonstrated by in vitro experiments for the treatment of the disease.

Human hepatocyte cell line (HepG-2, ATCCHB-8065) was used in the study. Cells were grown on Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) medium. Experimental groups were designed as control (control), palmitate added group (P), carvacrol added group (C) and palmitate and carvacrol added group (+ C). At different concentrations of palmitate (150, 300 and 450  $\mu\text{M}$  / ml) and carvacrol (1, 5 and 10  $\mu\text{M}$  / ml) were applied to the cells for 24 hours and effective concentration determinations were determined by MTT viability test. Intracellular glutathione (GSH) and nitrite levels (NO) were analyzed spectrophotometrically from homogenates obtained from cells. Besides, aldose reductase levels (AR) in these samples were investigated by ELISA method. According to the viability data obtained from the study, it was found that 300  $\mu\text{M}$  concentration of palmitate caused 45% cell losses compared to the control, and 5  $\mu\text{M}$  / ml concentration of carvacrol prevented 41% of these cell losses. In this study, palmitate and carvacrol did not produce a significant change in GSH levels but it significantly reduced NO levels. In addition, palmitate increased intracellular AR protein level, while carvacrol inhibited this increase by 1.7%.

According to all these data, it was concluded that carvacrol can be considered as a potential active agent in fatty liver diseases such as non-alcoholic steatosis. In order to make this claim fully available, *in vivo* and further molecular research is needed.

**Keywords:** Non-alcoholic steatosis, palmitate, carvacrol, oxidative stress, aldose reductase

# 1.GİRİŞ

Nonalkolik karaciğer yağlanması (NAFLD); genetik bozukluklar dışında temelde enerji alımı ve fiziksel hareketsizliğin sebep olduğu, obezite, insülin direnci ve diğer metabolik komplikasyonlarla yakından ilişkili steatohepatik ile karakterize bir hastalıktır. Steatohepatitin oluşum mekanizması tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, akut inflamasyon ve oksidatif stresin hastalığın ilerlemesini tetiklediği bilinmektedir. AR enziminin diyabet ve diğer hastalıkların yanısıra, karaciğer hastalıklarında lipid homeostazisi, hepatit ve fibrozis gelişimiyle ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalara bakıldığında, AR enzimi inhibisyonunun NAFLD gelişiminin önlenmesinde yararlı olabileceği öngörülmektedir.

Carvacrol, Origanum türlerine doğal kokusunu veren bir monoterpenik fenol bileşimidir. Başlıca kekik, bergamot ve tere gibi bazı bitki türlerinin en temel biyoaktif bileşenidir. Bu bileşiğin antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antikanser gibi birçok biyolojik aktivitelere sahip olduğu yapılan literatür çalışmalarında rapor edilmiştir. Carvacrol'un farmakolojik etkinliğinde, kimyasal yapısında bulunan serbest hidroksil gruplarının varlığı ve delokalize elektron dağılımına sahip olması gibi özellikler önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle sunulan projede carvacrol'un karaciğerin oksidatif kaynaklı hasarının önlenmesinde potansiyel etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu bağlamda, sunulan projede, *in vitro* karaciğer hücrelerinde palmitat uyarımlı hasarın önlenmesinde, üniversitemizin bulunduğu yöre florasının baskın türlerinden olan kekiğin antioksidan bileşiği carvacrol'un potansiyel faydalarının araştırılması projenin amaç ve önemini ortaya koymaktadır. Yine tezde öğrencinin akademik yeteneklerinin artırılması ana önemi arz etmektedir.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nonalkolik Karaciğer Yağlanması

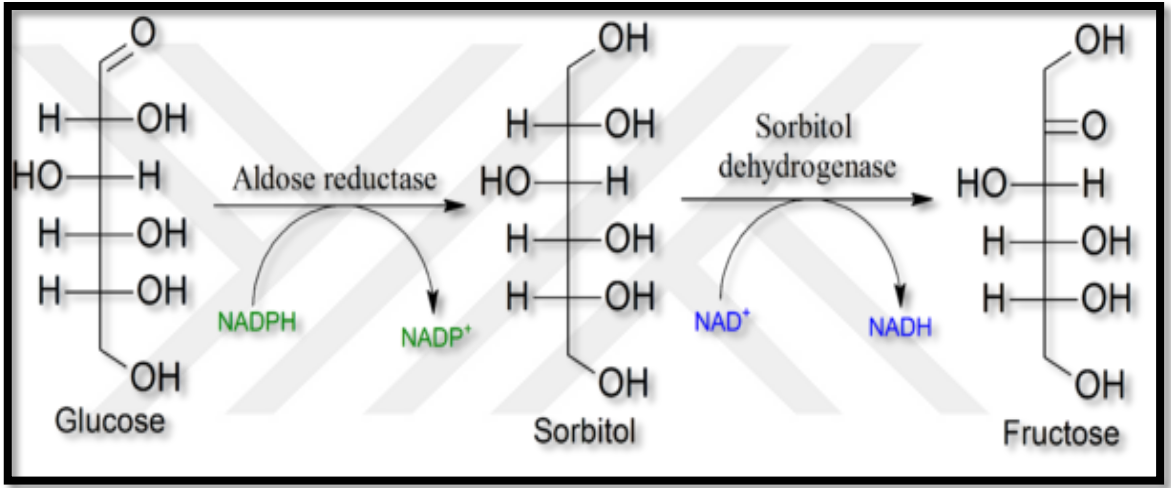
Omurgalıların önemli bir evrimsel özelliği, çok sayıda fizyolojik ihtiyacı karşılayan çok yönlü bir organ olan karaciğerin gelişmiş özellik göstermesidir. Karaciğer, özellikle de metabolik homeostazın korunmasında önemli rol oynamaktadır. Lipit metabolizmasının düzenlenmesi karaciğerin temel fonksiyonlarından biridir. Karaciğer her iki dolaşımdan da lipitler alabilir ve lipid partiküllerini kan akışına salgılayabilir (Davidson ve Cliff 2011). Öte yandan, karaciğerde aşırı yağ birikimi patolojik bir durum olarak kabul edilir (Kaplan 1985). Kronik yağ birikiminin patolojisi ilk olarak akut hepatit alevlenmesi potansiyeli ile ilişkili bir durum olan alkolizm ile karakterize edilmiştir (Lieber ve Rubin 1969). İlk olarak 1981 yılında Jurgen Ludwig, yağ birikimi patolojisinin nonalkolik olarakta gerçekleşebileceğini açıklamıştır (Ludwig ve ark.1980). Ultrasonda yağlı karaciğer pozitif bulguları olan hastaların yaklaşık %30'unda biyopside NAFLD saptanmıştır (Williams ve ark. 2011).

Klinik olarak, NAFLD alkolün çok kullanımı veya viral hepatit dışında yüksek karaciğer enzimleri tarafından tetiklenir. Aspartat aminotransferaz / alanin aminotransferaz oranı genellikle ilerlemiş fibrozis oluşana kadar stabil görülmektedir (Angulo ve ark. 1999). Abdominal görüntüleme çalışmaları sırasında hepatik steatoz rastlantısal bir bulgudur. Yakın tarihli bir rapor, ultrasonun karaciğer hastalıklarının diğer nedenleri için çalışmadan sonra hepatik steatozu saptamada %92 duyarlılığa ve %100 özgüllüğe sahip olduğunu göstermiştir (Hamaguchi M ve ark. 2007). Bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme de hepatik steatoz hakkında bilgi verir. Proton manyetik rezonans spektroskopisi (1H MRS), steatozun en hassas ve kesin miktarını sunduğu için epidemiyolojik araştırmalarda popülerlik kazanmaktadır (Petersen ve ark. 2010, Kozlitina ve ark. 2011). Görüntüleme yöntemlerinde kaydedilen ilerlemelere rağmen, karaciğer biyopsisi NAFLD tanısında steatohepatit veya siroz ile basit steatozis arasındaki ayırım yapmanın tek yolu olduğu için NAFLD tanısında hala altın standart niteliğindedir. Biyopsinin örnekleme ve yorumlama değişkenliğinden dolayı NAFLD evrelemesinin doğruluğunu sınırlamaktadır (Ratziu ve ark. 2005). Hastalığın patofizyolojisini netleştirmek ve potansiyel olarak yeni tanı stratejileri ve terapötik hedefleri belirlemek

amacıyla lipoprotein metabolizması ile NAFLD arasındaki ilişkinin ortaya konulması önemlidir.

NAFLD, hem gelişmiş olan hem de gelişmekte olan ülkeleri etkileyen, artan bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir (Fan ve ark. 2009, Chitturi ve ark. 2011). Batı dünyasında, genel yetişkin popülasyonunda NAFLD prevalansı %20 ile %30 arasında değişmektedir (Browning ve ark. 2004). Bu prevalans, tip 2 diabetes mellitus (T2DM) olan hastalarda %70'e ve obezlerde ise %90'a kadar yükselebilmektedir (Machado ve ark. 2006, Targher ve ark. 2007). Son epidemiyolojik birçok çalışmada, NAFLD hastalığının Amerika Birleşik Devletlerinde görülme sıklığının %33 olduğu rapor edilmiştir. En yüksek prevalans Hispanikler ve Kafkas erkekleri arasında bulunmuştur (Guerrero ve ark. 2009). NAFLD; genetik bozukluklar dışında; obezite, insülin direnci ve diğer metabolik komplikasyonlarla yakından ilişkilidir ve steatohepatik özellik gösteren bir hastalıktır (Festi ve ark. 2004). Karaciğer dokusu enerji metabolizmasında, özellikle glukoz ve lipid homeostazında büyük bir rol oynar. Özellikle tip II diabetes mellitus (T2DM) olan diyabetin, genellikle hepatik steatoz veya NAFLD gelişmesine yol açabilecek, hepatik trigliserit birikimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Cusi 2009, Xu ve ark.2009). Steatozisin oluşum mekanizması tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, akut inflamasyon ve oksidatif stres hastalığın ilerlemesini tetiklemektedir (Day ve James 1998). NAFLD, insülin direnciyle ilişkilidir ve metabolik sendromun hepatik belirtisi olarak kabul edilmektedir (Marchesini ve ark. 2001; Kotronen ve Yki-Jarvinen 2008). Hipertansiyon ve hipertrigliseridemi NAFLD ile bağlantılıdır ve son çalışmalar bunun kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olduğunu göstermektedir (Assy ve ark. 2000, Donati ve ark. 2004, Ekstedt ve ark. 2006, Targher 2007).

İki anahtar enzimden oluşan polyol yolağı, aldoz redüktaz (AR) ve sorbitol dehidrojenazdan (SDH) oluşmaktadır ve çeşitli diyabetik komplikasyonların patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu baypas yolağında, koenzim NADPH'nin NADP'ye eş zamanlı oksidasyonu ile birlikte AR tarafından sorbitol glukoza dönüştürülür ve daha sonra SDH, NAD'nin NADH'ye indirgenmesiyle sorbitol'ü fruktoza dönüştürür.



Şekil 2.1. Aldo z redüktaz ve sorbitol dehidrojenaz reaksiyonları

Aldoz redüktaz enziminin diyabet ve diğer hastalıkların yanısıra, karaciğer hastalıklarında da lipid homeostazisi, hepatit ve fibrozis gelişimiyle ilişkili olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (Brown ve ark. 2005, Qiu ve ark. 2012). Yapılan çalışmaların birçoğunda, AR enzim inhibisyonunun NAFLD patogenezinin önlenmesinde yararlı olabileceği öngörülmektedir (Ekstedt 2006).

Normal glisemik şartlarda, glikoz hücrede çoğunlukla glikoliz yoluyla metabolize edilmektedir ve polyol yolağı bu olguda oldukça düşük düzeyde görev almaktadır. Ancak, hiperglisemide polyol yolağı aktivitesi artarak glikozun %30'dan fazlası bu yolla metabolize edilir (Nishimura 1998). Polyol yolağının oksidatif stresi nasıl tetiklediği tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak polyol yolağının aktifleşmesiyle NADPH tüketiminin artmasına bağlı olarak glutatyon redüktaz (GR) enziminin kullandığı NADPH

azalmaktadır. Bu nedenle, ROS'un önemli bir temizleyicisi olan GSH'nin üretimi azalmakta ve hücrenin artan oksidatif strese dayanıklılığının azaldığı düşünülmektedir. Yolağın devamında SDH enzimi ise sorbitolu fruktoza dönüştürürken, NAD<sup>+</sup> ise NADH'ye dönüştürülmektedir. Bu durum, NADH oksidaz katalizliğinde NADH oranını arttırarak ROS'ların artışına bağlı mitokondriyal membrana zarar verebilmektedir. Ayrıca bu yolda üretilen fruktoz, fruktoz-3-fosfat ve 3-deoksiglukoza metabolize edilmektedir (Evans ve ark. 2002, King ve ark. 2004). Sonuç olarak, artan glikoz akışı ve aktifleşmiş polyol yolağına bağlı olarak, hücreler oksidatif strese karşı daha duyarlı hale gelmektedir. Bu sebeple, yolağın hız düzenleyici enzimi AR'nin inhibisyonu hiperglisemide önemli bir yer tutmaktadır (Sango ve ark. 2006).

## **2.2 Polyol Yolağı Ve Aldoz Redüztaz Enzimi**

### **2.2.1 Polyol Yolağı**

Polyol yolağı; sırasıyla aldoreduktaz (AR veya AKR1B1, EC1.1.1.21) ve sorbitoldehidrojenaz (SDH, EC1.1.1.14) enzimleri tarafından katalize edilmiş reaksiyonlarla glikozu fruktoza dönüştüren metabolik bir şanttır (Hers 1960, Clements 1986). Yolağın ilk basamağında AR, kofaktör NADPH'nin yardımıyla, glikozun sorbitol'e indirgemisini katalize eder. İkinci basamakta ise SDH enzimi NAD<sup>+</sup> kullanarak sorbitol'ü fruktoza dönüştürür. AR / polyol yolağının böbrek, retina, lens ve periferik nöron dokuları da dâhil olmak üzere birçok dokuda diyabetik komplikasyonların gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Brownlee 2001, Alexiou ve ark. 2009). Karaciğerde ise normal fizyolojik koşullar altında AR'nin ifadesi nispeten düşüktür (Markus ve ark. 1983). Bunun yanısıra, polyol yolağının ikinci enzimi olan sorbitol dehidrojenazın hepatik ifadesi çok daha yüksektir (Jeffery ve Jornvall 1983). Normal durumlarda karaciğerdeki AR ifadesinin nispeten düşük seviyelerinden dolayı, geçmişte karaciğerdeki rollerine nispeten daha az dikkat gösterilmiştir. Ancak son zamanlarda artan kanıtlar, hepatik AR'nin ifadesinin hastalık durumunda arttığını belirtmektedir. Örneğin; ratlarda hepatik AR ekspresyonunun indüklenmesinin hepatit ve hepatoma gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Takahashi ve ark. 1996). Benzer bir şekilde, AR'nin insan hepatoselüler karsinomada önemli ölçüde upregüle olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (Takahashi ve ark.1995, Zeindl-Eberhart ve ark.2004).

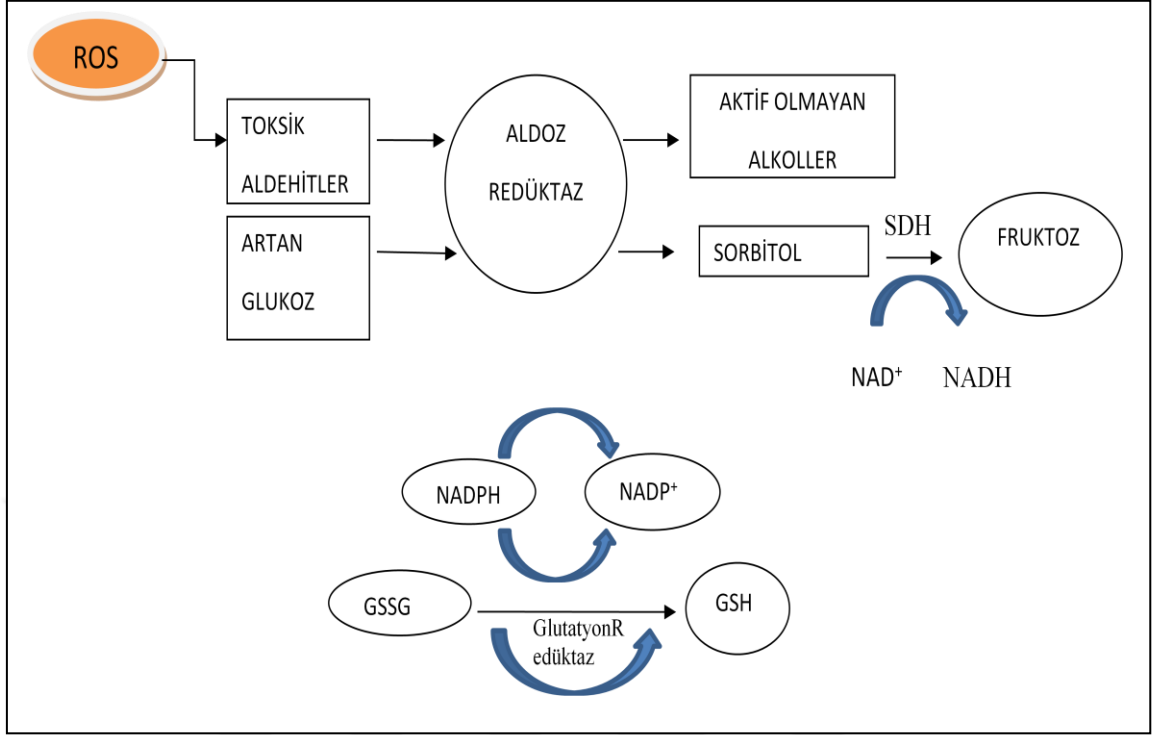
### 2.2.2.Aldoz Redüktaz Enzimi

Aldoz redüktaz enzimi, 1956'da Hers ve arkadaşları tarafından ilk olarak glikoz azaltıcı etkiye sahip bir protein olarak tanımlanmıştır (Hers 1956). Daha sonra, Van Heyningen diyabette yüksek düzeyde sorbitol ve galaktitol biriktiğini bildirmiştir ve galaktosemik sıçan oküler lensinin AR aktivitesinin artmasından kaynaklandığını öngörmüştür (Van Heyningen 1959). Bu gözlemin ardından, Kinoshita ve arkadaşları (1979) bu enzimin flavinoidlerle ve sorbinil ve tolrestat gibi farmakolojik inhibitörlerle inhibe edilmesinin, diyabetik sıçanlarda kataraktogenezi önlediğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, birkaç çalışma serisi, hiperglisemiye atfedilen patofizyolojik koşulların, polioli yolağı hiper aktivitesi yoluyla dokularda sorbitol birikiminden kaynaklandığını belirtmişlerdir (Kinoshita ve ark.1979, Brownlee ve ark. 1981).

Aldoz redüktaz, alifatik ve aromatik aldehydleri, aldozların aldehit grubunu ve daha az oranda da aromatik ve alifatik ketonların keto indirgenmesini NADPH kofaktörüne bağlı olarak katalize edebilen geniş bir substrat özgüllüğüne sahip bir oksidoredüktazdır (Bohren 1989, Petrash 2004). Ayrıca monosakkaritleri, streoidleri, polisiklikaromatik hidrokarbonları ve isoflavonoidler gibi substratları detoksifikasyon reaksiyonları sırasında katalize etmektedir (Kumar 1998, Reddy 2008).

Aldoz redüktaz enzimlerinin üç boyutlu yapılarına bakıldığında hemen hemen hepsinin aynı protein kıvrımlarına sahip olduğu, yapılarında karakteristik olarak  $(\alpha/\beta)_8$  fiçı yapısı ve birkaç  $\alpha$  sarmal yapıyı da birlikte içerdikleri görülmektedir (Hoog ve ark.1994, Wilson ve ark. 1992). Enzimin aktif bölgesi varilin C-terminali üzerinde bulunmakla birlikte, substrat özgüllüğü sağlayan spesifik aminoasitlerle çevrili olduğu gözlemlenmiştir. Enzimin aktif bölgesi kofaktörü olan NADPH için bağlanma bölgesi ve 4 aminoasit tarafından (aspartat, tirozin, lizin ve histidin) korunmuş katalitik alandan oluşmaktadır (Penning 2015).

Aldoz redüktaz süperfamilyasındaki enzimler kofaktör olarak çoğunlukla NADPH tercih ederler. NADPH enzimin aktif bölgesinde kendisi için bulunan bağlanma bölgesindeki aminoasitlerle etkinleşerek enzimin konformasyonel değişikliğine yol açar (Ehrensberger ve ark. 2004, Richter ve ark. 2010). Böylelikle karbonil yapıdaki substratlarının aktif bölgenin katalitik merkezine kolaylıkla bağlanması sağlanmış olur (Schlegel ve ark. 1998).



Şekil 2.2. Aldoz Redüktaz Enzimi ve Polyol Yolağı (Brownlee 2001)

### 2.3.Carvacrol

Carvacrol, 5-izopropil-2-metilfenolün kimyasal adı ile monoterpenik bir fenoldür. Timol ile izomerik olan bu organik bileşik, thymus, kekik, coridothymus, thymbra, satireja ve lippia dahil olmak üzere çok sayıda aromatik esansiyel yağ üreten bitki türlerinde bol miktarda üretilmektedir (Suntress ve ark. 2015). Carvacrol sentetik olarak karvolün fosforik asit ile sıcak muamele edilmesi, iyotun kafur ile 1:5 oranında ısıtılması, carvone'un Pd/C katalizörü ile dehidre edilmesi, kostik potasın cymol sulfonic acid ile kaynaşması ve metil amino propil benzenin nitroz asitle (HNO<sub>2</sub>) reaksiyonu şeklinde üretilmektedir.

Carvacrol sıvı bir maddedir ve timol ile aynı tada sahiptir. Carvacrol yoğunluğu, 20°C'de 0.976 g / cm<sup>3</sup> ila 25 ° C'de 0.975 g / cm<sup>3</sup> arasında değişmektedir. Carvacrol 237 ~ 238°C'de kaynar, erime noktası ise 1°C'dir ve buharla uçucu olabilir. Carvacrol oldukça lipofiliktir; carvacrol'ün çözünürlüğü karbon tetraklorür, etanol, dietil eter, asetonda çok yüksektir; ancak suda neredeyse hiç çözünmez (Ultee ve ark. 2000).



Şekil 2.3. Carvacrol'ün kimyasal yapısı

Carvacrol tüketim için güvenli olarak kabul edilen, Federal İlaç İdaresi (FDA) tarafından gıdalardaki kullanımları için onaylanmış ve alkollü içeceklerde, unlu mamullerde, sakızda, baharat çeşnisinde, dondurulmuş sütte, alkolsüz içeceklerde ve yumuşak şekerde bulunabilecek kimyasal tatlar listesine Avrupa Konseyi tarafından dâhil edilmiş bir bileşiktir (Ultee ve ark. 1999, De Vincenzi ve ark 2004). Carvacrol, tek başına veya diğer doğal olarak oluşan organik bileşiklerle kombinasyon halinde, gıda bozulmalarının ve gıda kaynaklı patojen bakterilerin büyümesini kontrol etmede etkilidir. Elma suyu, yarı yağlı süt, taze kesilmiş kivi ve tatlı karpuz, pirinç, üzüm de dâhil olmak üzere çok çeşitli gıda ürünleri için koruyucu olarak kullanılmaktadır (Roller ve Seedhar 2002, Ultee ve ark.2002, Olasupo ve ark. 2004, Kisko ve Roller, 2005, Guillen ve ark. 2007, Lu ve Wu 2010).

Klinik uygulamalarda potansiyel kullanımı için carvacrol'un biyolojik ve farmakolojik özelliklerini belirleyen önemli araştırmalar yapılmıştır (Suntress ve ark. 2015). Carvacrol'un antioksidan (Guimarães ve ark. 2010, Aristatile ve ark. 2011), antibakteriyel (Du ve ark. 2008), antitümör (Fan ve ark. 2015), anti-enflamatuar (Lima ve ark. 2013), asetil kolin esteraz (AChE) inhibisyonu (Jukic ve ark. 2007), hepatotoksik (Yin ve ark.2012) ve heptoprotektif (Mohseni ve ark. 2019) gibi çeşitli biyoaktiviteleri olduğu belirtilmiştir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hücre Kültürü:

Araştırmada insan orijinli HepG2 karaciğer hücre hattı kullanıldı. Hücreler, polietilenimin (sodyum borat buffer içerisinde 0.2 mg/ml, pH 8.3) ile kaplı 25 cm<sup>2</sup> lik flasklarda ve içeriğinde %10 oranında ısı ile inaktif edilmiş fetal sığır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin ve penisilin/streptomisin/amfoterisin B karışımı bulunduran Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) besi ortamında, 37°C, % 5 CO<sub>2</sub> ve % 95 hava bulunduran steril inkübatörde üretildi. Hücreler flask tabanına % 80-90 oranında yayıldıklarında tripsinize (% 0,025 Tripsin/EDTA) edilerek kaldırıldı ve 1:5 oranında pasajlandı. Tripin mavisi boyası ile hücre sayımı mikroskop altında bir hemositometre yardımıyla belirlendi. Daha sonra deneme grupları için ihtiyaç duyulan hücre sayısı (4x10<sup>5</sup> hücre/kuyucuk) 24'lü pleytlere eklenerek çalışma başlatıldı. Deneme grupları aşağıda tablo halinde verilmiştir (Tablo 1.).

#### Çizelge.3.1. Deneysel çalışma düzeni

Deneysel Çalışma Düzeni	
Deneme Grupları	Tekrar Sayısı
1: Kontrol (Kont.) grubu	5
2: Palmitat (P) uygulanan grup (24 saat)	5
3: Carvacrol (C) uygulanan grup (24 saat)	5
4: P+C uygulanan grup (24 saat)	5

#### 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar:

Karaciğer hücrelerinde apoptozu uyarmak için Palmitat (Acros Organics, USA) ve carvacrol (Sigma, EU) etken madde olarak kullanıldı.

### 3.3. Viyabilite testi

Çalışma Papachristou ve ark., (2013) uyguladığı metod takip edilerek gerçekleştirildi. Bu metotta kısaca farklı konsantrasyonlarda carvacrol (1, 5, 10 ve 50  $\mu$ M) ve palmitat (150, 300 ve 450  $\mu$ M) hücrelere uygulanmasından 24 saat sonra hücre kuyucuklarındaki medium alınarak üzerlerine içerisinde 20  $\mu$ L MTT ayırıcı (5 mg/ml PBS'te çözdürülerek elde edildi) bulunan 200  $\mu$ L taze komple besiyeri eklendi. Hücreler bu solüsyonla 90 dakika 37°C'de inkübe edildi ve MTT kristalleri 100  $\mu$ L 0.04 M HCL/isopropanol ile 15 d süreyle 37°C'de çözdürüldü. Süre sonunda ependorflara alınan örnekler 12000 rpm ve +4 C'de santrifüj edildi ve 570 nm ışık dalga boyunda mikropleyt ( $\mu$ Quant ELISA reader) okuyucuda okutuldu ve kaydedildi.

### 3.4. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

İnkübasyon süreleri sonrasında hücrelerin kültür kap tabanından ayrılmaları için 300  $\mu$ l tripsin/EDTA (% 0,025) eklenerek 1-2 dk beklendi. Toplanan HepG2'ler resüspanse edilerek oda ısısında 400 g devir 5 dk süreyle santrifüj edildi. Homojenatlar hazırlanırken hücre peletleri, PBS ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH:7) ile 2 kez yıkanarak resantrifüj edildi. Sonrasında 250  $\mu$ l protein ekstraksiyon kiti (Thermo) çalışma solüsyonu ve % 8 oranında proteaz inhibitör kokteyli (aprotinin, PMSF, leupeptin, sodyum florür) eklendi ve 5 dk nazıkçe çalkalandı. Sonrasında örnek lizatları toplanarak 14000g'de 8 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar analiz süresine kadar -80°C'de tutuldu. Deterjanla çözünmeyen selüler protein fraksiyonları 12000g, 4°C'de 10 dk süreyle santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Elde edilen lizat örnekleri glutatyon ve nitrit düzeylerinin tespiti için kullanıldı. Yine hücre içi aldoz redüktaz (AR) protein düzeyleri için bu lizat örnekleri kullanıldı.

### 3.5. Protein Düzeyleri Analizleri

Çalışmada AR protein düzeyi hazır ticari kit (Finetest, PRC) protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. Bu metoda göre; çalışmaya başlamadan önce, oda sıcaklığında (37°C) SABC çalışma çözeltisi ve TMB substratı en az 30 dakika bekletildi. Örnekler ve reaktifler uygun konsantrasyonda seyreltilirken, tamamen ve eşit şekilde karıştırıldı. Kullanım öncesi test pleyti iki kez yıkandı. Sonrasında herbir kuyucuğa 100  $\mu$ l standart çözelti ve örnekler eklenerek 37°C'de 90 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 100  $\mu$ l

biyotin deteksiyon antikor solüsyonu herbir kuyucuğa eklenerek ve 37°C’de 60 dk inkübe edildi. Devamında su banyosundan alınan pleyt yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkanarak herbir kuyucuğa 100 µl HRP-streptavidin konjuge solüsyonu eklenerek 37°C’de 30 dk inkübe edildi. Pleyt aynı yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkanarak kuyucuklara 90µl TMB substratı eklendi ve 37°C’de 15 dk bekletildi. Daha sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulması sağlandı ve bir ELISA okuyucuda (Biotech, µ-quant, SK) 450 nm ışık dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Standartların absorbans değerlerinden grafik çizilerek elde edilen formülasyonla nünunelerin AR düzeyleri hesaplandı. Değerler ng/ml cinsinden verildi.

### **3.6. Glutatyon (GSH) Analizi**

Glutatyon (GSH) düzeylerinin ölçümü, Sedlak ve Lindsay (1968) metodunun takibiyle gerçekleştirildi. Metodun prensibi, reaksiyona eklenen 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)’nin sülfidril grupları vasıtasıyla indirgenmesi ile 1 mol’lük sülfidrili, 1 mol 2-nitro-5-merkaptobenzoik asite karşılık gelmesine dayanmaktadır. Kısaca bu yöntemde, önceden hazırlanan hücre lizatlarından 250 µl alınarak aynı miktarda % 10’luk triklor asetik asit (TCAA) ile karıştırılarak 8600 rpm’de 15 dk süre ile santrifüjlendi. Protein fraksiyonu atılan örneklerden 250 µl alınıp yeni ependorflara aktarılarak üzerlerine 2 ml 0.3 M’lık Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ilave edildi. Sonrasında üzerlerine 250 µl DTNB ilave edilerek resuspanse edildi. Daha sonra karışım 5 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Tüm işlemlerin sonunda örnekler distile suya karşı 410 nm ışık dalga boyunda okundu. Elde edilen değerler µmol olarak kaydedildi.

### **3.7. Nitrik oksit (NO) Düzeylerinin Belirlenmesi**

Çalışmada nitrit düzeyleri, Cortas ve Wakid (1990)’in uyguladığı ‘‘Griess metodu’’ ile spektrofotometrik olarak ortaya konuldu. Kısaca; granüler kadminyum partikülleri, 3 kez deiyonize su yıkanarak bir filtre kağıdı ile süzdürüldü. Sonrasında granüller, glisin-NaOH tampon II (15 gr/L, pH=9,7) ve 5 mmol/L CuSO<sub>4</sub> içeren solüsyonda 5 dk süre ile aktifleştirildi. Tüm deneme gruplarında 300 µl örneklere 250 µl 75 mmol/L ZnSO<sub>4</sub> ve 350 µl 55mmol/L NaOH ilave edildi. Sonrasında 10000 g rotor hızında 4°C’de 3 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan 750 µl alınarak farklı temiz tüplere aktarıldı. Üzerlerine 250 µl glisin tampon I (45 gr/L pH: 9,7) eklendi. Bu tüplere aktif olan kadminyum granüllerinden bir pens yardımıyla her tüpe bir granül olacak şekilde eklendi.

Bu şekilde 10 dk karıştırıldıktan sonra hazır hale getirilen örneklerden 300 µl alınıp üzerlerine 1125 µl ayraç 1 (N-naftil etilen diamin) ve 1200 µl ayraç 2 (sülfanilik asit, 3 mmol/L HCL) eklenerek; örnek yerine su ilave edilerek hazırlanan köre karşı 546 nm ışık dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı. Elde edilen veriler µmol cinsinden hesaplanıp kaydedildi.

### **3.8. Hücre Görüntüleri**

Karaciğer hücrelerine C ve P 24 saat süreyle uygulamaları sonucu hücre görüntüleri bir invert mikroskop (Olympus CK40, JP) ile 10x objektifiyle görüntülendi.

### **3.9. İstatistiksel Metot**

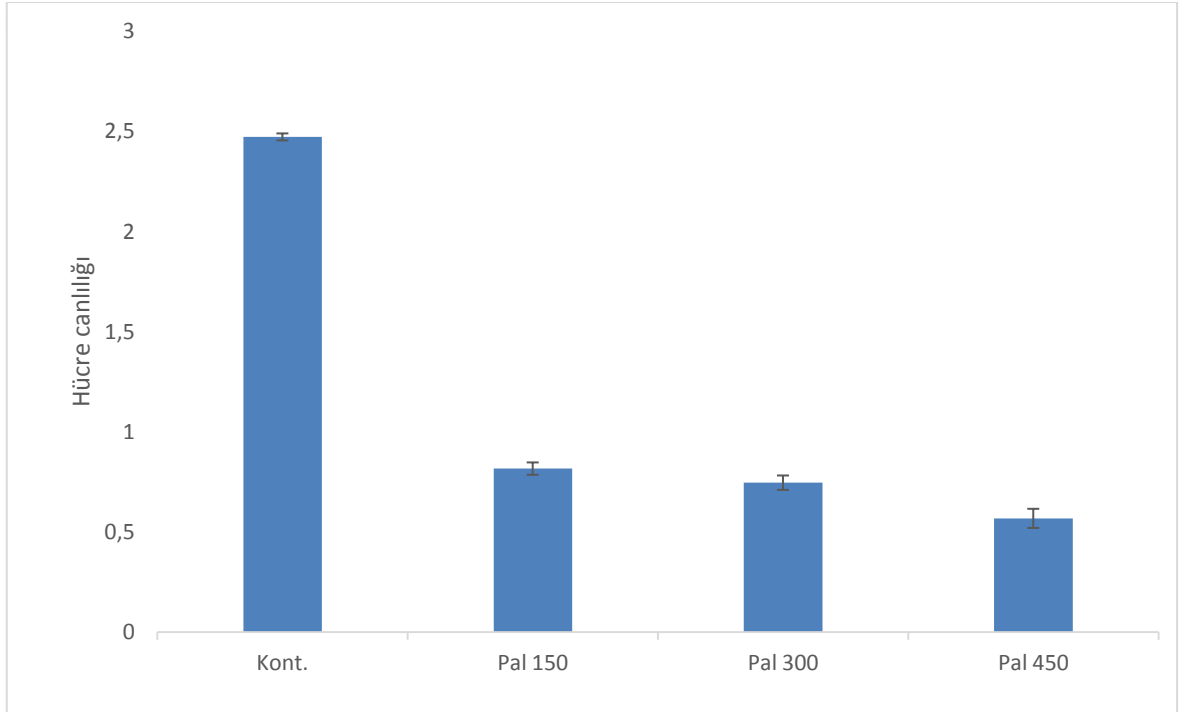
Araştırmada elde edilen veriler, SPSS 20.0 (Statistical Package for Social Sciences) programında, One-way ANOVA varyans analizi yöntemi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Duncan testi ile belirlendi.  $p < 0.05$  ve altı istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata (S.E) şeklinde verildi.

## 4.BULGULAR

### 4.1.Viyabilite bulguları

Karaciğer hücrelerine farklı konsantrasyonda carvacrol (1, 5 10 ve 50  $\mu$ M) ve palmitat (150, 300 ve 450  $\mu$ M) uygulanarak 24 saat süreyle maruziyetleri sağlandı. Süre sonunda deneme kuyucuklarındaki hücrelerin canlılık seviyeleri MTT yöntemiyle analiz edildi.

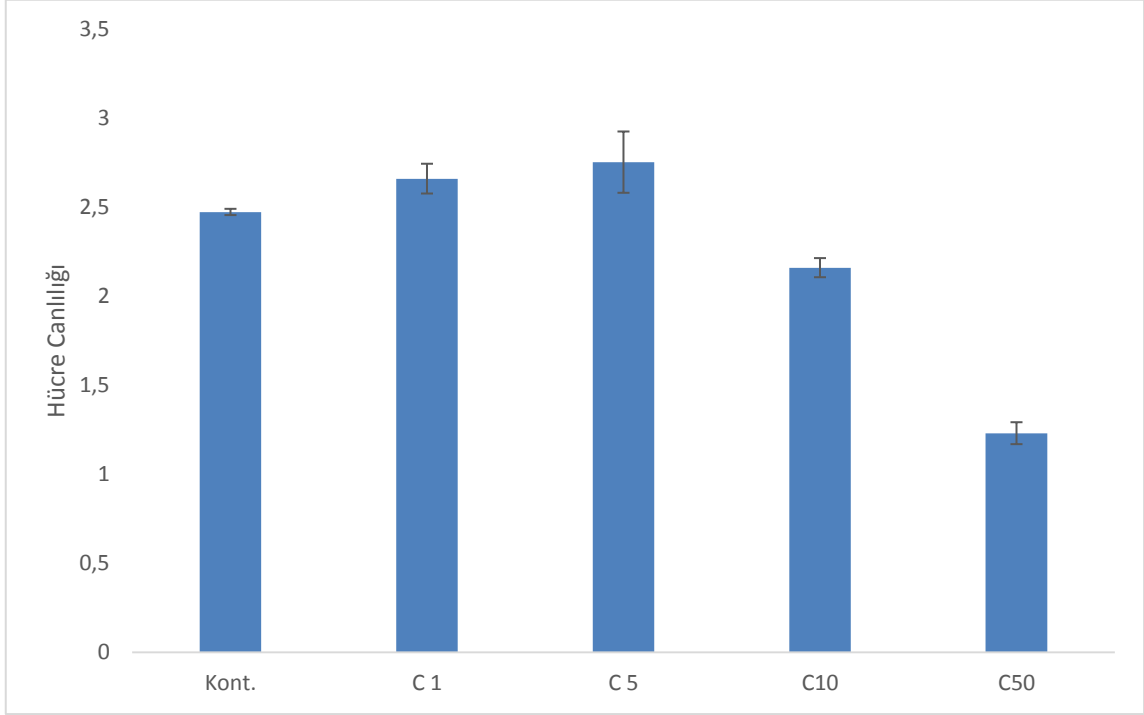
#### 4.1.1.Farklı konsantrasyonlarda palmitatın viyabilite üzerine etkileri



Şekil 4.1.Farklı konsantrasyonlardaki palmitatın hücre canlılığı üzerine etkileri (24 saat).

Elde edilen verilere göre hücre canlılığında, kontrol grubuna ( $2,473 \pm 0,01748$ ) göre palmitatın 150 ( $0,8164 \pm 0,03088$ ), 300 ( $0,746 \pm 0,03596$ ) ve 450  $\mu$ M ( $0,5678 \pm 0,04778$ ) dozlarının eklendiği gruplarda, sırasıyla %67, %69 ve %77 düzeylerinde hücre kayıplarına neden olduğu tespit edilmiştir. Viyabilite sonuçlarına göre palmitatın 300  $\mu$ M konsantrasyonu etkin konsantrasyon olarak kabul edilmiş, sonraki çalışmalar için bu konsantrasyon kullanılmıştır.

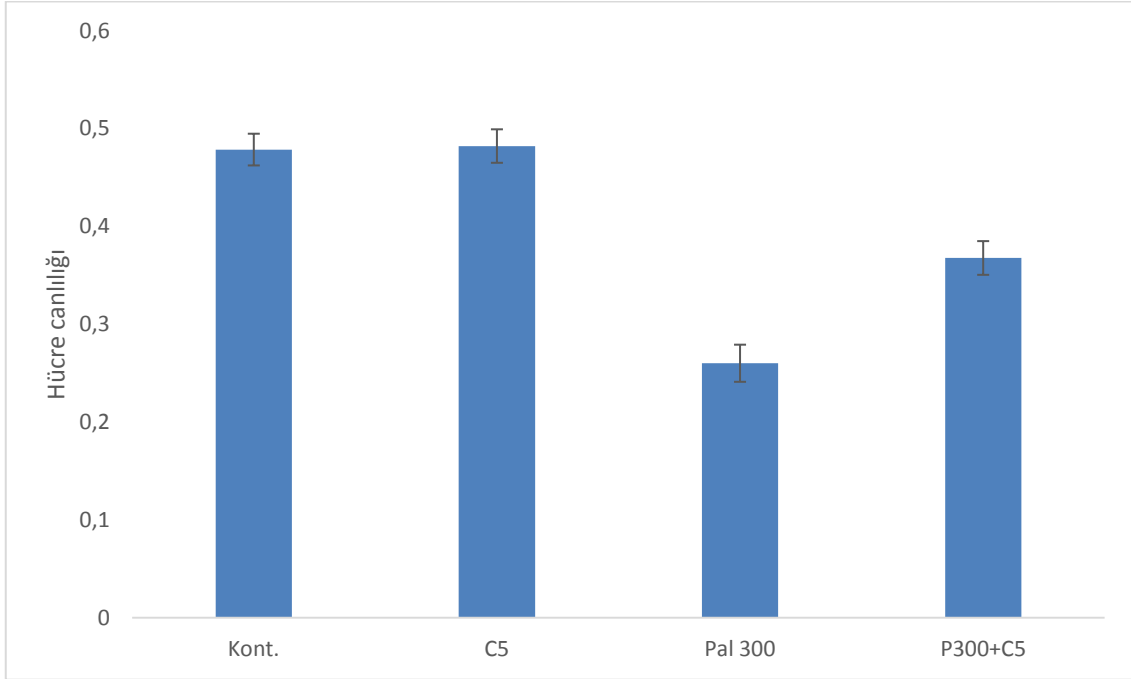
#### 4.1.2. Farklı konsantrasyonlarda Carvacrol'ün hücre canlılığı üzerine etkileri



Şekil. 4.2. Farklı dozlardaki carvacrol'ün hücre canlılığına etkileri (24 saat).

Analiz sonuçlarına göre hücre canlılık oranı, kontrol grubuna ( $2,473 \pm 0,01748$ ) göre carvacrol'ün 1 ( $2,6602 \pm 0,08362$ ) ve 5 ( $2,7528 \pm 0,17215$ ) konsantrasyonları sırasıyla % 7.8 ve %11 artış gösterirken, 10 ( $2,16 \pm 0,05376$ ) ve 50 ( $1,2302 \pm 0,06165$ ) konsantrasyonlarında sırasıyla % 12 ve % 50 azalma göstermiştir. Viyabilite sonuçlarına göre carvacrol'ün 5  $\mu\text{M}$  konsantrasyonu proliferatif etki gösterdiğinden etkin konsantrasyon olarak kabul edilmiş, sonraki çalışmalar için bu konsantrasyon kullanılmıştır.

#### 4.1.3. Carvacrol ve palmitatın birlikte kullanımının hücre canlılığı üzerine etkileri



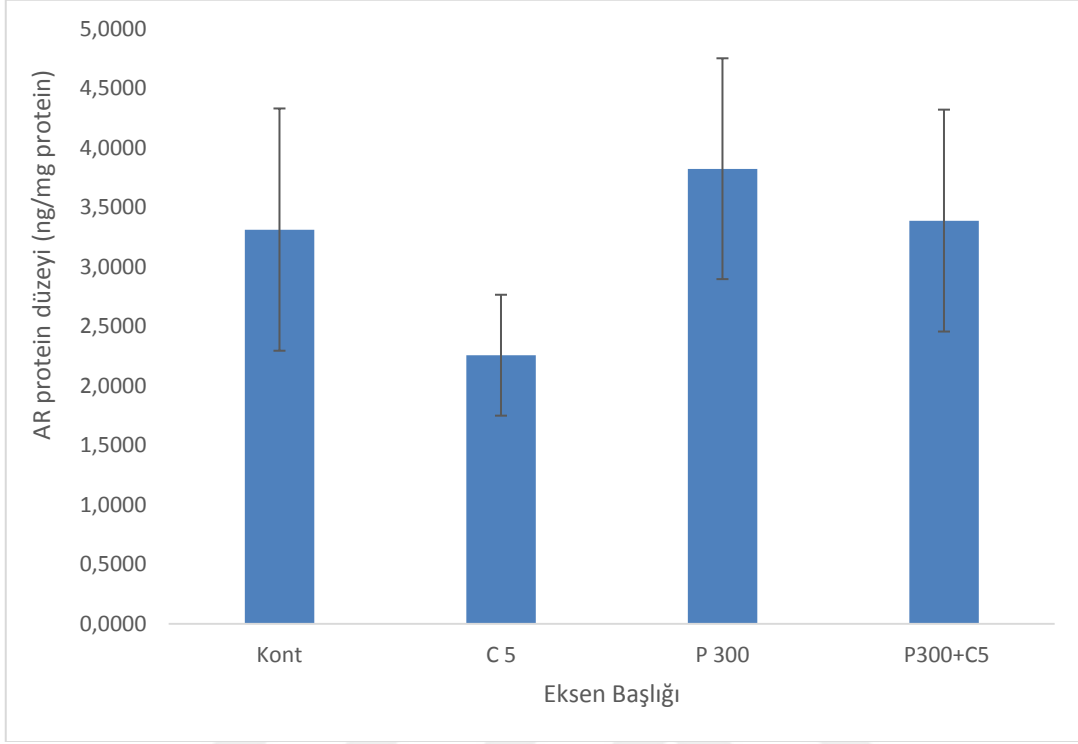
Şekil. 4.3. Palmitat uygulaması sonrası carvacrol uygulanan gruptaki hücre canlılığı (24 saat).

Analiz sonuçlarına göre viyabilite, kontrol grubuna ( $0,4786 \pm 0,01621$ ) göre palmitat ( $0,2602 \pm 0,01897$ ) hücre canlılığını % 45 azalmıştır. Ancak hücre ortamına palmitat uygulaması sonrası carvacrol ilavesi yapılan grupta ( $0,3678 \pm 0,01724$ ) % 41 oranında hücre kayıplarının önlendiği tespit edilmiştir.

#### 4.2. AR Protein Düzeyi Bulguları

HepG2 hücrelerine carvacrolün  $5 \mu\text{M}$  ve palmitat  $300 \mu\text{M}$  konsantrasyonda ayrı ayrı veya birlikte 24 saat uygulamasının sonrasında deneme gruplarından lizat eldeleri gerçekleştirildi. Sonrasında bu örneklerdeki hücre içi aldoz redüktaz protein düzeyleri ELISA yöntemiyle araştırıldı.

### 4.2.1. Aldoz Redüktaz Protein Düzeyi



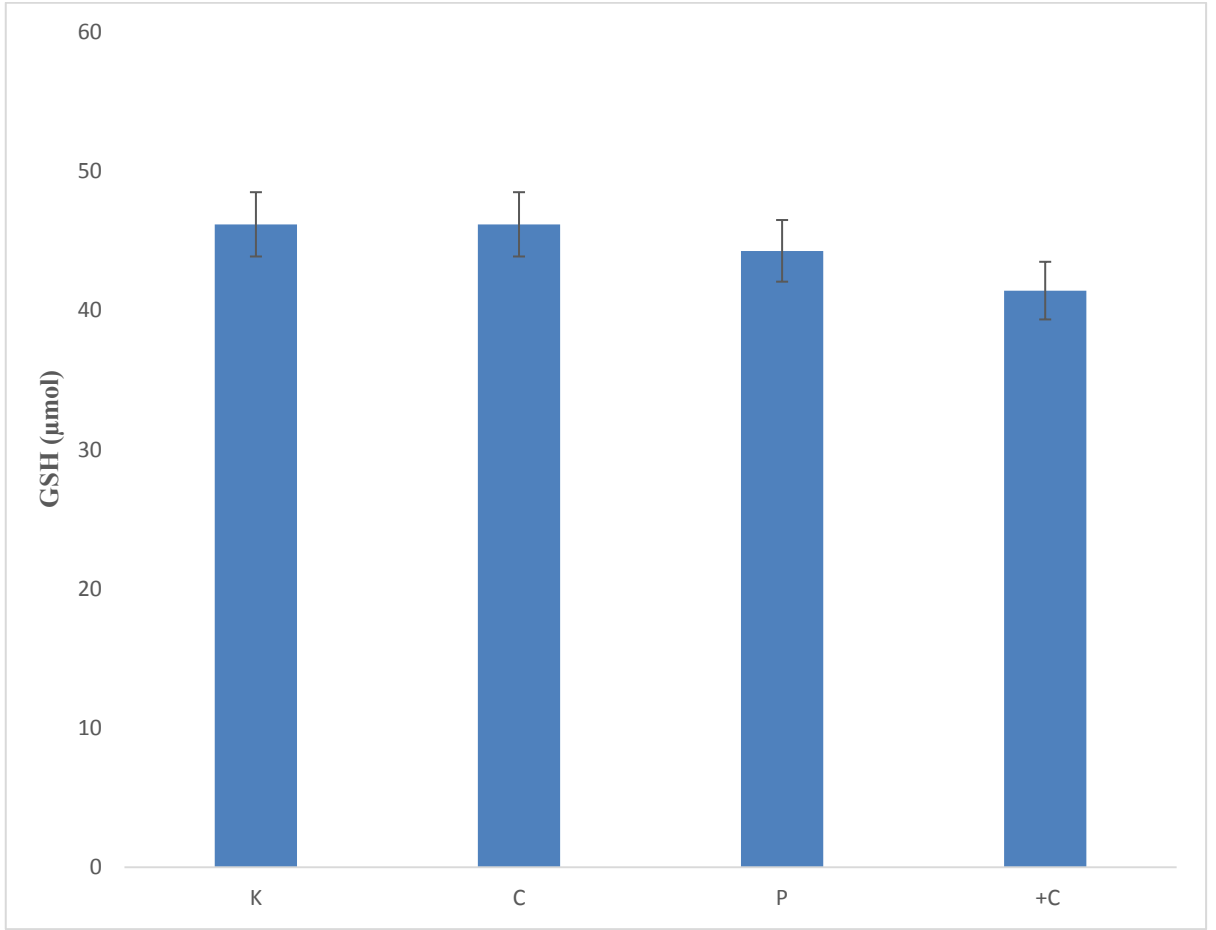
Şekil. 4.4. Deney gruplarında hücre içi AR protein düzeyleri (24 saat).

Hücre içi aldoz redüktaz protein düzeyleri, kontrol grubuna (3,3140±1,01878) göre carvacrol'ün tek başına eklendiği grupta (2,2575 ± 0,50843) % 1.5 oranında azalırken, tek başına palmitat eklenen grupta (3,8261 ± 0,92858) ise %1.3 artış tespit edilmiştir. Ancak palmitat uygulanımı sonrası carvacrol uygulanan grupta (3,3897 ± 0,93311) ise carvacrol'ün aldoz redüktaz protein düzeyini palmitat grubuna göre % 1.7 oranında azalttığı bulunmuştur(P<0.05).

### 4.3. Spektrofotometrik Analiz Bulguları

Deneme grupları 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücrelerden lizat örnekleri gerçekleştirildi. Sonrasında bu lizatlardan spektrofotometrik olarak GSH ve nitrit düzeyleri araştırıldı.

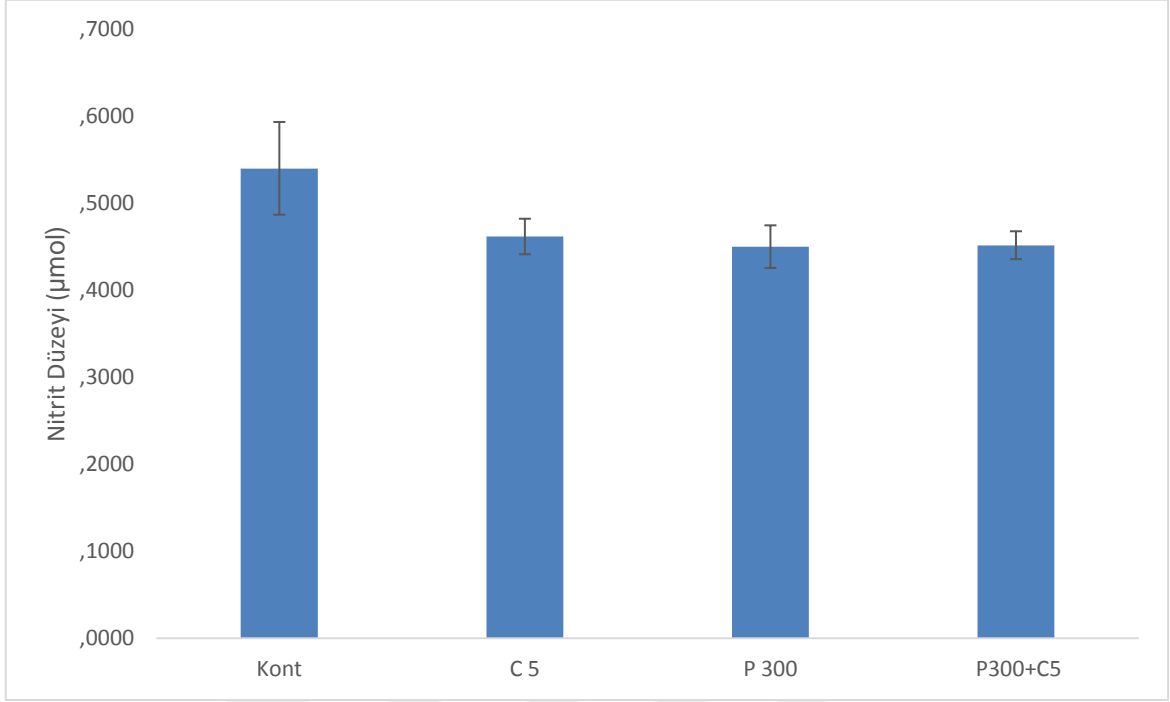
### 4.3.1.GSH düzeyi bulguları



Şekil. 4.5. Deney gruplarında hücre içi GSH düzeyleri (24 saat)

Elde edilen verilere göre GSH düzeyinin sadece carvacrol eklenen grupta kontrole göre değişmediği tespit edildi. Tek başına palmitat eklenen grupta ise kontrole göre GSH düzeyinin % 4 oranında azaldığı bulundu. Yine GSH seviyesinin palmitatla birlikte carvacrol eklenen grupta sadece palmitat eklenen gruba göre % 6.5 oranında azaldığı tespit edildi.

#### 4.4.Nitrit miktarı bulguları



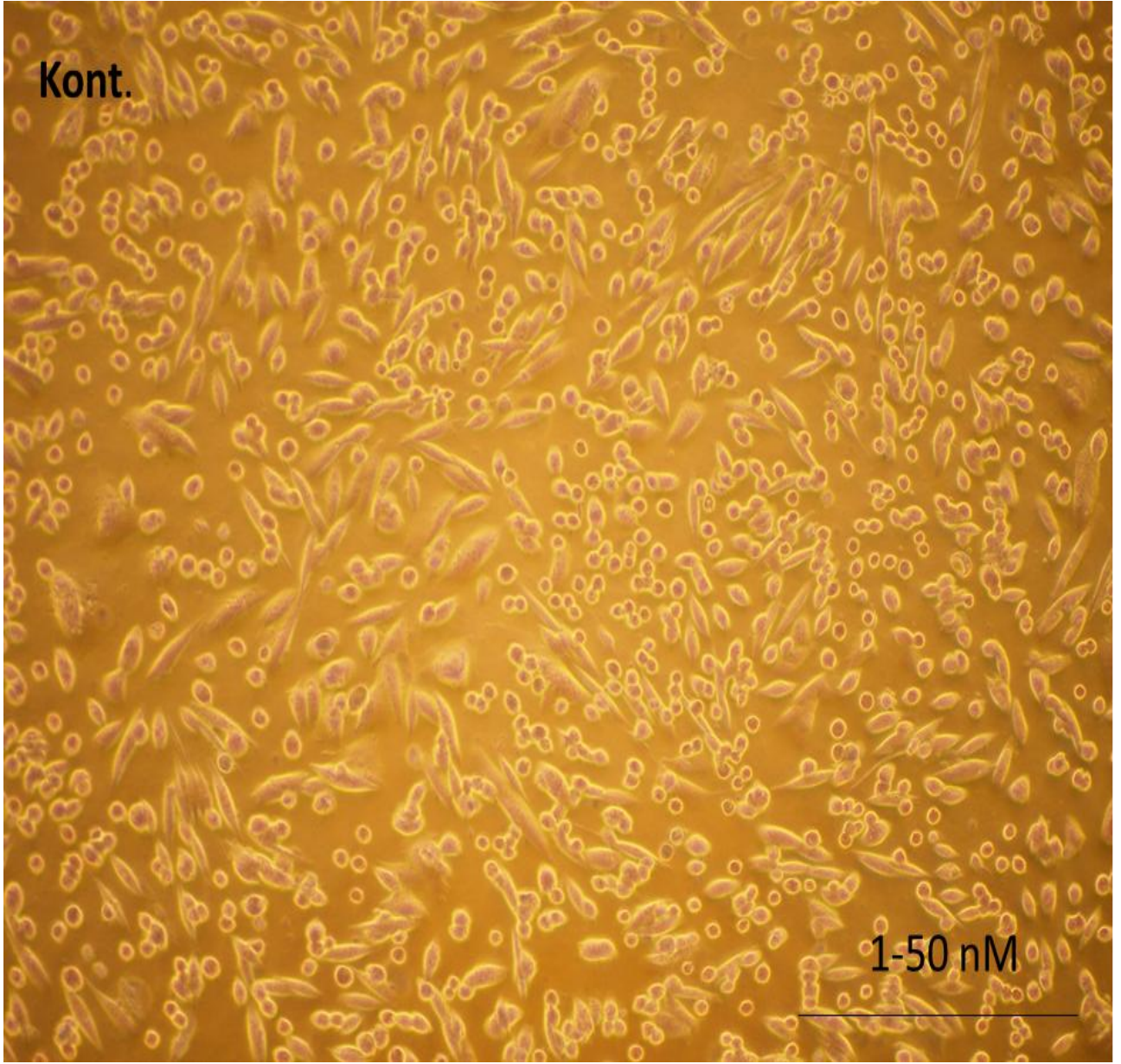
Şekil.4.6.Hücrelere carvacrol ve palmitat uygulananın nitrit düzeyleri üzerine etkileri (24 saat)

Analizlerinden elde edilen bulgulara göre nitrit düzeyinin tek başına carvacrol eklenen grupta ( $0,4617 \pm 0,02041$ ) kontrole göre ( $0,5400 \pm 0,05329$ ) % 14 oranında azaldığı tespit edildi. Yalnızca palmitat eklenen grupta ( $0,4500 \pm 0,02449$ ) ise kontrole göre nitrit düzeyinin % 16 oranında azaldığı bulundu. Bununla birlikte nitrit seviyesinin palmitatla birlikte carvacrol eklenen grupta ( $0,4517 \pm 0,01602$ ), tek başına palmitat eklenen gruba göre önemsiz düzeyde arttığı tespit edildi ( $p < 0.05$ ).

#### 4.5 Hücre görüntü bulguları

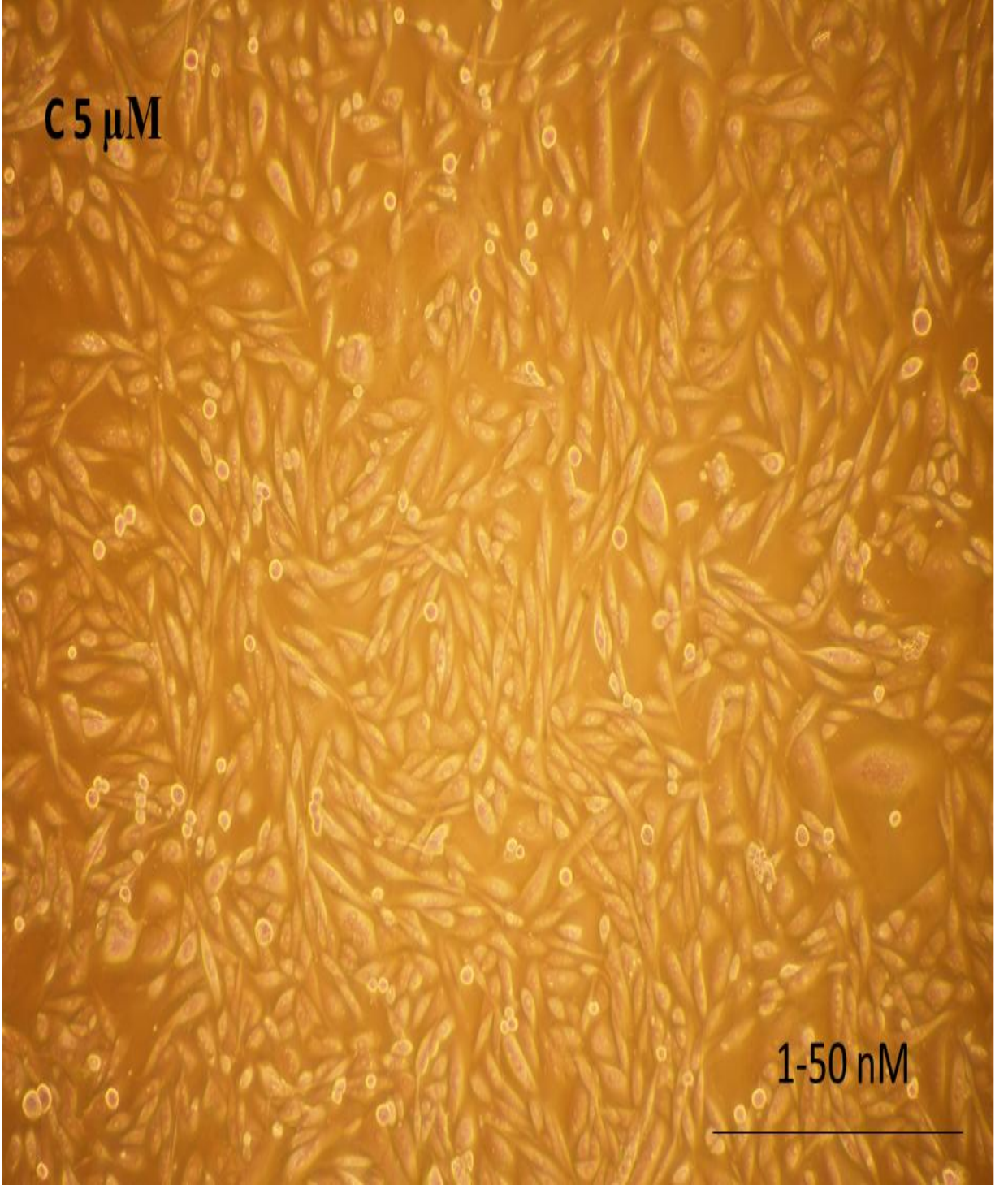
Çalışmadan alınan fotoğraf görüntülerinde, palmitatın 300 µM konsantrasyonda hücrelere uygulanımı sonrası hücre sayılarının dramatik derecede azaldığı görüldü. Yine carvacrol'ün hücrelere 5µM uygulanımı sonrası hücre yoğunluğunun kontrol hücre görüntülerine kıyasla anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Bununla birlikte palmitatla birlikte carvacrol'ün uygulanımının olduğu gruptaki hücre görüntüleriyle tek başına palmitat kullanılan gruptaki hücre görüntüleri karşılaştırıldığında, carvacrol'ün anlamlı düzeyde hücre kayıplarını önlediği görüldü.

#### 4.5.1. Kontrol grubu hücre görüntüsü



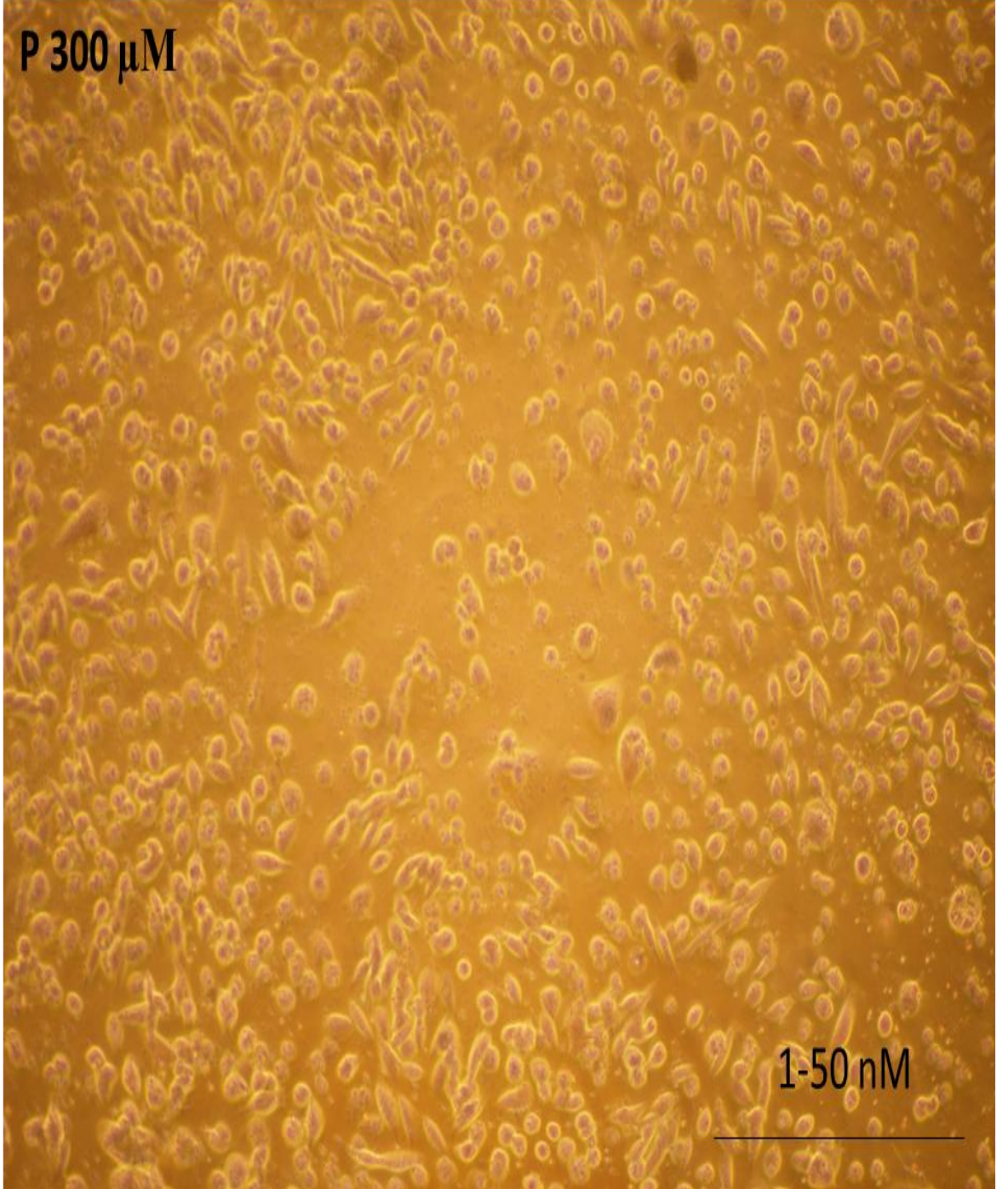
Şekil.4.7.Kontrol grubu hücre fotoğrafı (10x, skala bar 1-50 nm).

**4.5.2. Carvacrol'ün 5 µM konsantrasyonda uygulandığı grup hücre görüntüsü**



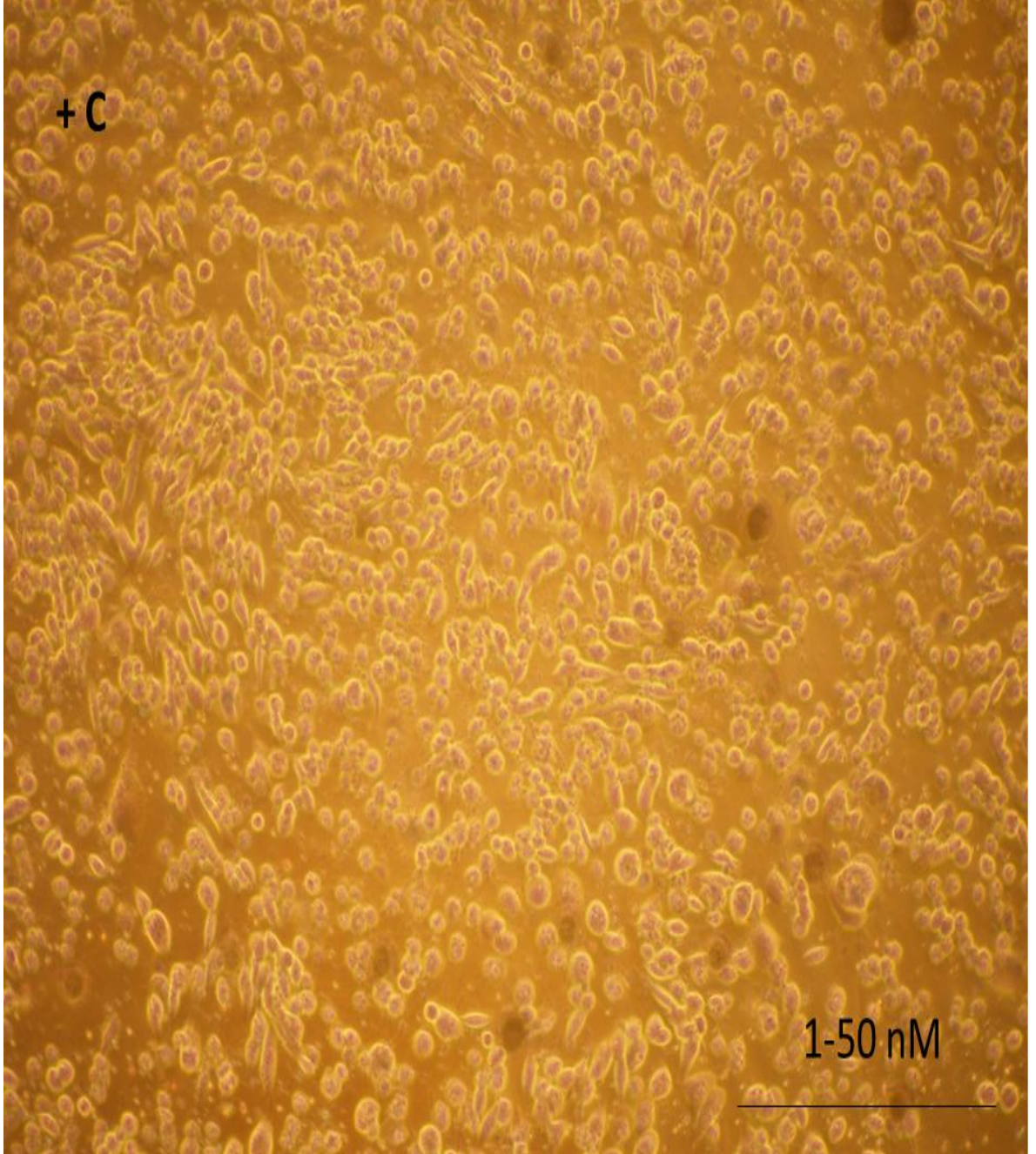
**Şekil. 4.8.** Carvacrol'ün 5 µM konsantrasyonda eklendiği gruptaki hücre fotoğrafı (10x, skala bar 1-50 nm).

#### 4.5.3. Palmitatın 300 $\mu\text{M}$ konsantrasyonda uygulandığı grup hücre görüntüsü



Şekil. 4.9. Palmitatın 300  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda eklendiği gruptaki hücre fotoğrafı (10x, skala bar 1-50 nm).

**4.5.4. Palmitat (300  $\mu$ M) ve carvacrolün (5  $\mu$ M) birlikte uygulandığı gruptaki hücre görüntüsü**



**Şekil. 4.10.**Palmitat (300  $\mu$ M) ve carvacrolün (5  $\mu$ M) birlikte uygulandığı gruptaki hücre fotoğrafı (10x, skala bar 1-50 nm).

## 5. TARTIŞMA

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

Carvacrol (CAR, 2-metil-5-izopropilfenol), Lamiaceae familyasının Thymus gibi uçucu yağlarında bulunan çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip doğal bir fenolik monoterpindir. Bakır ve ark. (2016) hepatik hasara yol açan birçok bozukluğun iyileştirilmesi için carvacrol'ü güvenli ve güçlü bir yeni ilaç olarak ortaya koymuştur. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, sıçanlarda nano kapsüllenmiş ve nano emülsiyon formlarında carvacrol kullanımının zayıflatılmış tiyoasetamid (TAA) kaynaklı karaciğer hasarında etkili sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Hussein ve ark 2017). Araştırmamızda elde edilen verilere göre hücre canlılığında, kontrol grubuna göre palmitatın doz bağımlı olarak artış gösteren hücre kayıplarına neden olduğu tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre hücre canlılık oranı, kontrol grubuna göre carvacrolün 1 ve 5 µM konsantrasyonları artış gösterirken, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarında ise azalma göstermiştir. Bununla birlikte hücre ortamına palmitat uygulanımı sonrası carvacrol ilavesi yapılan grupta hücre kayıplarının anlamlı düzeyde önlendiği tespit edilmiştir. Toppo ve ark. (2017) hem *in vitro* HepG2 hücrelerinde hem de yüksek yağlı diyetle beslediği ratlarda non-alkolik yağlı karaciğer sendromu oluşturdukları *in vivo* modelde palmitik asitin anlamlı derecede hücre kayıplarına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Fu ve ark.2016 osteoartrojenik hastaların kıkırdak dokularından izole ettikleri kondrositlerde palmitik/oleik asit karışımının reaktif oksijen türleri ve kaspaz 3 uyarımlı apoptozu anlamlı derecede arttırarak hücre kayıplarına neden olduğunu belirtmişlerdir. Park ve ark. (2015) yaptıkları *in vitro* çalışmada palmitatın

kardiyomiyositlerde endoplazmik reticulum stresi uyararak hücre kayıplarına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Zhou ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada palmitatın miRNA21 inhibisyonu ile kardiyomiyositlerde apoptozu uyardığını rapor etmişlerdir. Sohrabi ve ark. (2018) gerçekleştirdikleri *in vitro* çalışmada askorbil palmitatın, insan umbilikal ven endotel hücrelerinde kaspaz 3, kaspaz 9 oranını arttırarak ve hücre içi Bcl-2 düzeyini azaltarak apoptozu uyardığını ortaya koymuşlardır. Dong ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada palmitik asitin INS-1 hücrelerinde endoplazmik reticulum stres uyarımına bağlı olarak apoptozu tetiklediğini rapor etmişlerdir.

Nitrik oksit; nitrik oksit sentazların aktivasyonu ile L- arjininden nitratın indirgenmesiyle üretilir. Nitrik oksitin endotel hücreleri, düz kas hücreleri, karaciğer hücreleri ve bağ doku hücreleri dahil olmak üzere birçok değişik hücre tiplerinde sitotoksik etki gösterdiği bilinmektedir. Birçok araştırmada, nitrik oksitin özellikle poliaminlerin biyosentezinden sorumlu ornitin dekarboksilaz aktivitesini baskılayarak hücre proliferasyonunu baskıladığı rapor edilmiştir (Santarelli ve ark. 2006).

İnsülin aktivitesine bağlı nitrik oksit (NO) üretiminin vazodilatatör, anti-enflamatuar, antitrombotik ve antifibrojenik etkileri vardır. Farklı karaciğer hastalığı modellerinde artan insulin direnci endotel disfonksiyonunu ilerletir (Pasarin ve ark. 2012). NO, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) tarafından yapısal olarak sentezlenir. Hücre dışı sıvının düzenlenmesi ve böbrek kan basıncının ayarlanmasında görev alır (Yoon ve ark. 2000). İnsülin direncinin artışı, NO üretimini attırır veya substrat tüketimine bağlı olarak NAFLD'nin başlangıç safhasındaki süperoksit ve hidroksil radikallerinin oluşumuna bağlı olarak inflammatuar sitokinlerin salımına neden olabilir. Artan yangı sitokinleri hepatositlerde apoptozu tetikleyerek karaciğer hasarının ilerlemesine neden olur (Iwakiri ve ark. 2008). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada NAFLD'nin erken aşamalarında, 6 hafta yüksek yağlı diyet verilen farelerde eNOS aktivitesinin azalması, oksidatif stress artışıyla ve NO biyoayarlanımının azaltılmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte aynı araştırmada siklooksijenaz aktivitesi artışına bağlı olarak yangısal olmayan hepatik vasküler direnç veya fibröz gelişimi şekillenmiştir (Gonzalez-Paredes ve ark. 2016).

Araştırmada elde edilen diğer bir bulgu ise nitrit düzeyinin tek başına carvacrol eklenen grupta, kontrole göre % 14 oranında azaldığı tespit edildi. Yalnızca palmitat

eklenen grupta ise kontrole göre nitrit düzeyinin % 16 oranında azaldığı bulundu. Bununla birlikte nitrit seviyesinin palmitatla birlikte carvacrol eklenen grupta, tek başına palmitat eklenen gruba göre önemsiz düzeyde arttığı tespit edildi.

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

Gelişmiş canlılarda hücreler, reaktif oksijen türlerinin bertaraf edilmesi için, enzimatik (CAT- katalaz GSH-Px-glutatyon peroksidaz ve SOD-süperoksit dismutaz vb.) ve nonenzimatik (GSH, vitamin E ve C, karotenoid bileşikler, lipoik asit ve naturel flavonoidler vb.) antioksidanlara sahiptirler (Mates ve ark. 1999). Çalışmada GSH düzeyinin sadece carvacrol eklenen grupta kontrole göre değişmediği tespit edildi. Tek başına palmitat eklenen grupta ise kontrole göre GSH düzeyinin % 4 oranında azaldığı bulundu. Yine GSH seviyesinin palmitatla birlikte carvacrol eklenen grupta sadece palmitat eklenen gruba göre % 6.5 oranında azaldığı tespit edildi. Mohebbati ve ark. (2018) yaptıkları adriyaminin uyarımlı karaciğer toksikasyonu modelinde carvacrol'ün özellikle katalaz aktivitesini arttırarak ve malondialdehit seviyesini azaltarak hepatosit kayıplarını önlediğini ortaya koymuşlardır. Chenet ve ark. (2019) hidrojen peroksit uyarımlı beyin hücre oksidatif stresi modelinde, carvacrol'ün heme oksijenaz inhibisyonunun yanında, NFκB'nin downregülasyonu ve antioksidan belirteçlerin uyarımı ile nöroprotektör etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. De Santana ve ark. (2017) gerçekleştirdikleri asetik asit uyarımlı kolit modelinde, carvacrol'ün SOD ve GSH gibi antioksidan parametreleri önemli düzeyde arttırarak koruyucu etkinlik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Fizyolojik koşullar altında, karaciğerde nispeten az oranda AR ifadesi tespit edilmiştir (Clements ve ark.1969, Markus ve ark. 1983). Ancak, AR ifadesinin hastalık durumlarında değiştiği gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar karaciğer dokusunda AR ekspresyon seviyelerinde hepatik steatozlu tip II diyabetik farelerden (Qiu ve ark. 2012) ve metiyonin kolin eksik diyet kaynaklı alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı olan farelerden (Qiu ve ark. 2013) karaciğer dokusunda AR ekspresyon seviyelerinde önemli artışlar olduğunu ve AR'nin alkolsüz yağlı karaciğer hastalığının gelişiminde önemli rol oynayabileceği ve inhibisyonunun hepatik steatozu iyileştirebileceği belirtilmiştir (Chen ve ark. 2015). Ayrıca, AR inhibisyonunun HepG2 hücrelerinde lipid damlacık birikimini belirgin şekilde azalttığı ve etanolün neden olduğu hepatik steatozu önleyici etki gösterebileceği öne sürülmüştür (Qiu ve ark. 2017).

Hepatik aldoz redüktaz ekspresyonu alkolik ve non-alkolik steatozis, hepatitis ve karaciğer kanserlerinde artar. Ancak hastalıkların gelişiminde AR'nin temel rolü hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Hücre içi aldoz redüktaz protein düzeyleri, kontrol grubuna göre carvacrol'ün tek başına eklenen grupta % 1.5 oranında azalma, tek başına palmitat eklenen grupta ise %1.3 artma tespit edilmiştir. Ancak palmitat uygulanımı sonrası carvacrol uygulanan grupta ise carvacrolün aldoz redüktaz protein düzeyini palmitat grubuna göre % 1.7 oranında azalttığı bulunmuştur. Qui ve ark. (2013) yaptıkları non-alkolik yağlı karaciğer sendrom modelinde AR'nin lentivirüs uyarımlı gen sessizleştirilmesinde serum alanine aminotransferaz ve hepatik lipoperoksitlerin azaldığını rapor etmişlerdir. Yine aynı araştırmada AR noksanlığının hepatik sitokrom p 450'nin hem mRNA ekspresyonunu hem de protein düzeylerini azaltarak oksidatif stres uyarımlı IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  stimülasyonunu baskıladığını ortaya koymuşlardır. Khan ve ark. (2019) alkolik karaciğer toksite modelinde carvacrol'ün antioksidan belirteçleri uyararak ve sitokrom p450 ekspresyonunu inhibe ederek hücre kayıplarını önlediğini rapor etmişlerdir.

## 6. SONUÇ

Araştırmada non-alkolik steatozda karvakrolün hepatoprotektif etkinliği araştırıldı. Bu amaçla çalışmada model oluşturmak için insan orijinli Hep-G2 hücrelerine palmitat uygulandı. Palmitat önemli derecede hücre kayıplarına neden oldu. Palmitatın hücre kayıplarına neden olmasındaki temel sebebler araştırmadan elde edilen verilerle polyol yolağının önemli enzimlerinden olan aldoz redüktazın hücreiçi protein sentezindeki artışa bağlı olarak şekillendiği ortaya konulmuştur. Literatüre benzer şekilde karvakrolün ise bu hücre kayıplarını önlemede aldoz redüktazı anlamlı düzeyde inhibe etmesiyle ilişkilendirilebileceği ortaya konulmuştur. Tüm literatür biligileri ve bu araştırmann sonuçlarına göre, karvakrolün non alkolik karaciğer yağlanması tedavisinde özellikle polyol yolağı üzerine etkileri ile potansiyel bir alternatif olabileceği kanısına varılmıştır. Bu tez çalışmasında alınan sonuçlar, karvakrolün non-alkolik steatozisin patogenezinde ne gibi değişikler olabileceği konusunda gelecekte yapılacak kapsamlı çalışmalara kaynak teşkil edeceği gibi, literatürdeki boşlukların doldurulmasında da önemli katkılar sağlayacağı düşünölmektedir.

## 7.KAYNAKLAR

1. **Abuajah, C.I., Ogbonna, A.C., Osuji, C.M.** Functional components and medicinal properties of food: a review. *J. Food Sci. Technol.* **2015**. 52, 2522–2529. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1396-5>.
2. **Alexiou P, Pegklidou K, Chatzopoulou M, Nicolaou I, Demopoulos VJ.** Aldose reductase enzyme and its impact on major health problems of the 21st century. *Curr Med Chem.* **2009**; 16 : 734–52
3. **Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD.** Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* **1999**;30:1356–62
4. **Aristatile, B., Al-Numair, K. S., Al-Assaf, A. H., &Pugalendi, K. V.** Pharmacological effect of carvacrol on D-galactosamine-induced mitochondrial enzymes and DNA damage by single-cell gel electrophoresis. *Journal of Natural Medicines.* **2011**.65(3–4), 568–577.
5. **Arunasree, K. M.** Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine,* (2010). 17(8–9), 581–588.
6. **Assy N., Kaita K., Mymin D., Levy C., Rosser B., Minuk G.** Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Dig Dis Sci* **2000**, 45: 1929–1934
7. **Aygun C, Kocaman O, Sahin T, Uraz S, Eminler AT, Celebi A, et al.** Evaluation of metabolic syndrome frequency and carotid artery intima-media thickness as risk factors for atherosclerosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci.* **2008**;53:1352–7.
8. **Bakır M, Geyikoglu F, Colak S, et al.** The carvacrol ameliorates acute pancreatitis-induced liver injury via antioxidant response. *Cytotechnology.* **2016**;68:1131–1146
9. **Bohren, K.M., Bullock, B., Wermuth, B. and Gabbay, K.H.** The aldo- keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *Journal of Biological Chemistry.*, **1989**. Vol.264; pp.9547–9551.
10. **Brownlee M, Cerami A.** The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem.* **1981**;50:385–432.
11. **Brownlee, M.** 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.*, **2001**, Vol.414; pp.813–820.
12. **Brown KE, Broadhurst KA, Mathahs MM, et al:** Immunodetection of aldose reductase in normal and diseased human liver. *Histol Histopathol* **2005**.20: 429-436,
13. **Can Baser K.** Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *CPD.* **2008**;14:3106–3119.
14. **Chalasanani, N., Younossi, Z., Lavine J. E. et al.,** “The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: *Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association, Hepatology*, **2012**, 55(6), 2005–2023.
15. **Chen T, Shi D, Chen J, Yang Y, Qiu M, Wang W and Qiu L:** Inhibition of aldose reductase ameliorates diet induced nonalcoholic steatohepatitis in mice via modulating the phosphorylation of hepatic peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$ . *Mol Med Rep* **2015**.11: 303 308, 16
16. **Chenet AL, Duarte AR, de Almeida FJS, Andrade CMB, de Oliveira MR.** Carvacrol Depends on Heme Oxygenase-1 (HO-1) to Exert Antioxidant, Anti-inflammatory, and Mitochondria-Related Protection in the Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Line Exposed to Hydrogen Peroxide. *Neurochem Res.* **2019** Apr;44(4):884-896.
17. **Clements RS.** The polyol pathway. A historical review. *Drugs.* **1986**;32(2):3–5
18. **Clements RS, Weaver JP, Winegrad AL.** The distribution of polyol: NADP oxidoreductase in mammalian tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **1969**;37(2):347–353
19. **Chitturi S, Wong VW, Farrell G.** Nonalcoholic fatty liver in Asia: Firmly entrenched and rapidly gaining ground. *J Gastroenterol Hepatol.* **2011**;26(S1):163–72
20. **Cusi K.** Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity.* **2009**;16(2):141–149
21. **Day CP, James OF.** Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* **1998** 114(4):842–5.
22. **Davidson B, Cliff G.** Liver lipids of female *Carcharias taurus* (spotted raggedtooth) sharks: a comparison between seasons. *Fish Physiol Biochem.* **2011**;37:613–8.
23. **De Vincenzi, M., Stamatii, A., De Vincenzi, A. and Silano, M.** Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia* **2004**, 75:801–804.
24. **Devi A Reddy A B M, Yadav U C .** Aldose Reductase Inhibitors in the Functional Foods: Regulation of Diabetic Complications. *Functional Food and Human Health.* **2018**. 555-574.

25. **Donati G., Stagni B., Piscaglia F., Venturoli N., Morselli-Labate A.M., Rasciti L., et al.** Increased prevalence of fatty liver in arterial hypertensive patients with normal liver enzymes: role of insulin resistance. *Gut* **2004**, 53: 1020–1023
26. **Dong Y, Li S, Zhao W, Wang Y, Ge T, Xiao J, Li Y.** Changes of MODY signal pathway genes in the endoplasmic reticulum stress in INS-1-3 cells. *PLoS One*. **2018** Jun 7;13(6):e0198614.
27. **Du, W. X., Olsen, C. W., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Levin, C. E., & Friedman, M.** Antibacterial activity against *E. coli* O157:H7, physical properties, and storage stability of novel carvacrol-containing edible tomato films. *Journal of Food Science*, **2008**, 73(7), M378–M383.
28. **Ehrensberger AH, Wilson DK.** Structural and catalytic diversity in the two family 11 aldo-keto reductases. *J Mol Biol* **2004**. 337:661–673.
29. **Ekstedt M., Franzen L.E., Mathiesen U.L., Thorelius L., Holmqvist M., Bodemar G., et al.** Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* **2006**;44: 865–873
30. **Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM.** Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* **2002**; 23(5):599–622. PMID: 12372842
31. **Fan JG, Farrell GC.** Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China. *J Hepatol.* **2009**;50:204–10.
32. **Fan K, Li X, Cao Y, Qi H, Li L, Zhang Q, Sun H.** Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. *Anticancer Drugs.* **2015** Sep;26(8):813-23.
33. **Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G.** Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. *Obes Rev* **2004**. 5(1):27–42.
34. **Fu D, Lu J, Yang S.** Oleic/Palmitate Induces Apoptosis in Human Articular Chondrocytes via Upregulation of NOX4 Expression and ROS Production. *Ann Clin Lab Sci.* **2016** Jul; 46(4):353-9.
35. **Gilling, D. H., Kitajima, M., Torrey, J. R., & Bright, K. R.** Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *Journal of Applied Microbiology*, (2014). 116(5), 1149–1163.
36. **Gonzalez-Paredes F. J., Hernandez Mesa G., Morales Arraez D. et al.,** “Contribution of cyclooxygenase end products and oxidative stress to intrahepatic endothelial dysfunction in early non-alcoholic fatty liver disease,” *PLoS One*, **2016**. vol. 11, no. 5,
37. **Guerrero R, Vega GL, Grundy SM, Browning JD.** Ethnic differences in hepatic steatosis: an insulin resistance paradox? *Hepatology.* **2009**;49:791–801.
38. **Guillen, F., Zapata, P. J., Martinez-Romero, D., Castillo, S., Serrano, M. and Valero, D.** Improvement of the overall quality of table grapes stored under modified atmosphere packaging in combination with natural antimicrobial compounds. *J. Food Sci.* **2007**, 72: S185–190.
39. **Guimarães, A. G., Oliveira, G. F., Melo, M. S., Cavalcanti, S. C., Antonioli, A.R., Bonjardim, L. R. Quintans-Júnior, L. J.** Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **2010** 107(6), 949–957.
40. **Hamaguchi M, Kojima T, Itoh Y, Harano Y, Fujii K, Nakajima T, et al.** The severity of ultrasonographic findings in nonalcoholic fatty liver disease reflects the metabolic syndrome and visceral fat accumulation. *Am J Gastroenterol.* **2007**;102:2708–15
41. **Hers HG.** The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. *Biochim Biophys Acta.* **1956**;22:202–3.
42. **Hers HG.** Aldoz reduktaž. *Biochimica ve Biophysica Acta* . **1960**; 37 (1): 120-126.
43. **Hoog SS, Pawlowski JE, Alzari PM, Penning TM, Lewis M.** Three-dimensional structure of rat liver 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase: a member of the aldo-keto reductase superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**. 91:2517–2521.
44. **Hussein J, El-Banna M, Mahmoud KF, et al.** The therapeutic effect of nano-encapsulated and nano-emulsion forms of carvacrol on experimental liver fibrosis. *Biomed Pharmacother.* **2017**;90: 880–887
45. **Iwakiri Y, Grisham, M. and Shah V.** “Vascular biology and pathobiology of the liver: report of a single-topic symposium,” *Hepatology*, **2008**. vol. 47, no. 5, pp. 1754–1763.
46. **Jeffery J, Jornvall H.** Enzyme relationships in a sorbitol pathway that bypasses glycolysis and pentose phosphates in glucose metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **1983**;80(4 I):901–9053

47. **Jukic M, Politeo O, Maksimovic M, Milos M, Milos M.** In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytother Res.* **2007** Mar;21(3):259-61.
48. **KH Baser.** *Curr Pharm Des*, **2008**, 14(29), 3106- 3119.
49. **K. Jarukamjorn, N. Jearapong, C. Pimson, W. Chatuphonprasert, A.** High-Fat, High fructose diet induces antioxidant imbalance and increases the risk and progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice, *Scientifica* **2016** (2) (2016) 5029414(2016-2-25),
50. **Kaplan MM.** Acute fatty liver of pregnancy. *N Engl J Med.* **1985**;313:367-70
51. **Khan I, Bhardwaj M, Shukla S, Min SH, Choi DK, Bajpai VK, Huh YS, Kang SC.** Carvacrol inhibits cytochrome P450 and protects against binge alcohol-induced liver toxicity. *Food Chem Toxicol.* **2019** Sep;131:110582.
52. **King GL, Loeken MR.** Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem Cell Biol.* **2004**; 122(4):333-338. PMID: 15257460
53. **Kinoshita JH, Dvornik D, Kraml M, Gabbay KH.** The effect of an aldose reductase inhibitor on the galactose-exposed rabbit lens. *Biochim Biophys Acta.* **1968**;158:472-5.
54. **Kinoshita JH, Fukushi S, Kador P, Merola LO.** Aldose reductase in diabetic complications of the eye. *Metabolism.* **1979**;28:462-9.
55. **Kisko, G. and Roller, S.** Carvacrol and p-cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *BMC Microbiol.* **2005**:36.
56. **Kotronen A., Yki-Jarvinen H.** Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2008**;28: 27-38
57. **Kozlitina J, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH.** Dissociation between APOC3 variants, hepatic triglyceride content and insulin resistance. *Hepatology.* **2011**;53:467-74.
58. **Kumar, A.** **1998.** Diabetic blindness in India: the emerging scenario. *Indian Journal Ophthalmology* **1998**. Vol.46; pp.65-6.
59. **Lee, A.Y.W. and Chung, S.S.M.** Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB Journal.*, **1999**. Vol.13; pp.23-30.
60. **Lieber CS, Rubin E.** Alcoholic fatty liver. *N Engl J Med.* **1969**;280:705-8.
61. **Lima Mda S, Quintans-Júnior LJ, de Santana WA, Martins Kaneto C, Pereira Soares MB, Villarreal CF.** Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *Eur J Pharmacol.* **2013** Jan 15;699(1-3):112-7.
62. **Lu, Y. and Wang, C.** Reduction of *Salmonella enterica* contamination on grape tomatoes by washing with thyme oil, thymol, and carvacrol as compared with chlorine treatment. *J. Food Prot.* **2010**, 73:2270-2275.
63. **Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ.** Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* **1980**, 55(7): 434-8
64. **Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ.** Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* **1980**, 55:434-8.
65. **Machado M., Marques-Vidal P., Cortez-Pinto H.** Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* **2006**, 45: 600-606
66. **Marchesini G., Brizi M., Bianchi G., Tomassetti S., Bugianesi E., Lenzi M., et al.** Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* **2001**, 50: 1844-1850
67. **Markus HB, Raducha M, Harris H.** Tissue distribution of mammalian aldose reductase and related enzymes. *Biochemical Medicine.* **1983**, 29(1):31-45.
68. **Mates J.M., Perez-Gomez C., De Castro I.N.** Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin. Biochem.* **1999**, 32, 595-603.
69. **Mohebbati R, Paseban M, Soukhtanloo M, Jalili-Nik M, Shafei MN, Yazdi AJ, Rad AK.** Effects of standardized *Zataria multiflora* extract and its major ingredient, Carvacrol, on Adriamycin-induced hepatotoxicity in rat. *Biomed J.* **2018**, Dec;41(6):340-347.
70. **Mohseni R, Karimi J, Tavilani H, Khodadadi I, Hashemnia M.** Carvacrol ameliorates the progression of liver fibrosis through targeting of Hippo and TGF- $\beta$  signaling pathways in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced liver fibrosis in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* **2019**, Feb;41(1):163-171.
71. **Mummadi RR, Kasturi KS, Chennareddy S, Sood GK.** Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* **2008**, 6:1396-402.
72. **Nishimura Yabe C.** Aldose reductase in glucose toxicity : A potential target for prevention of diabetic complications. *Pharmacol Rev.* **1998**; 50(1):21-33. PMID: 9549756

73. **Nostro, A., Blanco, A. R., Cannatelli, M. A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., ... Alonzo, V.** Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters*, (2004). 230(2), 191–195.
74. **Olasupo, N. A., Fitzgerald, D. J., Narbad, A. and Gasson, M. J.** Inhibition of *Bacillus subtilis* and *Listeria innocua* by nisin in combination with some naturally occurring organic compounds. *J. Food Prot.* **2004**, 67:596–600.
75. **Ozkan, A., & Erdogan, A.** A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. *Turkish Journal of Biology*. (2011). 35(6).735-742
76. **Park M, Sabetski A, Kwan Chan Y, Turdi S, Sweeney G.** Palmitate induces ER stress and autophagy in H9c2 cells: implications for apoptosis and adiponectin resistance. *J Cell Physiol*. **2015** Mar;230(3):630-9.
77. **Pasarin M., Mura, V., Gracia-Sancho J. et al.,** “Sinusoidal endothelial dysfunction precedes inflammation and fibrosis in a model of NAFLD,” *PLoS One*, **2012**. vol. 7, no. 4, article e32785.
78. **Penning TM.** The aldo-keto reductases (AKRs): overview. *Chem Biol Interact*. **2015**. 234:236-46.
79. **Petersen KF, Dufour S, Hariri A, Nelson-Williams C, Foo JN, Zhang XM, et al.** Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. **2010**;362:1082–9.
80. **Petrash, J.M.** “ All in the family: aldose reductase and closely related aldo-keto reductases”. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2004**. Vol.61(7–8); pp.737–749
81. **Qiu L, Lin J, Xu F, Gao Y, Zhang C, Liu Y, Luo Y and Yang JY:** Inhibition of aldose reductase activates hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and ameliorates hepatosteatosis in diabetic db/db mice. *Exp Diabetes Res* **2012**: 789730, 2012.
82. **Qiu L, Lin J, Ying M, Chen W, Yang J, Deng T, Chen J, Shi D, Yang JY.** Aldose reductase is involved in the development of murine diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. **2013**, Sep 16;8(9):e73591
83. **Qiu L, Cai C, Zhao X, Fang Y, Tang W, Guo C.** Inhibition of aldose reductase ameliorates ethanol-induced steatosis in HepG2 cells. *Mol Med Rep*. **2017**, May;15(5):2732-2736. doi: 10.3892/mmr.2017.6313.
84. **Ratzu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, et al.** Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. **2005**;128:1898–906
85. **Reddy, G.B., Satyanarayana, A., Balakrishna, N., Ayyagari, R., Padma, M., Viswanath, K. and Petrash, J.M.** Erythrocyte aldose reductase activity and sorbitol levels in diabetic retinopathy. *Molecular Vision*, **2008**. Vol.14; pp.593–601.
86. **Richter N, Breicha K, Hummel W, Niefind K.** The three-dimensional structure of AKR11B4, a glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans*, reveals a tryptophan residue as an accelerator of reaction turnover. *J Mol Biol* **2010**. 404:353–362.
87. **Roglans N, Vila L, Farre M, et al.** Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPAR $\alpha$  activity in fructose-fed rats. *Hepatology*. **2007**;45:778–788.
88. **Roller, S. and Seedhar, P.** Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4 degrees and 8 degrees C. *Lett. Appl. Microbiol*. **2002**, 35:390–394.
89. **Sánchez, C., Aznar, R., & Sánchez, G.** The effect of carvacrol on enteric viruses. *International Journal of Food Microbiology*, (2015). 192, 72–76
90. **Santana Souza MT, Teixeira DF, de Oliveira JP, Oliveira AS, Quintans-Júnior LJ, Correa CB, Camargo EA.** Protective effect of carvacrol on acetic acid-induced colitis. *Biomed Pharmacother*. **2017** Dec;96:313-319
91. **Sango K, Suzuki T, Yanagisawa H, Takaku S, Hirooka H, Tamura M, et al.** High glucose-induced activation of the polyol pathway and changes of gene expression profiles in immortalized adult mouse Schwann cells IMS32. *J Neurochem*. **2006**; 98(2):446–458. PMID: 16805838
92. **Santarelli L., Bracci M., Mocchegiani E.** In vitro and in vivo effects of mercuric chloride on thymic endocrine activity, NK and NKT cell cytotoxicity, cytokine profiles (IL-2, IFN-gamma, IL-6): role of the nitric oxide-L-arginine pathway. *Int Immunopharmacol*. **2006** Mar;6(3):376-89.
93. **Schlegel BP, Jez JM, Penning TM.** Mutagenesis of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase reveals a “push-pull” mechanism for proton transfer in aldo-keto reductases. *Biochemistry* **1998**. 37:3538–3548.
94. **S. Spahis, E. Delvin, J.M. Borys, E. Levy,** Oxidative stress as a critical factor in nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis, *Antioxid. Redox Signal*. 26 (10) (2017) 519–541.

95. **Sohrabi Y, Mohammadzadeh-Aghdash H, Baghbani E, Dehghan P, Ezzati Nazhad Dolatabadi J.** Cytotoxicity and Genotoxicity Assessment of Ascorbyl Palmitate (AP) Food Additive. *Adv Pharm Bull.* **2018** Jun;8(2):341-346.
96. **Tabakoff, B., Anderson, R. and Alivisatos, S.G.A. 1973.** Enzymatic reduction of “biogenic” aldehydes in brain. *Mol Pharmacol.* **1973.** Vol.9; pp.428–437
97. **Takahashi M, Hoshi A, Fujii J, et al.** Induction of aldose reductase gene expression in LEC rats during the development of the hereditary hepatitis and hepatoma. *Japanese Journal of Cancer Research.* **1996;**87(4):337–341.
98. **Takahashi M, Fujii J, Miyoshi E, Hoshi A, Taniguchi N.** Elevation of aldose reductase gene expression in rat primary hepatoma and hepatoma cell lines: implication in detoxification of cytotoxic aldehydes. *International Journal of Cancer.* **1995;**62(6):749–754.
99. **Targher G., Bertolini L., Padovani R., Rodella S., Tessari R., Zenari L., et al.** Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **2007;**30: 1212–1218
100. **Toppo E, Darvin SS, Esakkimuthu S, Nayak MK, Balakrishna K, Sivasankaran K, Pandikumar P, Ignacimuthu S, Al-Dhabi NA.** Effect of two andrographolide derivatives on cellular and rodent models of non-alcoholic fatty liver disease. *Biomed Pharmacother.* **2017** Nov;95:402-411.
101. **Turner, A.J. and Tipton, K.F.** The characterization of two reduced nicotinamideadenine dinucleotide phosphate-linked aldehyde reductases from pig brain. *Bio-chem J.* **1972.** Vol.130; pp.765–772.
102. **Ultee A, Slump RA, Steging G, Smid EJ .** Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J. Food Prot.* **2000;**63(5): 620–624.
103. **Ultee, A., Kets, E. P. and Smid, E. J.** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999,** 65:4606–4610.
104. **Ultee, A., Bennik, M. H. and Moezelaar, R.** The phenolichydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002,** 68:1561–1568.
105. **Van Heyningen R.** Formation of polyols by the lens of the rat with ‘sugar’ cataract. *Nature.* **1959;**468:194-5
106. **Vander Jagt, D.L. and Hunsaker, L.A.** Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chem Biol Interact.* **2003,** pp.143–144; 341–51.
107. **Wermuth, B., Burgisser, H., Bohren, K., and von, Wartburg, J.P.** Purification and characterization of human brain aldose reductase. *Eur J Biochem.* **1982.** Vol.127; pp.279–284.
108. **Wilson DK, Bohren KM, Gabbay KH, Quijcho FA.** An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science* . **1992.** 257:81–84.
109. **Xu J, Zhang J, Cai S, Dong J, Yang JY, Chen Z.** Metabonomics studies of intact hepatic and renal cortical tissues from diabetic db/db mice using high-resolution magic-angle spinning 1H NMR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* **2009;**393(6-7):1657–1668.
110. **Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A, Uygun A, Cakir E, et al.** Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* **2005;**100:850–5.
111. **Yin QH, Yan FX, Zu XY, Wu YH, Wu XP, Liao MC, Deng SW, Yin LL, Zhuang YZ.** Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology.* **2012** Jan;64(1):43-51.
112. **Yoon Y, Song, Hong J. S. H., and Kim J. Q.,** “Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease,” *Clinical Chemistry*, **2000.** vol. 46, no. 10, pp. 1626–1630.
113. **Zhou X, Chang B, Gu Y.** MicroRNA-21 abrogates palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis through caspase-3/NF-κB signal pathways. *Anatol J Cardiol.* **2018** Dec; 20(6):336-346.
114. **ZE Suntress; J Coccimiglio; M Alipour.** *Crit Rev Food Sci Nutr,* **2015,** 55(3), 304-318.
115. **Zeindl-Eberhart E, Haraida S, Liebmann S, et al.** Detection and identification of tumor-associated protein variants in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology.* **2004;**39(2):540–549.

## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Çeşme’de doğdu. İlkokulu ve ortaokulu Namık Kemal İlköğretim Okulu(Çeşme),liseyi Sıdika Kelami Ertan Lisesi (Çeşme)’nde tamamladı. 2010 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü ‘nü kazandı ve 2015 yılında mezun oldu. 2015 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi ABD. ‘da yüksek lisansa başladı.