



**Selonsertib ve Fenolik Asitlerin *İn vitro*
Karaciğer Yağlanması Modelinde Etkilerinin
Araştırılması**

Yüksek Lisans Tezi

İrem Nur ÖZKAN

Eskişehir 2024

**Selonsertib ve Fenolik Asitlerin *İn vitro* Karaciğer Yağlanması Modelinde
Etkilerinin Araştırılması**

İrem Nur ÖZKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Haziran 2024**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

İrem Nur ÖZKAN'ın Selonsertib ve Fenolik Asitlerin *İn vitro* Karaciğer Yağlanması Modelinde Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tezi 13/06/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK	
Üye	: Prof. Dr. Miriş DİKMEN	
Üye	: Doç. Dr. Volkan KILIÇ	

Prof. Dr. Saime ÖNCE
Anadolu Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Selonsertib ve Fenolik Asitlerin *İn vitro* Karaciğer Yağlanması Modelinde Etkilerinin Araştırılması

İrem Nur ÖZKAN

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Haziran 2024

Danışman: Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, dünya çapında yetişkin nüfusunun yaklaşık yarısını tehdit eden ciddi bir sağlık problemidir. Hastalık karaciğer yağlanmasıyla başlayıp ciddi bir hastalık olan siroza kadar ilerleyebilir. Patogenezi hala tam olarak çözümlenememiştir, ancak; hastalık ile ilişkili tehlike unsurları oldukça belirgindir. İnsülin direnci, sağlıklı yaşam tarzı, obezite bu belirtilerin arasındadır. İlaç denemeleri devam etmesine rağmen günümüzde belirgin bir ilacı yoktur. Bu tez kapsamında, HepG-2 hücre hattı kullanılarak, oleik asit ile oluşturulmuş *in vitro* non-alkolik karaciğer yağlanması modeli çalışılmıştır. Karaciğer yağlanmasını önlemek için; oluşturulan yağlanma modelinde MTT yöntemiyle Selonsertib, Fenofibrat, Ferulik asit, Kafeik asit ve Vanilik asit'in sitotoksik etkileri ölçülmüş, IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. İlaç ve fenolik asitlerin apoptotik etkileri, toksik olmayan konsantrasyonlara göre Annexin V-PI yöntemi ile ve hücre içi ve hücre dışı sitokin seviyeleri de akış hücremetrede ölçülmüştür. Analiz sonuçlarına göre; oluşturulan *in vitro* yağlı karaciğer modelinde oluşan apoptotik etkinin en fazla Ferulik asit ile azaldığı görülmüştür. Selonsertib'in non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ilacı olarak Faz III aşamasında çalışmalarının sonlandırılması, tez kapsamında yapılan deney sonuçlarıyla paralel olarak çıkmıştır. IL-6 ve TNF- α seviyesinin yağlı karaciğer modelinde inhibe eden Kafeik asit olmuştur. IL-10 seviyesini yağlı karaciğer modeline göre iyileştiren maddeler Fenofibrat, ferulik asit, kafeik asit, selonsertib ve vanilik asit olmuştur. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında ilaçların yanında özellikle ferulik asitin de kullanılması, yeni kombine preparatların ortaya çıkma potansiyeli açısından umut verici olacaktır.

Anahtar Sözcükler: Ferulik asit, Kafeik asit, Non-alkolik yağlı karaciğer, Selonsertib

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Selonsertib and Phenolic Acids in an In vitro Model of

Hepatic Steatosis

İrem Nur ÖZKAN

Department of Pharmaceutical Microbiology
Anadolu University, Graduate School, June, 2024

Supervisor: Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

Non-alcoholic fatty liver disease is a serious health problem that threatens approximately half of the adult population worldwide. The disease starts with liver fat accumulation and can progress to cirrhosis, a severe condition. Although its pathogenesis is not yet fully understood, the risk factors associated with the disease are quite evident. These include insulin resistance, unhealthy lifestyle, and obesity. Despite ongoing drug trials, there is no definitive medication currently available. In this thesis, an in vitro non-alcoholic fatty liver disease model was studied using the HepG-2 cell line and induced with oleic acid. To prevent liver fat accumulation, the cytotoxic effects of Selonsertib, Fenofibrate, Ferulic acid, Caffeic acid, and Vanillic acid were measured using the MTT method in the created fat accumulation model, and their IC₅₀ values were calculated. The apoptotic effects of the drugs and phenolic acids were measured by the Annexin V-PI method at non-toxic concentrations, and intracellular and extracellular cytokine levels were also measured by flow cytometry. According to the analysis results, Ferulic acid was the most effective in reducing the apoptotic effect in the created in vitro fatty liver model. The termination of Phase III studies for Selonsertib as a drug for non-alcoholic fatty liver disease was found to be consistent with the experimental results obtained in this thesis. Caffeic acid was found to inhibit the levels of IL-6 and TNF- α in the fatty liver model. The substances that improved the IL-10 level according to the fatty liver model were Fenofibrate, Ferulic acid, Caffeic acid, Selonsertib, and Vanillic acid. The use of Ferulic acid, in particular, alongside medications in non-alcoholic fatty liver disease, could be promising in terms of the potential emergence of new combined preparations.

Keywords: Ferulic acid, Caffeic acid, Non-alcoholic fatty liver disease, Selonsertib

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca deneyimiyle her zaman yanımda olan, beni hep daha iyiye yönlendiren, sevgisi ve yol göstericiliği ile değerli katkılar sunan sevgili danışmanım Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK'e;

Bilgi ve birikimiyle her zaman yanımda olan sevgili hocam Prof. Dr. Miriş DİKMEN'e;

Laboratuvarda bulunduğum süre boyunca beraber çalışıp, her zorluğun üstesinden birlikte geldiğimiz yüksek lisans arkadaşlarıma;

Hem akademik hem de sosyal anlamda birlikte vakit geçirdiğim, olumlu enerjisiyle beni her zaman motive eden sevgili hocam Öğr. Gör. Pervin SOYER'e;

Mesafelere rağmen benimle olduğunu hissettiren, bana her zaman cesaret verip umudumu hiçbir zaman yitirmemem için bana destek olan başta erkek arkadaşım Okan KORKMAZ'a dostlarım Selcan BAHADIR'a ve Şükran KAPTAN'a;

Eğitim hayatım boyunca maddi, manevi destek ve motivasyonları sayesinde tüm zorluğu kolay atlatmama katkıda bulunan, her zaman yanımda olan, sevgilerini benden eksik etmeyen canım annem Fatma ÖZKAN'a, canım babam Ahmet ÖZKAN'a ve canım abim Ali İbrahim ÖZKAN'a;

Doğduğu günden beri varlığı benim için büyük bir güç kaynağı olan, sevgisi ve desteğiyle hayatımı her anlamda aydınlatan biricik kardeşim Ömer Berk ÖZKAN'a;
Sonsuz teşekkür ederim.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....
İrem Nur Özkan

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
GÖRSELLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Non- Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı.....	3
2.1.2. NAYK tarihçesi.....	3
2.1.3. NAYK görülme sıklığı.....	3
2.1.4. NAYK nedenleri	4
2.1.5. NAYK tanısı.....	5
2.1.6. NAYK tedavisi	6
2.2. Non-alkolik steatohepatit.....	7
2.3. Siroz	7
2.4. Sitokinler ve NAYK	8

2.5. Apoptoz Sinyal Düzenleyici Kinaz 1 İnhibitörleri	9
2.5.1 Selonsertib	10
2.6. Fenofibrat.....	11
2.7. Fenolik Asitler	12
2.7.1. Hidroksisinamik asitler	12
2.7.1.1. <i>Kafeik asit</i>	12
2.7.1.2. <i>Ferulik asit</i>	13
2.7.2. Hidroksibenzoik asitler	13
2.7.2.1. <i>Vanilik asit</i>	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Kullanılan cihazlar	15
3.1.2. Kullanılan laboratuvar malzemeleri ve kimyasallar.....	15
3.1.3. Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu	17
3.1.4. Kullanılan kimyasal ve boyaların hazırlanışı	17
3.1.4.1. <i>DMEM besiyeri</i>	17
3.1.4.2. <i>0.5 mM oleik asit</i>	17
3.1.4.3. <i>Ferulik asit</i>	17
3.1.4.4. <i>Kafeik asit</i>	18
3.1.4.5. <i>Vanilik asit</i>	18
3.1.4.6. <i>Selonsertib</i>	18
3.1.4.7. <i>Fenofibrat</i>	18
3.1.4.8. <i>%35'lik Yağ kırmızısı O (Oil red O)</i>	18
3.2. Yöntem	19
3.2.1. Hücre hattının stoktan çıkarılması	19
3.2.2. HepG-2 hücre hattının çoğaltılması.....	19
3.2.3. Hücrelerin stoklanması	19
3.2.4. Hücrelerin sayımı	20
3.2.5. MTT yöntemiyle sitotoksitenin belirlenmesi.....	20
3.2.6. HepG-2 hücreleriyle NAYK modeli oluşturma	22

3.2.7. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin yağ kırmızısı O ile boyanması.....	22
3.2.8. NAYK modelinin akış sitometride Annexin V-PI yöntemiyle apoptotik etkisinin belirlenmesi.....	23
3.2.9. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin akış sitometride interlökin-1 β düzeylerinin belirlenmesi	25
3.2.10. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin akış sitometride interlökin-6, interlökin-10 ve tümör nekroz faktör- α düzeylerinin belirlenmesi	26
3.2.11. Sitotoksosite yöntemlerinin istatistiksel analizi	27
3.2.12. Etik bildirim.....	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	28
4.1. MTT Yöntemi	28
4.1.1. Oleik asit'in MTT yöntemiyle sitotoksitesinin belirlenmesi	28
4.1.2. Selonsertib ve Fenofibrat'ın NAYK modeli için sitotoksitesinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi.....	29
4.1.3. Fenolik asitlerin NAYK modeli için sitotoksitesinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi	31
4.2. NAYK modeli oluşturulan hücrelerin yağ kırmızı O ile boyanması	33
4.3. Akış Sitometri Yöntemi	35
4.3.1.NAYK modelinin akış sitometride Annexin V-PI yöntemiyle apoptotik etkisinin belirlenmesi sonuçları.....	35
4.3.2. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin akış sitometride interlökin-1 β düzeylerinin değerlendirilmesi.....	38
4.3.3. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin akış sitometride interlökin-6, interlökin-10 ve tümör nekroz faktör- α düzeylerinin değerlendirilmesi	41
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50

KAYNAKÇA..... 53

ÖZGEÇMİŞ



TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Siroz Sınıflandırılması	8
Tablo 4.1. Selonsertib ve Selonsertib'in IC ₅₀ değeri.....	30
Tablo 4.2. Fenolik asitlerin IC ₅₀ değeri.....	32
Tablo 4.3. Model oluşturulmuş HepG-2 hücre hattının farklı ortamlarda boyanma görüntüleri.....	34
Tablo 4.4. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki apoptotik etkinin belirlenmesi.....	37
Tablo 4.5. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki IL-1 β etkisinin belirlenmesi.....	39
Tablo 4.6. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki IL-6 etkinin belirlenmesi.....	41
Tablo 4.7. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki IL-10 etkisinin belirlenmesi.....	44
Tablo 4.8. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki TNF-a etkisinin belirlenmesi.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Selonsertib Kimyasal Yapısı.	10
Şekil 2.2. Hidroksisinamik Asit Kimyasal Yapısı.	12
Şekil 2.3. Kafeik Asit Kimyasal Yapısı.	12
Şekil 2.4. Ferulik Asit Kimyasal Yapısı.	13
Şekil 2.5. Hidroksibenzoik Asit Kimyasal Yapısı.	14
Şekil 2.6. Vanilik Asit Kimyasal Yapısı.....	14
Şekil 4.1. Oleik asidin HepG-2 hücre hattı üzerine etkisi.	28
Şekil 4.2. Selonsertib ve Fenofibrat'ın konsantrasyonlarının HepG-2 hücre hattı üzerindeki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.	29
Şekil 4.3. Fenolik asit konsantrasyonlarının HepG-2 hücre hattı üzerindeki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	32
Şekil 4.4. NAYK Modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki apoptotik etkisinin akış sitometride değerlendirilmesi.....	37
Şekil 4.5. NAYK Modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki IL-1 β sitokin seviyesinin akış sitometride değerlendirilmesi.....	39
Şekil 4.6. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki IL-6 sitokin seviyesinin akış sitometride değerlendirilmesi.....	43
Şekil 4.7. NAYK Modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki IL-10 sitokin seviyesinin akış sitometride değerlendirilmesi.....	45
Şekil 4.8. NAYK Modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki apoptotik etkisinin akış sitometride değerlendirilmesi.....	48

GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 2.1. NAYK görülme sıklığı	4
Görsel 2.2. NAYK Patogenezi..	5
Görsel 2.3. NASH Mikroskop Görüntüsü.....	7
Görsel 2.4. Selonsertib'in mitokondriyal hasara neden olduğu mekanizma	10
Görsel 2.5. Fenofibrat etki mekanizması..	11
Görsel 3.1. MTT boyasının kimyasal yapısı	21
Görsel 3.2. MTT Aşamaları	21
Görsel 3.3. Akış sitometri çalışma prensibi.	24

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	:Alanin Aminotransferaz
AST	:Aspartat Aminotransferaz
DMSO	:Dimetilsülfoksit
FA	:Ferulik Asit
FBS	:Fetal Bovine Serum
FDA	:Gıda ve İlaç Dairesi
FFA	:Serbest Yağ Asidi
HCV	:Hepatit C Enfeksiyonu
İL-10	:İnterlökin 10
İL-1β	:İnterlökin 1 beta
İL-6	:İnterlökin 6
JNK	:C-Jun N-Terminal Kinazlar
KA	:Kafeik Asit
kDa	:Kilodalton
LXR	:Karaciğer X Almaçları
MAP3K5	:Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz 5
MRG	:Manyetik Rezonans Görüntüleme
NASH	:Non-Alkolik Steatohepatit
NAYK	:Non-Alkolik Yağlı Karaciğer
NAYKH	:Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı

ORO	:Oil Red O
OS	:Oksidatif Stres
PBS	:Fosfat Tamponlu Salin
PI	:Propidyum İyodür
PPAR-α	:Peroksizom Proliferatörüyle Aktifleştirilen Reseptör-A
PS	:Penisilin Streptomisin
SREBP	:Sterol Düzenleyici Element Bağlayan Proteinler
T2DM	:Tip 2 Diyabetes Mellitus
TE	:Tripsin Edta
TNF- α	:Tümör Nekroz Faktör Alfa
VA	:Vanilik Asit

1. GİRİŞ

Son zamanlarda, dünya genelinde kayda değer artış gösteren non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) büyük endişe yaratmaktadır. Hastalık, karaciğerde yağların birikimiyle başlayıp günden güne non alkolik steatohepatite (NAYK), karaciğer fibrozisine, hatta siroza kadar devam eden bir seri sağlık problemini içermektedir. Son yapılan çalışmalarda, dünyadaki yetişkin nüfusun %32'sinin NAYK hastalığı ile savaştığını göstermektedir. Bu artışa, günümüz yaşamının getirdiği etkenlerin, özellikle obezite ve diyabetin sıklığının artmasının etkisi olmuştur. NAYK, günümüzde karaciğer kanserinin sık görülme nedeni olarak kabul edilmekte ve Amerika Birleşik Devletleri'nde karaciğer nakli belirtileri arasında öne çıkmaktadır. Dolayısıyla, Non-alkolik steatohepatit (NASH); özellikle de NAYK gibi karaciğer rahatsızlıklarının tedavisi ve önüne geçilmesi, sağlık politikalarının öncelikli hedefleri arasında yer almaktadır (Teng vd., 2023).

NAYK hastalığının nedeni hala tam olarak anlaşılmamış olsa da, hastalık ile ilişkili tehlike unsurları oldukça belirgindir. Bu unsurlar içerisinde sağlıksız yaşam tarzı, insülin direnci, tip 2 diabetes mellitus (T2DM), artan karaciğer yağlanması ve bağırsak mikroorganizmalarının dengesizliği yer alır. NAYK hastalığı için spesifik bir iyileştirme süreci ya da herhangi bir ilaç bulunmamaktadır. Ancak, Avrupa Karaciğer Araştırmaları Derneği'nin klinik uygulama yönergeleri, fazla kilolu veya obez NAYK hastalarında kilolarının %5-10 arası kaybının, hastalığın gidişatını pozitif yönde etkileyebileceğini belirtilmiştir (Rong vd., 2023).

ASK-1 inhibitörü Selonsertib, oksidatif stres ortamlarında inflamasyon, hücre ölümü gibi çeşitli durumları destekleyebilir. NAYK hastalığının belirtilerinden biri olan oksidatif stres karaciğer rahatsızlıklarında artmasından dolayı hastalığın tedavisi için faz III aşamasına kadar denenmiş ancak başarısız olmuştur.

Fenofibrat, vücuttaki yüksek trigliserid ve yağ düzeylerini azaltması için Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından izin verilmiş bir ilaçtır. Bu ilaç, peroksizom proliferatör ile aktive edilen bir reseptör- α (PPAR- α) agonisti olarak ifade edilir ve sadece kandaki yağ düzeylerini düşürmekle kalmaz, buna ek olarak kalp ve damar rahatsızlığı riskini de önemli ölçüde azaltır. Bununla birlikte, fenofibratın epitel işlevini koruyarak vasküler yan etkileri düşürdüğü ve özellikle diyabetle ilgili durumları olumlu yönde değiştirdiği gösterilmiştir. Fenofibratın etkileri yalnızca kalp ve damar sistemiyle kısıtlı değildir; bunun yanı sıra karaciğer rahatsızlıklarının tedavi yöntemlerinde de kullanılabilir.

Örneğin, karaciğer rahatsızlıklarının gelişimini engelleyebilecek durumlar arasında non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH), non-alkolik steatohepatit ve safra yolu tıkanıklığı bulunmaktadır. Bu yüzden, fenofibratin sağlık problemlerinin tedavisinde ve hastalıkları iyileştirici yönde önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (Jin vd., 2023).

Bitkilerde genellikle bulunan ve bir karboksilik asit grubuna sahip olan kimyasal bileşiklere fenolik asitler denir. Fenolik bileşiklerin önemli bir alt dalından olan bitkiler, polifenoller olarak adlandırılan bir tür fitokimyasalı temsil ederler. Fenolik asitler; bitkilerin tohum, meyve kabuğu ya da sebze kabukları gibi değişik kısımlarında bulunabilir. Genellikle ester, amid ya da glikozitler gibi kimyasal bileşikler fenolik asitlerle bağlı veya serbest halde bulunabilirler. Bu bileşikler, antioksidan özelliklere sahiptir ve vücuttaki serbest radikallerle mücadele ederek hücresel tahribatı engellemeye yönelik yardımcı olabilirler. Ayrıca, sağlık için anti-inflamatuvar ve anti-kanser gibi farklı potansiyel etkileri de bulunmaktadır (Kumar ve Gonel, 2019).

Tez kapsamında; HepG-2 hücre hattı kullanılarak, oleik asit ile *in vitro* olarak oluşturulmuş non-alkolik karaciğer yağlanması modeli üzerinde çalışılmıştır. Oluşturulan yağlanma modelinde fenolik asitlerin etkisi incelenmiş ve toksik olmayan konsantrasyonlar belirlenmiştir. Yağlanma modeli oluşturulan HepG-2 hücre hattı mikroskop altında incelenerek fotoğraflanmıştır. Toksik olmayan konsantrasyonlar belirlendikten sonra, non-alkolik yağlı karaciğer modeline olan etkileri Annexin V-PI yöntemi ile ve sitokin seviyeleri de akış sitometride ölçülerek analiz edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Non- Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı

Non- Alkolik Yağlı Karaciğer (NAYK) hastalığı, karaciğerde fazla miktarda yağ birikmesi durumudur, ancak bu yağ birikimi alkol kullanımından kaynaklanmaz. Bu yüzden NAYK hastalığı olarak tanımlanmıştır (Gökcan, 2018). NAYK, son zamanlarda batı ülkelerinde sıklıkla karşılaşılan kronik karaciğer rahatsızlığıdır (Philip vd., 2021). NAYK artışı; obezite, tip 2 diyabet (T2DM) ve yaşlılıktan kaynaklanmaktadır (Maurice, 2018). Rahatsızlığın yetişkinlerde görülme sıklığı ise %25-30 civarında olup, tip 2 diyabeti olan hastalarda ise popülasyonun %70 gibi ciddi bir oranını etkilemektedir (Philip vd., 2021, Mantovani, 2021). NAYK tanısı ise; biyokimyasal testler ve radyolojik tetkikler sayesinde yapılabilmektedir (İdilman ve Karçaaltıncaba, 2014). Hastalığın tanısı yapıldıktan sonra tedavi edilmez ise süreç önce steatohepatite ardından siroza kadar ilerlemektedir. Siroza kadar geri dönüşümlü karaciğer seviyesinde iken siroza geldiğinde ise geri dönüşümsüz bir hal almaktadır (Arrese vd., 2016).

2.1.2. NAYK tarihçesi

NAYK ilk olarak 1836 yılında Thomas Addison tarafından tanımlanmıştır (Addison, 1836). Sonrasında patolog Rokitansky, otopsi raporlarında siroza yol açabilecek yağ fazlalığını fark etmiştir (Rokitansky, 1838). 1980 yılına kadar otopsilerde sıkça yağ fazlalığı rastlanmasından kaynaklı olarak Ludwig ve arkadaşları alkolsüz yağlı karaciğer rahatsızlığının daha ciddi belirtilere sahip evresi olan non-alkolik steatohepatit terimini kullanmışlardır (Ludwig vd., 1980). Keşfedilen bu terimden sonra ilk defa 1986 yılında “Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı” terimini Schaffner kullanmıştır (Schaffner, 1986). Bu terimin kullanılmasından sonra Amerikalı doktor Heribert Thaler hastalığın patogenezini tanımlamıştır (Thaler, 1988).

2.1.3. NAYK görülme sıklığı

NAYK hastalığının epidemiyolojisi bölgeler arasında değişiklik gösterse de 2020 yılında yapılan çalışmaya göre, hastalığın görülme sıklığının yetişkin nüfusunun en az %25’ini etkilediği görülmektedir. Bu oran yıllar geçtikçe yükselmektedir ve bu yükseliş de dünya genelinde NAYK’ın karaciğer rahatsızlıklarının önemli bir sağlık sorunu haline geldiğini göstermektedir (Younossi vd., 2023).



Görsel 2.1. NAYK görülme sıklığı (Younossi vd., 2023) (BioRender aracılığıyla oluşturulmuştur).

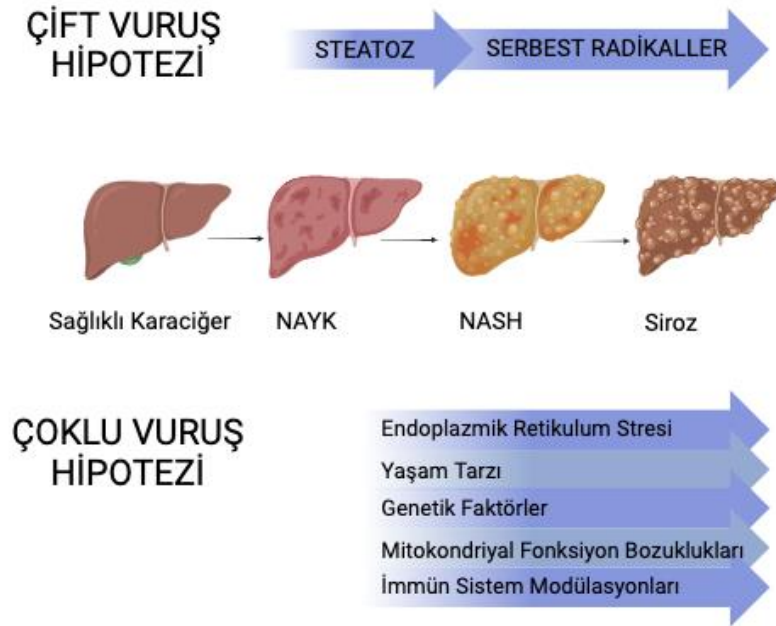
Türkiye’de ise artan obeziteyle birlikte, ki Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2021 yılında yayınladığı verilerde Avrupa’nın en yüksek obezite görülme sıklığının Türkiye’de olduğunu bildirmiştir. Bu durum da göz önünde bulundurularak Türkiye’de NAYK görülme sıklığının yetişkin nüfusunun %40-45’in üzerinde olduğu öngörülmüştür. Bu oran gözönüne alındığında Türkiye’nin NAYK görülme sıklığının en sık olduğu ülkelerden biri olduğu tahmin edilmektedir (Yılmaz, 2021).

2.1.4. NAYK nedenleri

NAYK nedenlerinde hem çevresel hem de genetik etkenler rol oynamaktadır, ancak bu hastalığa hangi faktörlerin neden olduğu hala net bir şekilde bilinmemektedir. NAYK hastalarının genelinde fazla kilo, sağlıksız yaşam temposu, dislipidemi ve insülin direnci en sık karşılaşılan problemlerler arasındadır. Bir çok faktör birleşerek NAYK oluşturduğu için, hastalık ortaya çıktığı andan itibaren bazı hipotezler kabul edilmiştir (Kneeman vd., 2012).

NAYK patogenezinde uzunca bir süre iki vuruş hipotezi kabul edilmiştir. İki vuruş hipotezinde, ilk vuruş steatozu simgeler. Steatoz, hepatositlerde trigliserit yığını olarak ifade edilmektedir. İlk vuruş sonrasında karaciğerde oksidatif stres, inflamasyon ve mitokondriyal fonksiyonel bozukluğu gibi bir takım değişiklikler meydana gelmektedir. Oksidatif stres (OS), vücutta bulunan serbest radikaller ile antioksidanların arasında meydana gelen çelişkinin bir sonucudur. Bu durum, hastalığın ilerlemesinde yağ

hücrelerinin zarar görmesi ve dolayısıyla da karaciğer iltihaplanmasının artışıyla bağlantılıdır. Mitokondriyal fonksiyonel bozukluğu ise hücrenin enerji üretimden sorumlu olan mitokondrinin görevlerini yapmaması durumudur. Bu durum, hücrelerin enerji üretimini etkilediği için hücreler normal görevlerini yapamaz hale gelir dolayısıyla bu da yağlı karaciğerin ilerlemesini artırmaktadır. Vücutta olan bu değişiklikler ikinci vuruşu desteklemekte ve karaciğeri savunmasız hale getirmektedir (Jarvis vd., 2020). Ancak son zamanlarda iki vuruş hipotezi NAYK’de oluşan biyolojik farklılıkları aydınlatmakta verimsiz ve zayıf kaldığından dolayı geçerliliğini kaybetmiştir. Bu durumdan dolayı artık uygun görülen hipotez çoklu vuruş hipotezi olmuştur. Çoklu vuruş hipotezi, kalıtsal olarak NAYK’i tetiklemek için aynı anda birden çok etkenin birlikte ve paralel hareket ettiği mekanizmaları içerdiğini savunan bir hipotezdir. Çoklu vuruş hipotezi; endoplazmik stres, yaşam tarzı ve genetik faktörler gibi birden çok etkenin olduğu ve bu etkenlerle artan serbest yağ asitlerinin (FFA) birikimine, kolesterol seviyesinin artışına ve en önemlisi insülin direncinin gelişmesine yol açar (Buzzetti vd., 2016).



Görsel 2.2. NAYK Patogenezi (Xu ve Hang, 2021) (BioRender aracılığıyla oluşturulmuştur).

2.1.5. NAYK tanısı

NAYK tanısı için; genellikle kan testleri, ultrasonografi, biyopsi, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi radyolojik testler uygulanmaktadır. Kan testlerinde, karaciğer parametreleri olan Alanin Aminotransferaz (ALT) ve Aspartat Aminotransferaza (AST) bakılmaktadır. ALT/AST değeri NAYK’de çoğunlukla 1’in

altındadır. ALT/AST değeri 1'in üstüne çıkması ise, NAYK hastalığının ilerlediğinin belirtisi olarak kabul edilmektedir (İdilman ve Karçaaltıncaba, 2014).

Radyolojik testlerde ise ultrasonografi; alkolsüz yağlı karaciğeri görüntüleme ölçüleri böbreğe oranla karaciğerin parlaklığını kapsar (Grant ve Lisker-Melman, 2004). Ultrasonografi yönteminin X-ışını gibi tehlikeli ışınları barındırmaması, kolay ulaşılabilir ve düşük maliyetli oluşu en önemli avantajlarından biridir ancak ultrasonografi yöntemi yağlanma oranını göstermediği için pek tercih edilmez. Bilgisayarlı tomografi yönteminde, kontrastsız tetkikler alkole bağlı olmayan yağlı karaciğerin tespiti için en uygun değerlendirme yöntemidir, ancak kontrastlı tetkiklerde de durum değişebilir (İdilman ve Karçaaltıncaba, 2014).

2.1.6. NAYK tedavisi

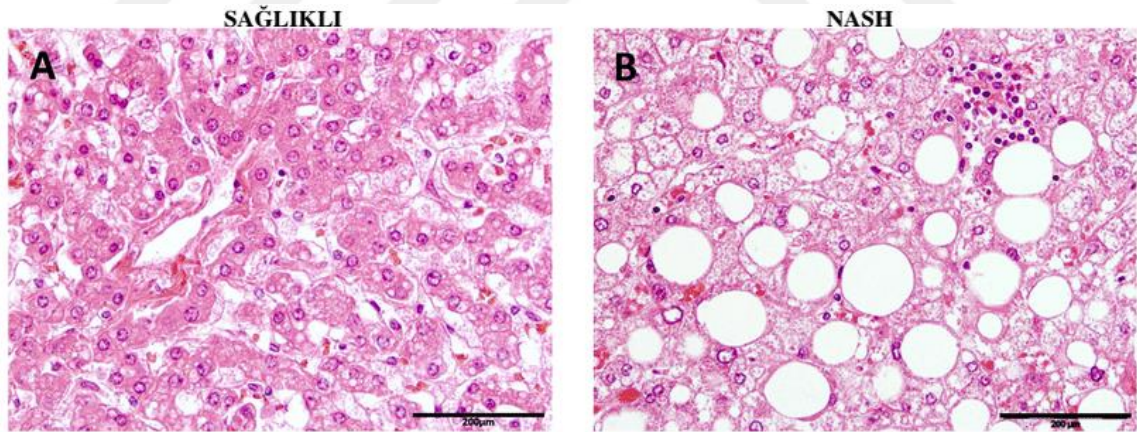
Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı, artan prevalansı sebebiyle önemli bir sağlık problemidir. Güncel derlemeler vasıtasıyla NAYK için modern iyileştirme yöntemleri hala araştırılmaktadır. Yapılan araştırmalarda henüz NAYK tedavisi için net bir yöntem bulunamamıştır. Tedavi seçenekleri hastalığı tamamen ortadan kaldıramazken belirti ve semptomları azaltmaya yöneliktir. Bu seçenekler arasında en çok kullanılan ve hastalığın belirtilerini azaltan yöntemlerin arasında Akdeniz diyeti ve yaşam tarzı değişiklikleri olduğu ortaya koyulmuştur. Ancak hastadan hastaya iyileşme süreci farklı olduğu için en iyi tedavi yöntemi daimi kilo kaybı olarak görülmüştür. Hastaların her birinde semptom farklı olduğu için farmakoterapi geliştirmesi hala büyük bir sorundur (Kosmali vd., 2023).

NAYK tedavisinin hedefi öncelikle; karaciğerde oluşan hastalığın ilerlemesini baskılamak ve hastalığı geriletmektir. Bu hedef doğrultusunda tedavi; yaşam tarzı değişiklikleri ve farmakolojik tedavilerdir. Yaşam tarzı değişikliklerinin başında kilo kaybı ve hastanın hareket aktivitesini artırması gelmektedir. Bu değişiklikler doğrultusunda hasta takip edilip tedaviye yanıtı gözlenmektedir. Ancak hastanın yaşam tarzı değişikliklerine rağmen hastalığı 6 ay içinde tedaviye yanıt vermez ise farmakolojik tedavi aşamasına geçilmektedir. Farmakolojik tedavi yönteminde NAYK hastalığının evresi de önemlidir. Hastalık, 2 veya daha fazla fibrozis evresindeyse farmakolojik tedavi aşamasına geçilmektedir. Ancak NAYK hastalığının kesinleşmiş bir farmakolojik tedavisi bulunmamaktadır. Günümüzde hala çalışması sürmekte olan bir çok farklı ilaç

bulunmaktadır. Bunlardan birkaçı Fibratlar ve Metformin gibi ilaçlar ve türevleridir (Yılmaz ve ark, 2021) (Lavine ve ark, 2011).

2.2. Non-alkolik steatohepatit

Non-alkolik steatohepatit (NASH); "steato" yağ anlamına gelirken, hepatit karaciğer enflamasyonunu ifade eder. NASH, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğerin ciddi bir alt çeşitidir (http-1). Çünkü, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı tedavi edilmediği süre boyunca her 7 senede bir evre ilerler. İlerleyen her evrede fibrozis arttığı için fibrozisle birlikte ölüm riski de artmaktadır (Gökcan ve Yılmaz, 2018). NASH'ın tüm dünya prevalansı %1-3 civarı olduğu belirtilmiştir (http-1). Her ne kadar istatistikler NASH prevalansının NAYK kadar yaygın olmadığını gösterse de alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer her 7 yılda bir ileri evreye geçtiği için NASH prevalansı da gün geçtikçe artmaktadır (Gökcan ve Yılmaz, 2018). Hastalığın patogenezinde yağlanmanın yanında inflamasyon ve beraberinde hepatositlerde balonlaşma görülmekle birlikte, fibrozis görülme sıklığı da alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığına oranla daha çok artmıştır (http-1).



Görsel 2.3. NASH Mikroskop Görüntüsü (Liang ve ark, 2014).

2.3. Siroz

Siroz kelimesi Yunancada koyu sarı renk anlamına gelir ve ilk defa 1826'da Laennec tarafından kullanılmıştır. Bu isimlendirme sirozlu karaciğer görüntüsünün koyu sarı renginde olmasından kaynaklanmaktadır (http-3). Siroz, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığının en ciddi şeklidir (Zhou ve ark, 2014). Hastalık; dünya genelinde

ölüm nedenleri arasında 11. sırada, karaciğer ile bağlantılı ölümlerin arasında ise ilk sıradadır (Asrani ve ark, 2018). Siroz 4 alt dalda sınıflandırılır;

Tablo 2.1. Siroz Sınıflandırılması

Morfolojik	Makronodüler
	Mikronodüler
	Mikst nodüler
Fonksiyonel	Aktif
	İnaktif
Klinik Evre	Kompanse
	Dekompanse
Etiyolojik	

Karaciğer sirozuna yol açan en önemli etken tıpkı NASH'daki gibi fibrozisdir. Hastalığın steatohepatitten farkı, fibrozisin geri dönüştürülemez bir şekilde ilerlemesinden kaynaklanmaktadır. (Zhou ve ark, 2014). Siroz asemptomatik durumdan semptomatik duruma geldiğinde belirtiler açığa çıkmaya başlamaktadır. Belirtileri NASH belirtileriyle aynı olduğu için bu ayrım tanıda altın standart olarak bilinen karaciğer biyopsisiyle anlaşılmaktadır (Bedossa ve Carrat, 2009). Tanı sonrasında ise fibrozis evresine bakılmakta, fibrozis evresi >4 ise karaciğer nakline başvurulmaktadır (http-1).

2.4. Sitokinler ve NAYK

Sitokinler; 10-40 kiloDalton (kDa) molekül kütlesi aralığında olan, yakınındaki hücre grubuna (parakrin), kendi hücre grubuna (otokrin) ve uzak mesafede bulunan hücre grubuna (endokrin) etki gösteren küçük proteinlerdir (Tilg, 2010). Bunların farklı çeşitlerde biyolojik özellikleri bulunmaktadır. Bu özellikler; membran yüzey proteinlerinin ifadesinin yukarıya doğru düzenlenmesi, hücre çoğalmasını uyarma ve engelleme, apoptoz ve inflamatuvar cevaplardır (Dinarello, 2011).

Sitokinler, genel olarak 3 gruba ayrılmaktadır: Pro-İnflamatuvar, Anti-İnflamatuvar sitokinler ve kemokinler (Dinarello, 2011).

Pro-inflamatuvar sitokinler; monositlerden ve makrofajlardan salınmaktadır. Bu sitokinlerden birkaçı tümör nekroz faktör- α (TNF- α), interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin 6

(IL-6)'dır. Bu sitokinler; inflamatuvar farklılıkların yapılaşmasında, immün cevabın oluşmasında görev almaktadırlar (Tsochatzis, 2009).

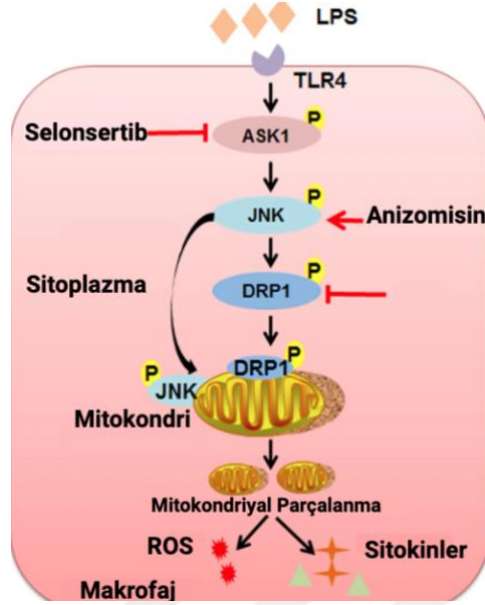
Anti-inflamatuvar sitokinler; pro-inflamatuvar sitokin cevabını denetleyen bağışıklığı düzenleyen moleküllerdir. Bunlardan birkaçı IL-4, IL-10, IL-13 sitokinleridir. Bu sitokinler bazı sitokinlerin oluşumunu ve immün cevap yanıtını engelleyebilirler.

Kemokinler, konakçı bağışıklık yanıtlarının aktifleşmesinde görev alırlar. Aynı zamanda bazı hastalıkların patogenezi için ve de dokularda iyileşme gibi birden çok biyolojik olayda önemlidirler. Kemokinlerin esas görevi, hücre migrasyonunu kontrol etmeleridir (Davenport, 2009).

Sitokinlerin birçok hastalıkta olduğu gibi NAYK hastalığıyla da ilişkili olduğu araştırmalarla ortaya konulmuştur (Tsochatzis ve ark, 2009). Özellikle IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sinyal moleküllerinin; insülin direnci, T2DM ile hipertrigliseridemiyle bağlantılı olduğu birçok farklı çalışma ile gösterilmiştir. Hatta yağlı karaciğer hastalığının NASH'a doğru ilerlemesinde TNF- α 'nın önemli bir etkisi olduğu düşünülmektedir (Valenti vd., 2002). Artmış TNF- α seviyelerinin insülin direnci ve aşırı kiloyla bağlantılı olduğuyla ilgili birçok farklı literatür bulunmaktadır (Nadir ile Oğuz, 2009). Ayrıca IL-10'un karaciğeri koruyucu özelliği vardır (Gao, 2005).

2.5. Apoptoz Sinyal Düzenleyici Kinaz 1 İnhibitörleri

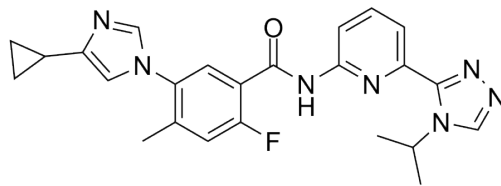
Mitojenle aktifleşen protein kinaz 5 (MAP3K5) olarak da tanımlanan apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 ilk defa Ichijo ve arkadaşları tarafından MAP kinaz ailesinin bir üyesi olarak sınıflandırılmıştır (Ichijo ve ark, 1997). Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz-1 yani ASK-1, MAPK grubu içinde bulunmaktadır. MAPK'lar gen ifadesi, hücre ölümü, hücre bölünmesi, proliferasyon ile bağlantılı işlemlerin denetlenmesindeki sinyal transdüksiyon yollarını oluşturmaktadırlar. Sitoplazmada yer alan bu proteinler, çekirdekten hücre zarına bilgi geçişinde önemli rol oynamaktadır (Obara ve ark, 2010). Sadece Selonsertib değil NQDI 1, TC ASK -10 gibi birçok ASK-1 inhibitörü olan ilaç bulunmaktadır (<http-5>).



Görsel 2.4. Selonsertib'in mitokondriyal hasara neden olduğu mekanizma (Lou ve ark, 2021). (BioRender aracılığıyla oluşturulmuştur).

2.5.1 Selonsertib

Selonsertib, (GS-4997) ASK-1 inhibitörüdür. Günümüzde ise alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı tedavisine yönelik ilaç araştırmalarında faz III aşamasındayken başarısız olmuştur (Chang vd., 2024). ASK-1 inhibitörü olan Selonsertib'in anti-inflamatuvar, anti-apoptotik ve anti-fibrotik aktiviteleri bulunmaktadır (Özkan ve Cantürk, 2023).



Şekil 2.1. Selonsertibin Kimyasal Yapısı (http-4).

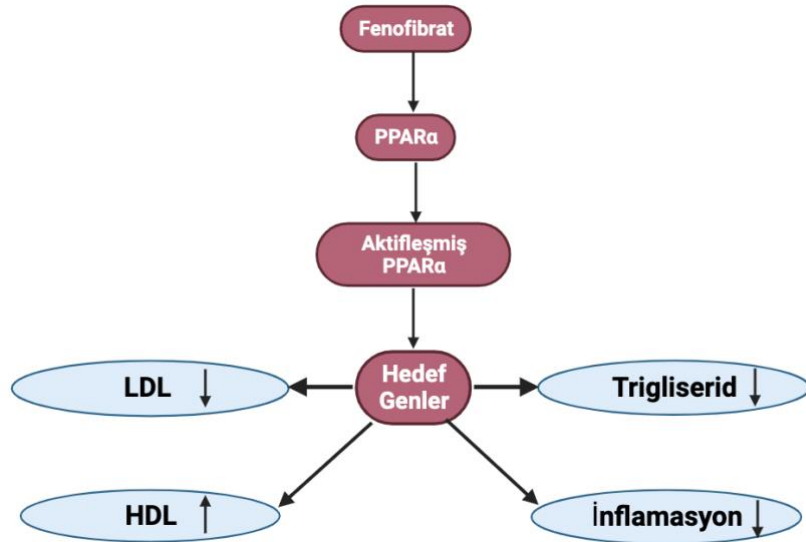
ASK-1, ER ve oksidatif stresle aktive edilmektedir. Özgü reseptörler, ASK-1'in katalitik kinaz bölgesine tutunarak, etkinleşmesini ve fosforilasyonunu inhibe etmesini sağlarlar. Bu durum c-Jun N-terminal kinazların (JNK'ler) ve p38 MAPK fosforilasyonunu engellemektedir. Selonsertib, ASK-1'e bağlı sinyal iletim yollarının aktive edilmesini engelleyerek, inflamatuvar sitokinlerin üretimini engellemekte, fibrozisde rol oynayan genlerin ifadelerini aşağı doğru düzenlemekte, programlanmış hücre

ölümünün aşırı olmasını engellemekte ve hücre çoğalmasını inhibe etmektedir (Özkan ve Cantürk, 2023).

2.6. Fenofibrat

Peroksisom proliferatörüyle aktiveleştirilen reseptör- α (PPAR- α) agonisti olarak da adlandırılan fenofibrat; apoptotik, anti-inflamatuvar, anti-oksidan, anti-fibrotik ve lipid düşürücü etkinliği olan fibrik asit türevi bir ilaçtır. İçerdiği özellikler nedeniyle alkolsüz yağlı karaciğer hastalığına yönelik kullanılan fenofibrat NAYK için Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylıdır (Jin vd., 2023) (<http-6>)

Fenofibratın anti-inflamatuvar reaksiyonları ve işleyişi hastalık çeşitlerine göre farklılık göstermektedir. İlaç, hastalıklarda anti-inflamatuvar reaksiyonlarını doğrudan veya dolaylı yolla göstermektedir. Karaciğer hastalıklarında; karaciğer X almaçlarının (LXR'ler), sterol düzenleyici element bağlayan proteinlerin (SREBP'ler) ve özgü genlerinin ifadelerini aşağıya doğru düzenlenmesini yukarıya doğru dönüştürmektedir böylelikle kolesterol yıkımına yardımcı olabilir. Bu durumda karaciğerde olan yağ oranını düşürebilir bu da NAYK tedavisine yönelik olabilir (Maxwell vd., 2003).



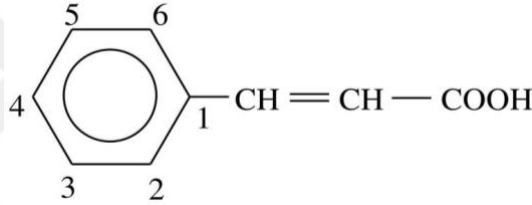
Görsel 2.5. Fenofibrat etki mekanizması (Goldenberg ve ark, 2008). (BioRender aracılığıyla yapılmıştır).

2.7. Fenolik Asitler

Genellikle bağılı formda bulunan fenolik asitler, bir karboksilik asit ve bir ya da daha fazla hidroksil grubu ile bir fenil halkası barındıran, flavanoid olmayan bileşiklerdir. Bu asitler, fenolik bileşiklerin türevleridir ve 2 ana gruba ayrılırlar (Onat vd., 2021). Bunlar; hidroksisinamik ve hidroksibenzoik asitlerdir.

2.7.1. Hidroksisinamik asitler

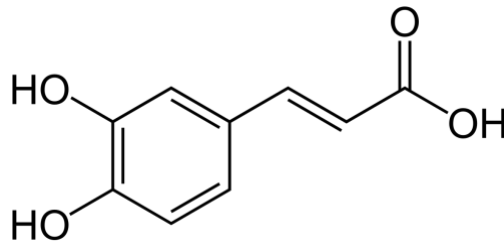
C6-C3 karbon yapısına sahip, 9 karbon atomu içeren, genellikle bağılı formda olan sinnamik asidin türevleridir. Kafeik asit, p-kumarik asit, sinnamik asit ve ferulik asit hidroksisinamik asit bu gruptandır (Kiokias ve Oreopoulou, 2021).



Şekil 2.2. Hidroksisinamik Asit Kimyasal Yapısı (<http-7>).

2.7.1.1. Kafeik asit

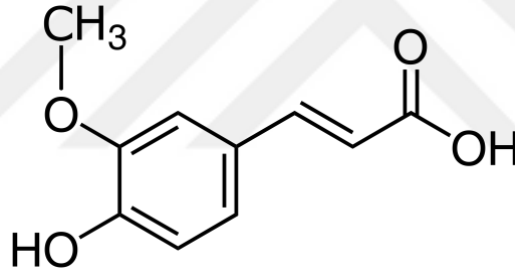
3,4-dihidroksisinnamik asit olarak da bilinen Kafeik asit (KA), organik bir bileşik ve kuvvetli bir anti-oksidandır. Bu asidin, inflamatuvar önleyici, immün sistem düzenleyici ve kanser önleyici gibi özellikleri bulunmaktadır (Colina vd., 2019). Yapısal olarak ferulik aside benzerliğiyle bilinen kafeik asit, kafeinden farklıdır. Genellikle meyvelerin çoğunda bulunan ve bundan dolayı da diyetlerde sıklıkla kullanılan bir maddedir. Meyve dışında; adaçayı, kahve, çay, kekik, nane ve Seylap tarçını gibi bitkilerde de kafeik asit bulunmaktadır (Choi vd., 2017).



Şekil 2.3. Kafeik Asit Kimyasal Yapısı (<http-8>).

2.7.1.2. Ferulik asit

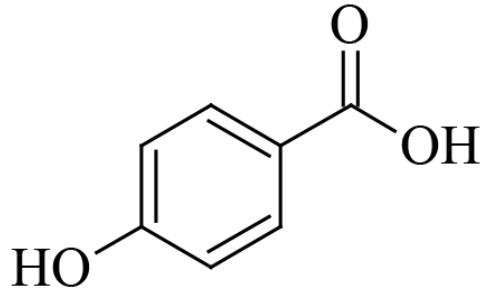
3-metoksi, 4-hidroksi sinnamik asit olarak da bilinen Ferulik asit (FA), ismi devasa rezene anlamında olan Ferula cinsinden türetilmektedir (<http-9>). Polisakkaritlerin ve ligninin çapraz bağlanması hücre çeperinin sert hale gelmesini sağlamaktadır. Tahıl, yulaf, buğday ve pirinç gibi bitkilerin ve de bazı meyve sebzelerin ana bileşiği arasında bulunmaktadır. Ferulik asit içeren bitkilerin tüketimi ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarda T2DM'i, kanseri, obeziteyi, kalp ve damar rahatsızlıklarını önlediği görülmektedir. Böylelikle ferulik asit; anti-diyabetik, anti-inflamatuvar ve anti-hipertansif özellikleri nedeniyle son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır (Alam, 2019). Ayrıca 2022 yılında yapılan bir çalışmada sıçanlarda *in vitro* ortamda NAYK modeli oluşturulmuş ve ardından FA verilmiştir. Çalışma sonunda gözlemlenen sıçanlarda NAYK patogenezinde ortaya çıkan oksidatif stres azalmış ve lipid peroksidasyonunu iyileştirdiği öne sürülmüştür (Li vd., 2022).



Şekil 2.4. Ferulik Asit Kimyasal Yapısı (<http-9>).

2.7.2. Hidroksibenzoik asitler

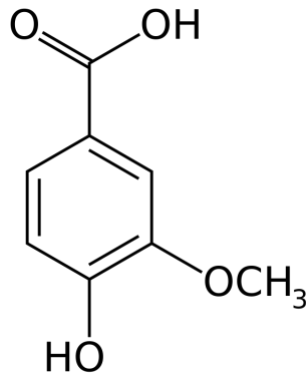
C6-C1 karbon yapısına sahip, 7 karbon atomu içeren, az miktarda bitkisel gıdaların yapısında bulunan ve benzoik asitten türetilen bileşiklerdir. En çok bilinen hidroksibenzoik asit, asetilsalisilik asit diğer adıyla aspirindir. Ellajik asit, vanilik asit ve gallik asit hidroksibenzoik asit gruplarındandır (Kiokias ve Oreopoulou, 2021).



Şekil 2.5. Hidroksibenzoik Asit Kimyasal Yapısı ([http-10](#)).

2.7.2.1. Vanilik asit

4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit olarak da bilinen Vanilik asit (VA), vanilinin oksitlenmiş şeklidir. Hoş ve kremsi kokusundan dolayı tatlandırıcı olarak kullanılan VA dihidroksibenzoik asit türevidir (Sharma ve ark, 2020). Genellikle vanilya bitkisi, biber, kakao, yaban mersini, badem ve ahudududa bulunmaktadır. En çok bulunduğu bitki ise Çin'e özel bir bitki olan *Angelica sinensis*'dir (Kim ve ark, 2010). VA'nın anti-oksidan, anti-inflamatuvar, antimikrobiyal ve anti-apoptotik özellikleri bulunmaktadır. Anti-inflamatuvar özelliği sayesinde oksidatif stresi azalttığı yönünde çalışmalar da bulunmaktadır (Taqvi vd., 2021).



Şekil 2.6. Vanilik Asit Kimyasal Yapısı ([http-11](#)).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

HERAcell 240 Steril CO ₂ inkübatörü	Thermo Scientific, ABD
Hava akım kabini	Heal Force, Çin
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Eppendorf, Almanya
Cedex XS Hücre sayıcı	Innovatis, ABD
Derin dondurucu buzdolabı	Altus, Türkiye
Hassas terazi	Ohaus, Avustralya
Inverted mikroskop	Leica, Almanya
Otoklav	Alp, Türkiye
Otomatik pipet	Eppendorf, Almanya
Sterilizatör	Nüve, Türkiye
Su banyosu	Nüve, Türkiye
Vorteks	Daihan, Güney Kore
Mikro Santrifüj	Hettrich, Almanya
Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader	Bio-Tek, Almanya
Akış sitometri cihazı	BD Accuri™C6, Amerika

3.1.2. Kullanılan laboratuvar malzemeleri ve kimyasallar

10, 100, 1000 ve 5000 µL'lik pipetör	Eppendorf, Kanada
10, 100, 200, 1000 µL'lik mikropipet ucu	Greiner Bio-One, ABD
12 kanallı otomatik pipet	Axygen, İngiltere
15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya

İzoterm mikroskop lamaları	SentezLab, Türkiye
Lamel	Isolab, Almanya
75 cm ³ Flask	Thermo Scientific, ABD
25 cm ³ Flask	Thermo Scientific, ABD
2 mL'lik Ependorf tüp	Greiner bio-one, ABD
5 ve 10 mL'lik cam pipet	Isoterm, Türkiye
96 kuyucuklu düz tabanlı plaka	Isolab, Almanya
12 ve 24 kuyucuklu plaka	Jet Biofil, Çin
6 kuyucuklu plaka	Nest, Çin
Penisilin/Streptomisin (PS)	Biological Industries, İsrail
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma – Aldrich, Almanya
DMEM Medium	Gibco Thermo Scientific, ABD
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma – Aldrich, Almanya
Cedex Smart Slide	Roche, Almanya
Parafilm	Pechiney, Fransa
Şarjlı pipetör	Starlab, Almanya
Tripsin-EDTA 10X (TE)	Pan Biotech, Almanya
Tripan-Blue	Roche, Almanya
Kriyotüp (2 mL)	Cyros, Türkiye
Hücre kazıyıcı	Greiner Bio-One, ABD
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Invitrogen, Almanya
Yağ Kırmızısı O	Sigma – Aldrich, Almanya
Ferulik asit	Selleckchem, Amerika

Kafeik asit	Sigma – Aldrich, Almanya
Vanilik asit	Sigma – Aldrich, Almanya
Selonsertib	Selleckchem, Amerika
Fenofibrat	Sigma – Aldrich, Almanya
İzopropanol	Sigma – Aldrich, Almanya
Oleik Asit	Ataman Kimya, Türkiye

3.1.3. Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu

Deneylerde kullanılacak olan şişe, falkon, rezervuar ve hücre kazıyıcı gibi malzemelerin sterilizasyonu için malzemeler alüminyum folyoyla sarılarak otoklava konmuş, 121°C’de 1.5 atm basınç altında 15 dakika boyunca sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.1.4. Kullanılan kimyasal ve boyaların hazırlanışı

3.1.4.1. DMEM besiyeri

Hazırlanmak istenilen besiyeri miktarının %10’u FBS, %1’i PS içeren DMEM besiyeri içerisine eklenerek steril koşullarda hazırlanmıştır. Kullanılmayan sürede +4°C’de saklanmıştır.

3.1.4.2. 0.5 mM oleik asit

0.1 gram oleik asit tartılıp 2 mL izopropanolde çözülmüştür. Hazırlanan bu çözelti 177 mM konsantrasyonda ana stok olarak kullanılmıştır. Ana stok içerisinden 141 µL alınmış ve 50 mL’ye tamamlanarak 0.5 mM oleik asit hazırlanmıştır.

3.1.4.3. Ferulik asit

1 mg ferulik asit tartılıp 2 mL DMSO’da çözülmüştür. Hazırlanan 2.5 mM çözelti ana stok olarak kullanılmıştır. Ana stok içerisinden 200 µL alınıp 50 mL’ye tamamlandığında 10 µM ferulik asit hazırlanmıştır.

3.1.4.4. Kafeik asit

1 mg kafeik asit tartılıp 2 mL DMSO'da çözülmüştür. Hazırlanan 2.77 mM çözelti ana stok olarak kullanılmıştır. Ana stok içerisinde 180 µL alınıp 50 mL'ye tamamlandığında 10 µM kafeik asit hazırlanmıştır.

3.1.4.5. Vanilik asit

1 mg vanilik asit tartılıp 2 mL DMSO'da çözülmüştür. Hazırlanan 2.97 mM çözelti ana stok olarak kullanılmıştır. Ana stok içerisinde 168 µL alınıp 50 mL'ye tamamlandığında 10 µM vanilik asit hazırlanmıştır.

3.1.4.6. Selonsertib

1 mg selonsertib tartılıp 2 mL DMSO'da çözülmüştür. Hazırlanan 1.12 mM çözelti ana stok olarak kullanılmıştır. Ana stok içerisinde 446 µL alınıp 50 mL'ye tamamlandığında 10 µM selonsertib hazırlanmıştır.

3.1.4.7. Fenofibrat

1 mg fenofibrat tartılıp 2 mL DMSO'da çözülmüştür. Hazırlanan 1.38 mM çözelti ana stok olarak kullanılmıştır. Ana stok içerisinde 362 µL alınıp 50 mL'ye tamamlandığında 10 µM fenofibrat hazırlanmıştır.

3.1.4.8. %35'lik Yağ kırmızısı O (Oil red O)

35 mg toz ORO boyası tartılıp 10 mL saf %60'lık izopropanol içerisinde çözülmüştür. 0,22 µm şırınga ucu filtre kullanılarak filtreden geçirilmiştir. Bu solüsyon hücreleri boyamadan önce (3:2) ddH₂O kullanılarak seyreltilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre hattının stoktan çıkarılması

Deneylerde kullanılan HepG-2 hücre hattı -80 °C’de muhafaza edilmektedir. Kullanılacak hücre hattının -80°C’den çıkarıldıktan sonra hızlı bir şekilde çözülmesi gerekmektedir. Çözünen hücre hattı 10 katı besiyeri içeren falkona aktarılıp, 1250 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj bitiminde süpernatant atılıp falkonun dibinde olan pellete taze medium eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Pipetajın ardından uygun flaska hücreler aktarılmıştır. Hücrelerin süspanse halden adhere haline gelebilmesi için 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır.

3.2.2. HepG-2 hücre hattının çoğaltılması

NAYK modeli oluşturmak için kullanılacak olan insan karaciğer hücre hattı olan HepG-2 (ATCC kodu: HB-8065) hücre hattı kullanılmıştır. HepG-2 hücreleri, %10 FBS ve %1 PS içeren DMEM besiyeri ortamında 25 cm³’lük flasklar kullanılarak 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücrelerin flaskın yüzeyini kaplamasına göre yoğunluk oranı %70-80’i geçtiğinde hücrelerin eski besiyeri çekilmiştir. Besiyeri uzaklaştırılan hücreler 5 mL PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi bitiminde adhere hücrelerin flasktan kaldırılması için 500 µL Tripsin-EDTA eklenmiştir ve 3 dakika boyunca 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır. 3 dakikanın sonunda mikroskop altında hücrelerin durumuna bakılmıştır. Adhere hücrelerin süspanse hale geldiği mikroskop altında gözlenmiştir. Tripsin-EDTA etkisini nötralize etmek için flaska 5 mL DMEM mediumu eklenmiş sonrasında pipetaj yapılmıştır. Besiyeri ilave edilen flaskdaki süspanse hücreler serolojik pipet yardımıyla falkona aktarılmıştır. Falkon, 1250 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj bitiminde süpernatant uzaklaştırılmış çöken hücre pelletine taze besiyeri ilave edilmiş ve pipetaj yapılmıştır. Pipetaj sonrasında hücreler 75 cm³’lük flaska aktarılmıştır.

3.2.3. Hücrelerin stoklanması

Hücreler flaskın yüzeyini tek tabaka halinde tamamen kapladığında hücreler sonraki deneylerde kullanılmak amacıyla stoklanmıştır. Stok işlemini gerçekleştirmek için; pasajlama işleminde yapıldığı gibi önce flaskdaki eski besiyeri serolojik pipetle

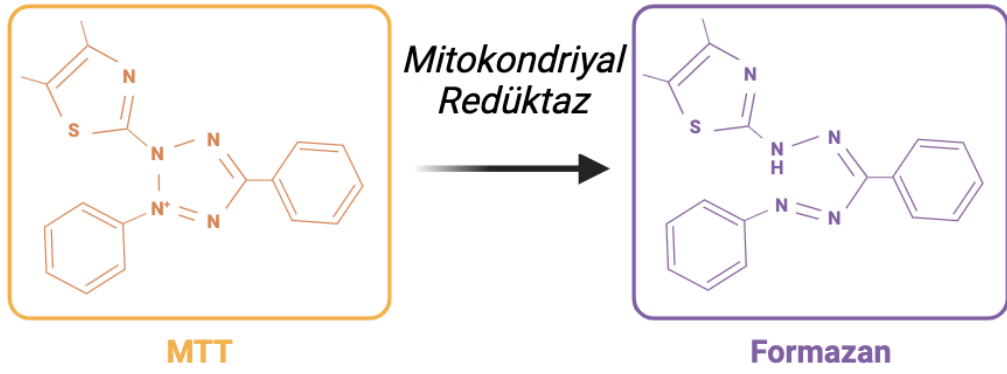
uzaklaştırılmış sonrasında yıkama işlemi için PBS eklenmiştir. Yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra adhere hücreler Tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılmıştır. Süspanse hücre haline gelen hücreler santrifüj yardımıyla çöktürülmüştür. Çöken hücrelerden süpernatant uzaklaştırılmış pellete 650 µL taze besiyeri 650 µL FBS 130 µL'de DMSO eklenip hücreler kriyotüpe aktarılmıştır. Kriyotüp Mr. Frosty™ Freezing kutusunda -20°C'de 4 saat bekletilip, daha sonra -80°C'deki dondurucuda stoklanmıştır.

3.2.4. Hücrelerin sayımı

Hücreler 75 cm³'lük flasklarda yeterli yoğunluğa ulaştığında deneylerde hücrelerin kullanılması için hücre sayım işlemi yapılmıştır. Hücre sayımını gerçekleştirmek için ilk önce flaskdaki eski besiyeri serolojik pipetle uzaklaştırılmış sonrasında yıkama işlemi için 5 mL PBS eklenmiştir. PBS ile yıkanan flaska 1 mL Tripsin-EDTA eklenmiştir. Flask 3 dakika inkübatörde bekletilmiştir. İnkübatör ortamından alınan flaska 5 mL besiyeri eklenmiş ve falkona aktarılmıştır. Santrifüj olan falkondaki süpernatant pelletten uzaklaştırılmış 1 mL taze DMEM besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Pipetajın ardından lamel üzerine 10 µL Tripan-Blue çözeltisi ve üzerine hücre pelletinden de 10 µL konulmuştur. Lamel üzerinde pipetaj yapılmış ve 10 µL Cedex Smart Slide'a aktarılmıştır. Hücreler Cedex XS cihazında sayılmıştır.

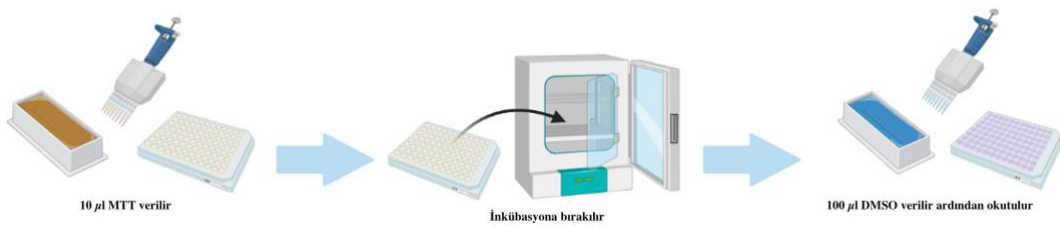
3.2.5. MTT yöntemiyle sitotoksitenin belirlenmesi

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür] testi hücrelerin metabolik canlılıklarını ölçmede kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir. Sarı tetrazolyum tuzu, canlı hücrelerin salgıladığı mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından mor formazan kristallerine indirgenir. Mor renkli suda çözilemeyen formazan kristallerini çözebilmek için DMSO kullanılır. MTT uygulanan plaka kuyucukları canlı hücrelerden oluşuyorsa metabolik aktivite yüksek, plaka kuyucuklarının rengi de mordur. Ancak kuyucuklar ölü hücrelerden oluşuyorsa, ölü hücreler mitokondriyal dehidrogenaz enzimi salgılamadığı için metabolik aktivite düşük, plaka kuyucuklarının rengi de açık sarı olarak kalır. Ölçüm plaka okuyucuda 540-570 nanometre aralığında yapılır (Gavanji ve ark, 2023, Erkekoğlu ve ark, 2021, Plumb, 2004).



Görsel 3.1. MTT boyasının kimyasal yapısı (BioRender aracılığıyla yapılmıştır.)

MTT yöntemiyle, fenolik asitlerin, selonsertibin ve fenofibratin NAYK modeli oluşturmada önce sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla, HepG-2 hücreleri DMEM besiyerinde çoğaltılmıştır. Hücreler flask yoğunluğunda %70-80 doluluğa ulaştığında 96 kuyucuklu plakaya her bir kuyucuğunda 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekim yapılmış 96 kuyucuklu plakadaki hücrelerin yapışması için 24 saat boyunca 37°C sıcaklıkta, %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Kuyucuklardan eski besiyerleri çekilip kuyucuklara, taze besiyeri içerisinde 0.5 mM oleik asit verilmiştir. Oleik asidin hücrelerin içerisine girebilmesi için tekrar 24 saatlik inkübasyona bırakılmış, inverted mikroskopla yağlanma modelinin oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir. 24 saatin sonrasında eski besiyeri çekilmiştir. Ardından uygulanacak olan madde konsantrasyonlarının dilüsyonları hazırlanmış ve her bir kuyucuğa istenilen madde konsantrasyonları verilmiştir. Madde konsantrasyonları verilmiş plaka tekrardan 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi bitiminde ışısız ortamda MTT boyası kuyucuklara 10 μl olacak şekilde dağıtılmıştır. MTT boyası dağıtılan plakalar 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 3 saatin ardından etüvden çıkarılan plakadan besiyerleri uzaklaştırılmış, plakanın kuyucuklarına 100 μl DMSO eklenmiştir. DMSO eklenmiş plakalar, Cytation 3 Hücre Görüntüleme ve Çok Modlu Okuyucu cihazında 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Sitotoksik etki yapmayan fenolik asitler ve maddelerin konsantrasyonları belirlenmiştir.



Görsel 3.2. MTT Aşamaları (BioRender aracılığıyla yapılmıştır.)

3.2.6. HepG-2 hücreleriyle NAYK modeli oluşturma

Oleik asit, bitkisel ve hayvansal yağlarda doğal olarak bulunan yağ asididir. Tekli omega 9 yağ asidi olarak sınıflandırılan oleik asit, zeytinyağının trigliserit esterlerinde büyük çoğunlukla bulunur. NAYK modeli oluştururken steatozu indüklemesi için oleik asit kullanılır. Bunun nedeni ise; kişilerin beslenme tercihlerindeki farklılıklarla birlikte, fazla karbonhidrat kullanımı hepatositlerin enerji metabolizmasında olumsuz değişikliklere neden olur ve bu durumun sonucunda da yağ asitlerinin üretiminde artış olur. Bu sebepten, uygun bir hücresel model oluştururken çoğunlukla yağ asitleri indükleyici olarak kullanılır (Zhang vd., 2023).

HepG-2 hücreleri, %10 FBS, %1 PS oranında olacak şekilde DMEM besiyeri ortamında hazırlanmıştır. Bu aşamadan sonraki deneylere, HepG-2 hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermeyen ferulik asit, vanilik asit, fenofibrat ve selonsertible devam edilmiştir. Tez kapsamında *in vitro* ortamda HepG-2 hücreleriyle NAYK modeli oluşturmak için 6 grup deney konfigürasyonu tasarlanmıştır.

- (1) Sağlıklı HepG-2
- (2) NAYK Grubu (HepG-2 + 0.5 mM Oleik Asit)
- (3) Fenofibrat Grubu (HepG-2 + 0.5 mM Oleik Asit +10 µM Fenofibrat)
- (4) Selonsertib Grubu (HepG-2 + 0.5 mM Oleik Asit +10 µM Selonsertib)
- (5) Ferulik Asit (HepG-2 + 0.5 mM Oleik Asit +10 µM Ferulik Asit)
- (6) Vanilik Asit (HepG-2 + 0.5 mM Oleik Asit +10 µM Ferulik Asit)

3.2.7. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin yağ kırmızısı O ile boyanması

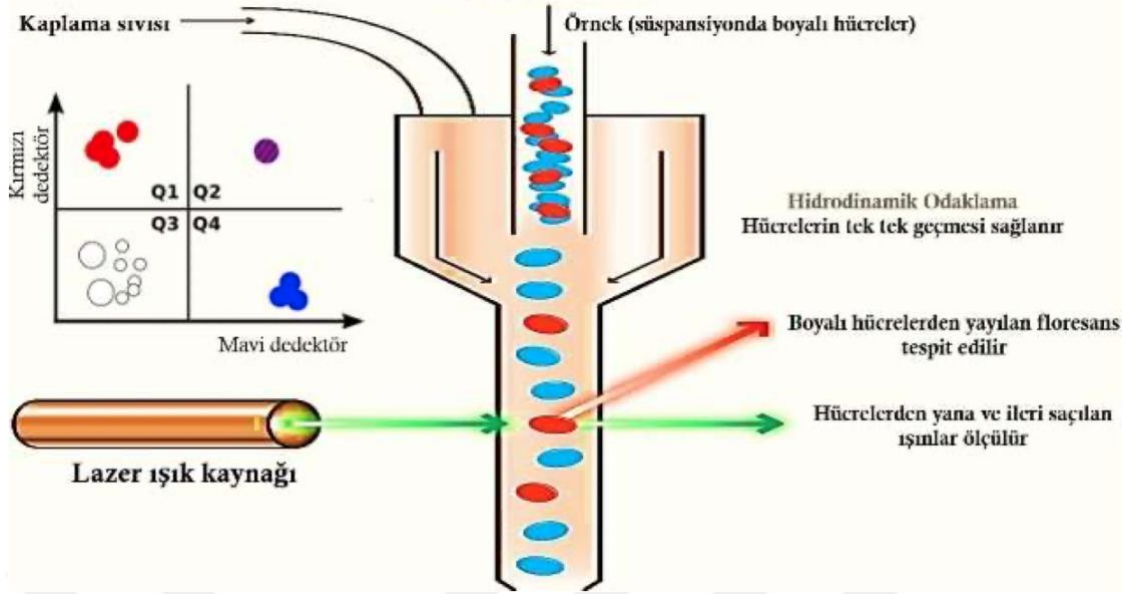
Oil Red O (ORO), nötr lipitleri, kolesterol esterleri ve lipoproteinleri boyamak için kullanılan yağda çözünen bir boyadır (Bharati ve ark, 2022, Ramirez vd.,1997). Hücre içi lipit boyama ve doku kesiti boyama için sıklıkla kullanılmıştır, hücresel geçirgenliği nedeniyle, nötr yağlar, özellikle trigliseridler, kırmızı bir renk tonu ile boyanabilir (Mehlem ve ark, 2013). Bu boya yağ damlacıklarının görüntülenebilmesi için en önemli ayıraçtır (Kinkel vd., 2005).

HepG-2 hücrelerinin yağ kırmızısı O ile boyanması deneyinde öncelikle HepG-2 hücreleri 6 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.

Ekim yapıldıktan sonra hücrelerin adhere hale gelebilmesi için 24 saat boyunca 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Süre tamamlandıktan sonra hücrelere 0.5 mM oleik asit verilip inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi biten yağlı hücrelere istenilen konsantrasyonlarda maddeler verilmiştir. Tekrar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücreler PBS ile yıkanmıştır. Ardından fiksasyon amacıyla %4'lük paraformaldehit eklenmiş ve oda sıcaklığında 30-45 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda ddH₂O ile iki kez yıkanmıştır. Hücreler 5 dakika boyunca %60'luk izopropanol ile muamele edilmiştir. Hazırlanan Yağ Kırmızısı O stok çözeltisi 3:2 oranında ddH₂O ile seyreltilmiştir. Seyreltilen Yağ Kırmızısı O solüsyonu 2 defa 0.22 µm milipor filtre yardımıyla filtreden geçirilmiştir. Hücreler boya ile 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Boya eklenen kuyucuklar 2 kez ddH₂O ile yıkandıktan sonra inverted mikroskobu yardımıyla boyanan kuyucuklar gözlenmiştir.

3.2.8. NAYK modelinin akış sitometride Annexin V-PI yöntemiyle apoptotik etkisinin belirlenmesi

Akış sitometri cihazı, hücreler ölçüm cihazı yardımıyla süspanse halde süzülürken, hücrelerin boyut ve tanecikliği gibi birçok fiziksel özelliğini aynı anda ölçebilen bir cihazdır. Çalışması yapılan hücrelerin yüzeyinde bulunan hücre dışındaki molekülleri veya hücre içindeki molekülleri hedef alan boyalardan türetilen ışık saçılma özelliklerine bağlıdır. Görünür ışık saçılımı iki farklı tarafta ölçülür, hücrenin nispi boyutunu gösterebilen ileri dağılım veya FSC ile hücrenin iç karmaşıklığını veya ayrıntı düzeyini gösteren yan saçılım veya SSC'dir (Han vd., 2014)(Leipold vd., 2015).



Görsel 3.3. Akış sitometri çalışma prensibi (Kanev ile Muranlı, 2016).

Apoptoz, hücre ölümünün normal gelişime bağlı olarak ya da bir hücre hasarı sonucu ortaya çıkan ve genetik olarak kontrol edilen bir süreçtir. Akış sitometri ile apoptotik hücre ölçümü yapılabilmektedir. Bunun için Annexin V-PI yöntemi kullanılmıştır (Hu vd., 2019). Normal hücrelerin, sitoplazmaya bakan tarafında fosfatidilserini (PS) eksprese ettikleri için doğada hidrofobik olduğu ve hücreler apoptoza girdiğinde, iç zarın dış membran haline geldiği ve böylece fosfatidilserini açığa çıkardığı temel mekanizmasına dayanır. Açıkta kalan fosfatidilserin, Annexin V tarafından saptanır ve propidyum iyodür (PI), apoptotik ve nekrotik hücreleri ayırt etmeye yardımcı olan DNA içeriğine sahip nekrotik hücreleri boyar (Lakshmanan ile Batra, 2013).

Bu tez çalışmasında NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin akış sitometride apoptotik etkilerinin belirlenebilmesi için, 6 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 1×10^5 /mL hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra hücrelerin adhere hale gelebilmesi için 24 saat boyunca 37°C sıcaklıkta %5 CO_2 'lü etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra hücelere 0.5 mM oleik asit verilip inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi biten yağlı hücelere toksik olmayan konsantrasyonlarda maddeler verilmiştir. Tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde plaka kuyucuklarındaki medium falkona aktarılmıştır. Her kuyucuk 500 μL PBS ile yıkanmıştır. 500 μL PBS ile yıkanırken süspanse hale gelen hücreler besiyeri olan falkonlara aktarılmıştır. Her kuyucuğun falkonu 1250 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj bitiminde süpernatant

dökülmüştür. Sonrasında falkonlara PBS eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Ependorfun bir tarafına 5 µL Annexin diğer tarafına ise µL PI konulmuştur. Pipetaj yapılmış olan falkondan 200 µl hücre süspansiyonu alınmış sonrasında Annexin-PI konulan ependorfa aktarılmıştır. Ependorf 25-30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir. Ardından üzerine Annexin Binding Buffer 5X'den, 1X'e dilüye edilerek, örneklerin üzerine 200 µl eklenmiş ve akış sitometri cihazında okutulmuştur.

3.2.9. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin akış sitometride interlekin-1β düzeylerinin belirlenmesi

İnterlökin-1 (IL-1) sitokin ailesi, 11 farklı gen tarafından kodlanan 11 farklı proteini içerir. Bu ailenin bir üyesi olan İnterlökin-1β (IL-1β), inflamasyon ve yaralanmaya karşı savunma reaksiyonlarında kritik bir rol oynayan etkili bir pro-inflamatuar sitokindir. IL-1β, karaciğer hastalığının her aşamasında önemli bir işleve sahiptir. Karaciğer hücrelerinde sıklıkla bulunan IL-1 reseptörüne sinyal ileterek, karaciğer steatozu, inflamasyon ve fibrozisin teşvik edilmesine katkıda bulunur. IL-1β ayrıca, primer karaciğer hepatositlerinde trigliseritlerin ve kolesterolün birikimini uyarak hepatik steatozu oluşumunu teşvik eder. Bu bulgular, IL-1β'nin karaciğer hastalıklarının patogeneğinde önemli bir faktör olduğunu ve karaciğer sağlığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Tan vd., 2016) (Negrin vd., 2014).

Bu tez çalışmasında NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin akış sitometride IL-1β düzeylerinin belirlenebilmesi için, 6 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 1×10^5 /mL hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra hücrelerin adhere hale gelebilmesi için 24 saat boyunca 37°C sıcaklıkta %5 CO₂'lü etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra hücrelere 0.5 mM oleik asit verilip inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi biten yağlı hücrelere toksik olmayan konsantrasyonlarda maddeler verilmiştir. Tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda plaka kuyucuklarındaki medium falkona aktarılmıştır. Her kuyucuk 500 µl PBS ile yıkanmıştır. 500 µl PBS ile yıkanırken süspanse hale gelen hücreler besiyeri olan falkonlara aktarılmıştır. Her kuyucuğun falkonu 1250 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj bitiminde süpernatant dökülmüştür. Sonrasında falkonlara PBS eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Falkona 200 µl Cytoperm/Cytofix solüsyonu eklenmiş ardından buzda 30 dakika boyunca bekletilmiştir.

Süre sonunda falkonlar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant dökülmüş 250 µl Perm Wash eklenmiştir. Tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant dökülmüş üzerine 250 µl PBS eklenmiştir. Ardından ependorflara 5 µL IL-1β konulmuş üzerine falkondaki hücreler eklenmiştir. 20 dakika karanlıkta bekletilmiş örnekler akış sitometri cihazında okutulmuştur.

3.2.10. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin akış sitometride interlökin-6, interlökin-10 ve tümör nekroz faktör-α düzeylerinin belirlenmesi

Interlökin 6 (IL-6), inflamasyonlara ve doku hasarına yanıt olarak üretilen bir pro-inflamatuar sitokin olarak bilinmektedir (Tanaka vd., 2014). Bu sitokin, pro-inflamatuar aktivasyon geçirmiş makrofajlar tarafından sentezlenir ve inflammatuar tepkilerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Zhang ile An, 2007). NASH gelişiminde, IL-6'nın hepatosit hasarı ve karaciğer fibrozisini artırdığı bulunmuştur. Bu bulgular, IL-6'nın inflammatuar süreçlerde kritik bir rol oynadığını ve karaciğer hastalıklarının patogeneğinde önemli bir faktör olduğunu göstermektedir (Duan vd., 2022).

Bağıışıklık sisteminin önemli bir baskılayıcısı olan interlökin 10 (IL-10), antiinflamatuvar bir sitokindir ve aynı zamanda insan sitokin sentezi inhibitör faktörü olarak da bilinir. IL-10, farklı hücreler tarafından salgılanır ve birincil hücresel kaynağı doku veya enfeksiyon aşamasına bağlı olarak değişebilir (Rafaqat vd., 2024). NAYK hastalarında pro-inflamatuar sitokin olan TNF-α artış gösterirken bir sorun olarak görülen ise IL-10 sitokininde NAYK ilerledikçe azalış gözlemlenmiştir. Yapılan araştırmalarda TNF-α artışı, IL-10 sentezini inhibe ettiği yönündedir (Zahran vd., 2013).

Tümör Nekroz Faktör-α (TNF-α) öncelerde tümör hücrelerinin nekrozuna sebep olan bir etken olarak tanımlanırdı. Ancak, son yıllarda oto-immün rahatsızlıkların patolojik bir unsurunu da temsil ettiği belirlenmiştir (Jang vd., 2021). TNF-α, NASH hastalığının gelişim sürecinde önemli bir rol oynamaktadır (Wellen ve Hotamisligil, 2003). Bu sitokin, hepatik inflamasyonun, karaciğer hücrelerinin hasarının ve oksidatif stresin öncüsüdür. Bu bulgular, TNF-α'nın NASH patogeneindeki kritik rolünü vurgulamakta ve karaciğer hastalıklarının anlaşılmasında önemli bir faktör olduğunu göstermektedir (Seo vd., 2013).

NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin akış sitometride IL-6 IL-10 ve TNF-α belirlenebilmesi için, 6 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 1×10^5 /mL hücre olacak

şekilde ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra hücrelerin adhere hale gelebilmesi için 24 saat boyunca 37°C sıcaklıkta %5 CO₂'lü etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra hücrelere 0.5 mM oleik asit verilip inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi biten yağlı hücrelere istenilen konsantrasyonlarda maddeler verilmiştir. Tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde plaka kuyucuklarındaki medium falkona aktarılmıştır. Her kuyucuk 500 µl PBS ile yıkanmıştır. 500 µl PBS ile yıkanırken süspanse hale gelen hücreler besiyeri olan falkonlara aktarılmıştır. Her kuyucuğun falkonu 1250 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj bitiminde süpernatant dökülmüştür. Sonrasında falkonlara PBS eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. IL-6, IL-10 ve TNF için ayrı ependorflar alınmış her ependorfa ilgili 5µL sitokinler eklenmiştir. Ependorfların üzerine falkonlarda bulunan hücreler aktarılmış 20 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından akış sitometri cihazında okutulmuştur.

3.2.11. Sitotoksosite yöntemlerinin istatistiksel analizi

İstatistiksel analizler ve grafik oluşturma süreci, araştırma verilerinin anlamlı bir şekilde değerlendirilmesini sağlamak için GraphPad Prism 9.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, hücre topluluklarının % canlılık değerleri, en yüksek seviyede referans alınarak grafiklendirilmiştir. Elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirmesi için tek yönlü ANOVA testi uygulanmış ve sonrasında Tukey testi ile detaylı bir analiz gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel değerlendirme sonuçları şu şekilde yorumlanmıştır: $p > 0.5$ ise fark yok, $p < 0.05$ (*) ise fark var, $p < 0.01$ (**) ise anlamlı fark var, $p < 0.001$ (***) ise çok önemli fark var, ve $p < 0.0001$ (****) ise son derece önemli bir fark olduğu kabul edilmiştir.

3.2.12. Etik bildirim

Tez kapsamında yapılan deneyler *in vitro* ortamda gerçekleştiği için bu çalışmada, etik bildirim yapılmasını gerektiren özel bir durum bulunmamaktadır.

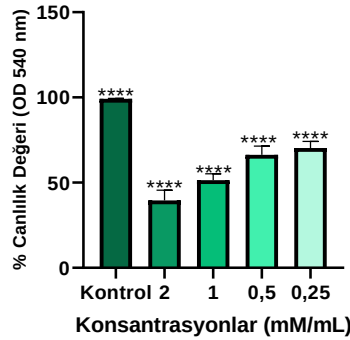
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. MTT Yöntemi

4.1.1. Oleik asit'in MTT yöntemiyle sitotoksitesinin belirlenmesi

NAYK modeli oluşturulmak için kullanılacak oleik asidin HepG-2 hücrelerindeki etkilerini anlamak üzere gerçekleştirilen MTT deneyi, araştırmanın önemli aşamalarından biridir. Bu deneyde, hücre canlılığını belirlemek için Eliza cihazı kullanılarak 540 nanometre dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Deney, beş ayrı tekrarla gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler Microsoft Office Excel programıyla % olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu, %100 canlılık seviyesi olarak belirlenmiş ve diğer konsantrasyonlar, bu referans seviyesine ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, GraphPad Prism 9.0 yazılımı kullanılarak istatistiksel analizlere tabi tutulmuş ve grafikler oluşturulmuştur. Bu süreç, oleik asit'in hücreler üzerindeki etkilerini anlamak ve potansiyel terapötik kullanımını değerlendirmek ve toksik olmayan konsantrasyonu belirlemek için gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1'de, HepG-2 hücre hattı üzerinde, oleik asidin 0.25, 0.5, 1 ve 2 mM/mL konsantrasyon gruplarına ait % canlılık grafikleri gösterilmektedir.

Oleik Asit'in HepG-2 Hücre Hattı Üzerine Etkisi



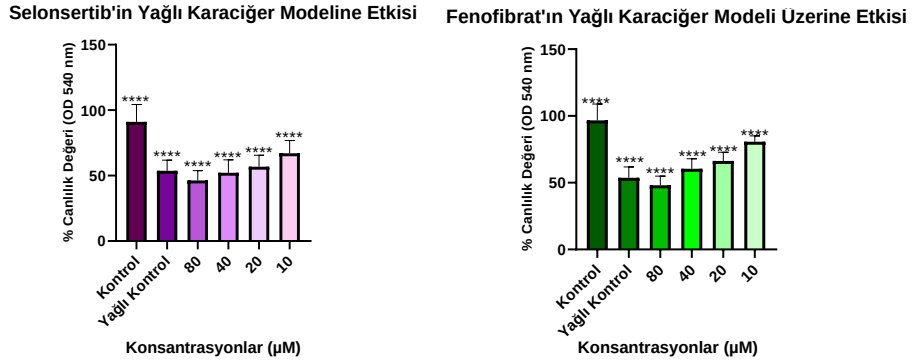
Şekil 4.1. Oleik asidin HepG-2 hücre hattı üzerine % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (**** $p < 0.0001$).

Cui ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, oleik asidin HepG-2 hücre hattı üzerindeki etkileri incelenmiş ve deney sonuçları bizim bulgularımızla paralellik göstermiştir. Araştırmada, 1, 0.5 ve 0.25 mM konsantrasyonlarındaki oleik asidin HepG-2 hücre hattını inhibe etmediği tespit edilmiştir (Cui et al., 2010). Bu bulgular, oleik asidin

belirtilen konsantrasyonlarda hücre canlılığını olumsuz etkilemediğini ve hepatik hücre modellerinde toksik olmadığını ortaya koymaktadır. Çalışmamızda elde edilen benzer sonuçlar, oleik asidin güvenli kullanımını desteklemekte ve bu yağ asidinin biyomedikal uygulamalarda potansiyelini göstermektedir.

4.1.2. Selonsertib ve Fenofibrat'ın NAYK modeli için sitotoksitesinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi

MTT deneyi, Selonsertib ve Fenofibrat'ın NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerindeki etkilerini anlamak amacıyla gerçekleştirilmiş, hücre canlılığını belirlemek için Elisa cihazıyla 540 nanometre dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Deney beş ayrı tekrarla yapılmış ve elde edilen veriler Microsoft Office Excel programıyla % olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu, %100 canlılık seviyesi olarak belirlenmiş ve farklı konsantrasyonlar, bu referans seviyesine ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, GraphPad Prism 9.0 yazılımı kullanılarak istatistiksel analizlere tabi tutulmuş ve grafikler oluşturulmuştur. Şekil 4.2'de, HepG-2 hücre hattı üzerinde, Selonsertib ve Fenofibrat'ın 10, 20, 40 ve 80 µM/mL konsantrasyon gruplarına ait % canlılık grafikleri sunulmuştur.



Şekil 4.2. Selonsertib ve Fenofibrat'ın konsantrasyonlarının HepG-2 hücre hattı üzerindeki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (****p<0.0001).

Tablo 4.1. *Selonsertib ve Selonsertib'in IC₅₀ değeri.*

Madde	IC ₅₀ Değeri
Selonsertib	47 µM/mL
Fenofibrat	70 µM/mL

MTT yöntemi kullanılarak yapılan deneylerde, Selonsertib'in NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattı üzerinde 10-80 µM/mL konsantrasyon aralığında belirgin sonuçlar elde edilmiştir. Bu bulgular, azalan konsantrasyonlarda hücre canlılığının arttığını göstermektedir. Selonsertibin HepG-2 hücre hattı üzerindeki toksik olmayan konsantrasyonu 47 µM/mL olarak bulunmuştur. İstatistiksel anlamlılık değerleri, yağlı kontrol grubuna göre hesaplanmış ve bu sonuçlar dikkate alınarak yorumlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, Selonsertib'in hücre canlılık değerlerini araştıran Yoon ve arkadaşları, Selonsertib'in 50 µM/ml konsantrasyonundan itibaren daha yüksek dozlarda hücre canlılığını önemli ölçüde inhibe ettiğini tespit etmişlerdir (Yoon et al., 2020). Bu bulgular, Selonsertib'in hücrelerde sitotoksik etki gösterebileceğini ve bu etkinin konsantrasyona bağlı olduğunu ortaya koymaktadır. Bizim çalışmalarımızda da MTT yöntemi kullanılarak yapılan deneyler, Yoon ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumluluk göstermektedir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre, Selonsertib'in 47 µM/ml konsantrasyonunda ve üzerinde hücre canlılığını belirgin şekilde azalttığını doğrulamaktadır. Bu sonuçlar, Selonsertib'in hepatik hücre hatlarında belirli konsantrasyonlarda sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermekte ve Yoon ve arkadaşlarının çalışmasını desteklemektedir.

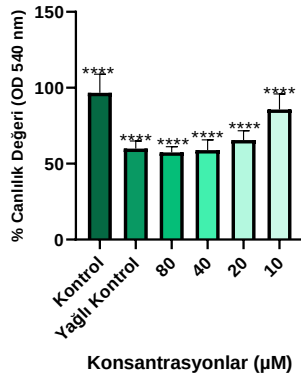
Fenofibrat'ın NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Fenofibrat konsantrasyonları, NAYK modeli üzerinde 40 ila 10 µM aralığında etkilidir ve bu etki azalan konsantrasyonlarda hücre canlılığının arttığını göstermektedir. Fenofibratın HepG-2 hücre hattı üzerindeki toksik olmayan konsantrasyonu 70 µM/mL olarak bulunmuştur. İstatistiksel anlamlılık değerleri, yağlı kontrol grubuna göre hesaplanmış ve bu sonuçlar dikkate alınarak yorumlanmıştır. Fenofibrat konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, Hep3B, HepG-2 ve HSC-3 hücre hatları üzerinde yapılan deneyler sonucunda, 75 µM

konsantrasyondaki Fenofibrat'ın toksik olmadığı belirlenmiştir. You ve arkadaşlarının 2019 yılında gerçekleştirdiği bu çalışma, bu hücre hatlarında Fenofibrat'ın güvenli konsantrasyonunu ortaya koymuştur (You et al., 2019). Bu bulgular, bizim deneylerimizde elde ettiğimiz sonuçlarla uyumluluk göstermektedir. Bizim çalışmalarımızda da, Fenofibrat'ın belirli konsantrasyonlarda hücre canlılığını olumsuz etkilemediği ve bu hücre hatlarında toksik olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum, Fenofibrat'ın hepatik hücre modellerinde güvenli bir şekilde kullanılabileceğini ve bu bulgunun literatürdeki diğer çalışmalarla da desteklendiğini göstermektedir. Sonuç olarak, You ve arkadaşlarının çalışması, literatürde Fenofibrat'ın güvenli dozlarını belirleyen önemli bir referans noktası olup, bu çalışma ile elde ettiğimiz bulgular arasındaki uyumluluk, yaptığımız araştırmaların güvenilirliğini artırmakta ve literatür bilgisiyle örtüşmektedir.

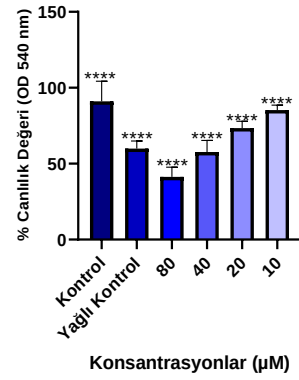
4.1.3. Fenolik asitlerin NAYK modeli için sitotoksitesinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi

Bu tez kapsamında, fenolik asitlerden, kafeik asit, ellajik asit, ferulik asit ve vanilik asit ile, NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Her bir fenolik asit 4 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır. Deneylerde, hücre canlılığının belirlenmesi için Eliza cihazı kullanılarak 540 nanometre dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Her bir deney, beş ayrı tekrarla gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler, Microsoft Office Excel programıyla yüzde olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu, %100 canlılık seviyesi olarak belirlenmiş ve farklı konsantrasyonlar, bu referans seviyesine ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, GraphPad Prism 9.0 yazılımı kullanılarak istatistiksel analizlere tabi tutulmuş ve grafikler oluşturulmuştur.

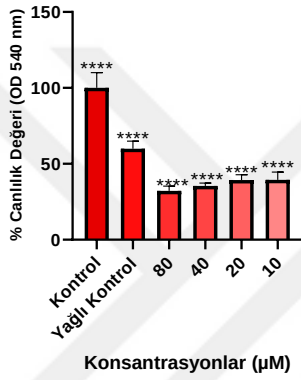
Ferulik Asit'in Yağlı Karaciğer Modeli Üzerine Etkisi



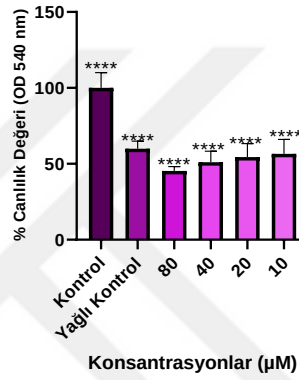
Vanilik Asit'in Yağlı Karaciğer Modeli Üzerine Etkisi



Ellajik Asit'in Yağlı Karaciğer Modeli Üzerine Etkisi



Kafeik Asit'in Yağlı Karaciğer Modeli Üzerine Etkisi



Şekil 4.3. Fenolik asit konsantrasyonlarının HepG-2 hücre hattı üzerindeki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (****p<0.0001)

Tablo 4.2. Fenolik asitlerin IC₅₀ değeri.

Madde	IC ₅₀ Değeri (µM/mL)
Ferulik Asit	77 µM
Vanilik Asit	53 µM
Ellajik Asit	7 µM
Kafeik Asit	50 µM

MTT yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde, fenolik asitlerin NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu analizde, farklı fenolik asit türlerinin, yani ferulik asit, vanilik asit, ellajik asit ve kafeik asit gibi, çeşitli konsantrasyonları test edilmiştir. Örneğin, ferulik asit konsantrasyonları, NAYK modeli üzerinde 20 ila 10 µM aralığında etkilidir ve bu etki, azalan konsantrasyonlarda

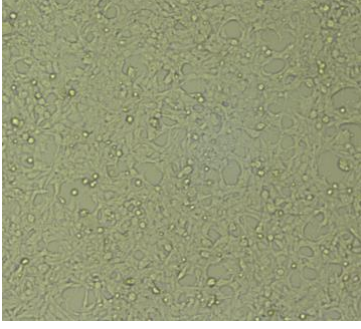
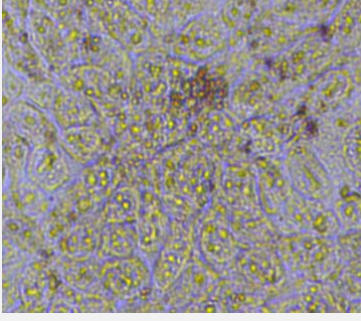
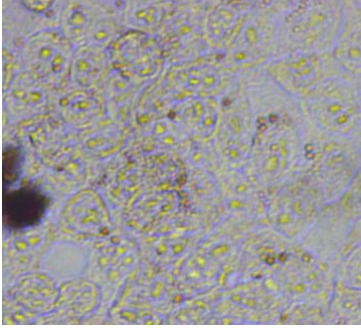
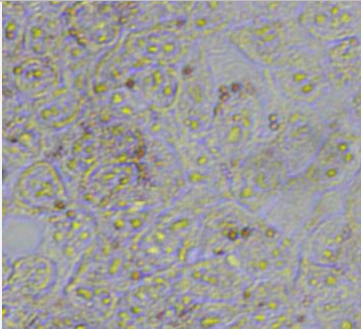
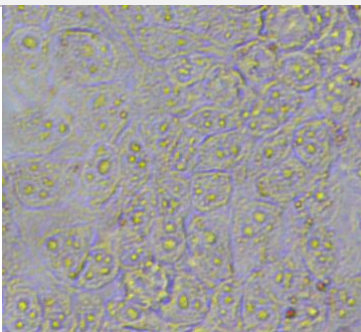
hücre canlılığının arttığını göstermektedir. Benzer şekilde, vanilik asit konsantrasyonları NAYK modeli üzerinde 40 ila 10 μM aralığında etkilidir. Ellajik asit konsantrasyonları ise foldukça düşük bir IC_{50} değerine sahiptir; ellajik asit diğer fenolik asitlere göre toksik etki göstermiştir. Kafeik asit konsantrasyonları ise NAYK modeli üzerinde 20 ila 10 μM aralığında etkilidir ve bu etki azalan konsantrasyonlarda hücre canlılığının arttığını göstermektedir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilmiş ve yağlı kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir.

Önceki literatür çalışmalarında Ferulik asit'in hücre canlılık testi MTT yöntemiyle incelenmiştir. Bu çalışmada, Ferulik asit'in toksik olmayan konsantrasyonu 70 μM olarak belirlenmiştir (Nile et al., 2016). Bu bulgu, HepG-2 hücrelerinde elde ettiğimiz sonuçlarla uyumluluk göstermektedir. Vanilik asit ile ilgili literatür taramasında, farklı hücre hatlarında hücre canlılık değerleri değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre, Vanilik asit'in toksik olmayan konsantrasyonu 45 μM olarak bulunmuştur (Alhadid et al., 2022). Hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla yapılan başka bir çalışmada, Ellajik asit HepG-2 hücre hattına uygulanmış ve 24 saat sonrasında MTT yöntemiyle elde edilen sonuçlarda Ellajik asit'in IC_{50} değeri 7.3 μM olarak belirlenmiştir. Bu değer, tez kapsamında elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir (Wang et al., 2023). Nile ve arkadaşlarının Kafeik asit ile yapılan hücre canlılığı deneylerinde, toksik olmayan Kafeik asit konsantrasyonu 65 μM olarak bulunmuştur. Bu literatür çalışmaları, tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerle genel olarak benzer sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu kapsamda, literatürdeki bulguların tez çalışmamızın bulgularıyla örtüşmesi, yapılan deneylerin ve elde edilen sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini desteklemektedir.

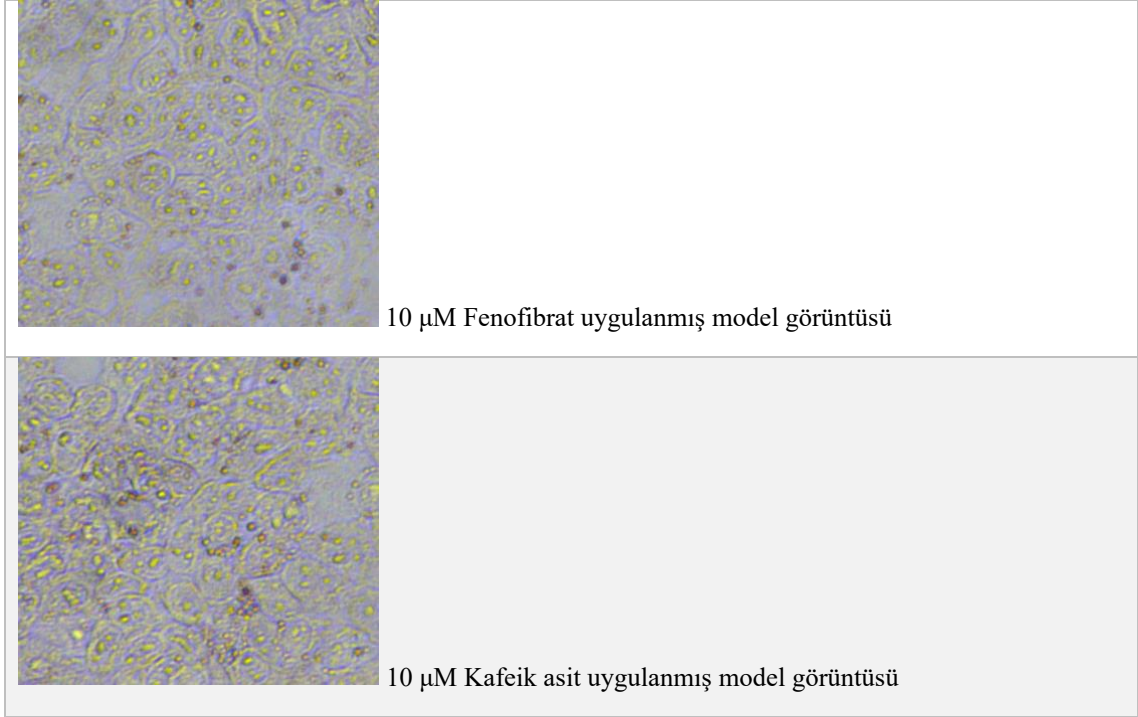
4.2. NAYK modeli oluşturulan hücrelerin yağ kırmızı O ile boyanması

Hücre içindeki yağ damlacıklarının gözlenmesi genellikle yağlanma modellerinde belirgin bir gösterge olarak kabul edilir. Bu bağlamda, Yağ Kırmızısı O boyası, NAYK modeli oluşturulan HepG-2 hücre hattı üzerinde uygulanmış ve hücrelerdeki yağların belirlenmesinde kullanılmıştır. Tablo 4.3'de x40 inverted mikroskop görüntüleri sunulmuştur.

Tablo 4.3. Model oluşturulmuş HepG-2 hücre hattının farklı ortamlarda boyanma görüntüleri. X40

	HepG-2 görüntüsü (Kontrol)
	Yağlı model görüntüsü (Oleik asit Kontrol)
	10 µM Selonsertib uygulanmış model görüntüsü
	10 µM Vanilik asit uygulanmış model görüntüsü
	10 µM Ferulik asit uygulanmış model görüntüsü

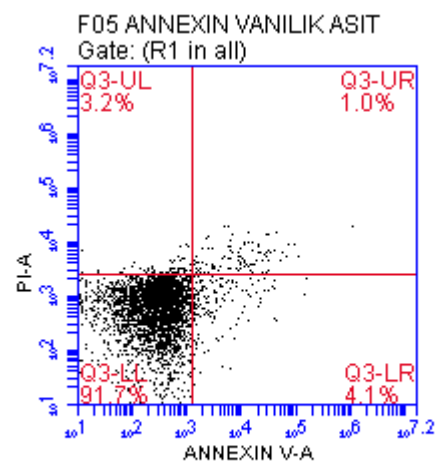
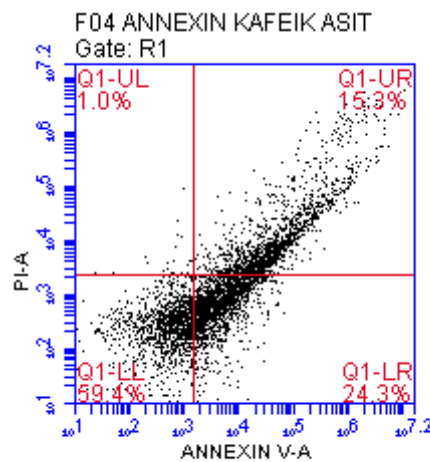
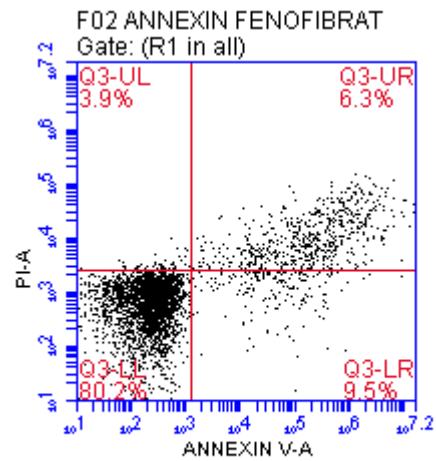
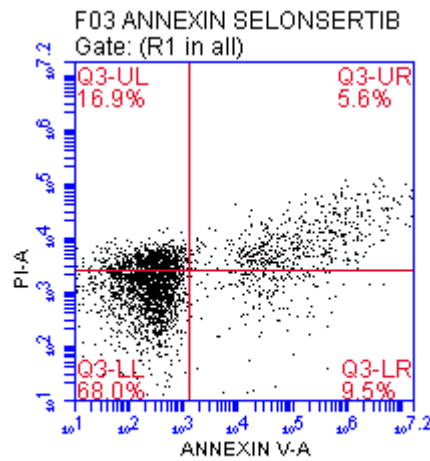
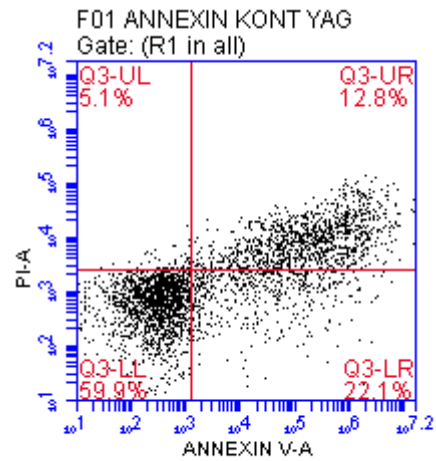
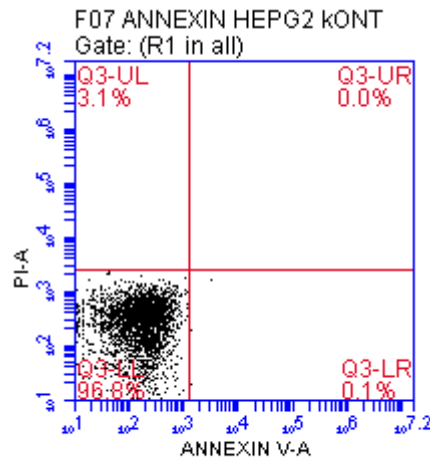
Tablo 4.3.(Devam) Model oluşturulmuş HepG-2 hücre hattının farklı ortamlarda boyanma görüntüleri.
X40

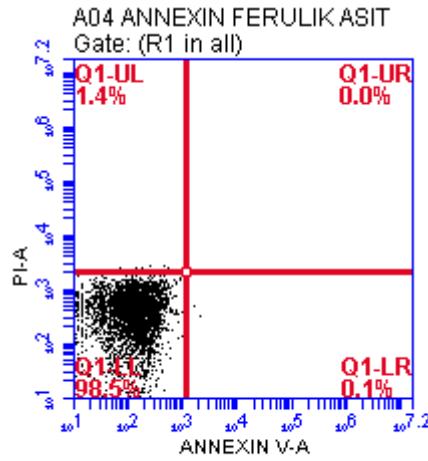


4.3. Akış Sitometri Yöntemi

4.3.1.NAYK modelinin akış sitometride Annexin V-PI yöntemiyle apoptotik etkisinin belirlenmesi sonuçları

NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin akış sitometride apoptotik etkilerinin belirlenebilmesi için, 6 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra hücrelerin adhere hale gelebilmesi için 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra hücrelere 0.5 mM oleik asit verilip tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi biten yağlı hücrelere toksik olmayan IC_{50} değerindeki konsantrasyonlarda maddeler verilmiştir. Madde verilmiş plakalar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda Annexin V Apoptosis Detection Kit protokolü uygulanmıştır. Elde edilen örnekler, akış sitometri cihazında analiz edilmiştir. Sonuçlar; Şekil 4.4 ve Tablo 4.4 de ayrıntılı olarak verilmiştir.





Şekil 4.4. NAYK Modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki apoptotik etkisinin akış sitometride değerlendirilmesi

Tablo 4.4. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki apoptotik etkinin belirlenmesi.

Maddeler	% Canlı	%Nekrotik	%Erken Apoptotik	% Geç Apoptotik
HepG-2 Kontrol	96.8	3.1	0.1	0.0
Yağ Kontrol	59.9	5.1	22.1	12.8
Fenofibrat	80.2	3.9	9.5	6.3
Selonsertib	68.0	16.9	9.5	5.6
Ferulik Asit	98.5	1.4	0.1	0.0
Kafeik Asit	59.4	1	24.3	15.3
Vanilik Asit	91.7	3.2	4.1	1.0

Annexin V-PI yöntemi ile elde edilen sonuçlarda HepG-2 kontrolünün canlı hücreleri % 96.8, nekrotik hücreleri %3.1, erken apoptotik hücreleri %0.1, geç apoptotik hücreleri ise %0.0 olarak belirlenmiştir.

NAYK modeli oluşturulmuş oleik asit kontrolünde canlı hücreler %59.9, nekrotik hücreler %5.1, erken apoptotik hücreler %22.1, geç apoptotik hücreler ise %12.8 olarak belirlenmiştir.

NAYK modeline Fenofibrat eklendiğinde canlı hücreler %80.2, nekrotik hücreler %3.9, erken apoptotik hücreler %9.5, geç apoptotik hücreler ise %6.3 olarak belirlenmiştir.

NAYK modeline Vanilik asit eklendiğinde canlı hücreler %91.7, nekrotik hücreler %3.2, erken apoptotik hücreler %4.1, geç apoptotik hücreler ise %1.0 olarak belirlenmiştir.

NAYK modeline Selonsertib eklendiğinde canlı hücreler %68.0, nekrotik hücreler %16.9, erken apoptotik hücreler %9.5, geç apoptotik hücreler ise %5.6 olarak belirlenmiştir.

NAYK modeline Ferulik asit eklendiğinde canlı hücreler %98.5, nekrotik hücreler %1.4, erken apoptotik hücreler %0.1, geç apoptotik hücreler ise %0.0 olarak belirlenmiştir.

HepG-2 hücrelerinde apoptotik etkilerin akış sitometri cihazı ile incelendiği literatür çalışmalarında; Fenofibrat'ın karaciğer modeli üzerinde apoptozu engellediği You ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (You et al., 2019). Vanilik asit'in ise oksidatif stresi azaltarak apoptozu düşürdüğü Yao ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (Yao et al., 2020). Selonsertib'in tez çalışmaları başlamadan önce NAYKH hastalığı için Faz III aşamasında olduğu ve hastalığı hafifleteceği öngörülmekteydi (Loomba et al., 2018). Ancak, tez çalışmasında paralel olarak elde edilen sonuçlar, Faz III aşamasındaki çalışmalarının hastalığın etkilerini yeteri kadar iyileştiremeyeceğini ortaya koyunca, sonlandırıldığı rapor edilmiştir (Chang et al., 2024). Ferulik asit ile sıçanlarda yapılan bir çalışmada apoptotik etkileri engellediği gösterilmiştir ve bu sonuçlar tez kapsamında elde edilen bulgularla paralel olarak çıkmıştır (Lou et al., 2022).

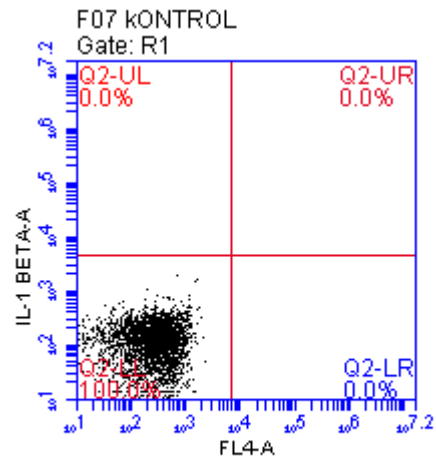
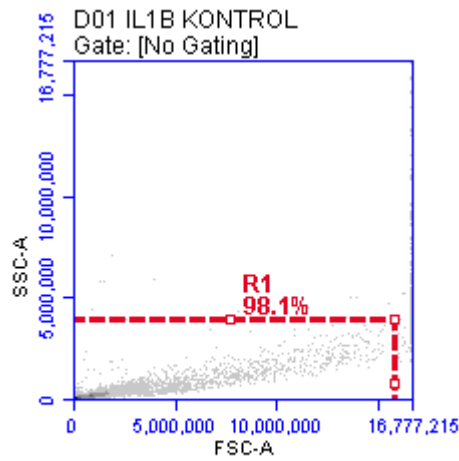
4.3.2. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin akış sitometride interleükin-1β düzeylerinin değerlendirilmesi

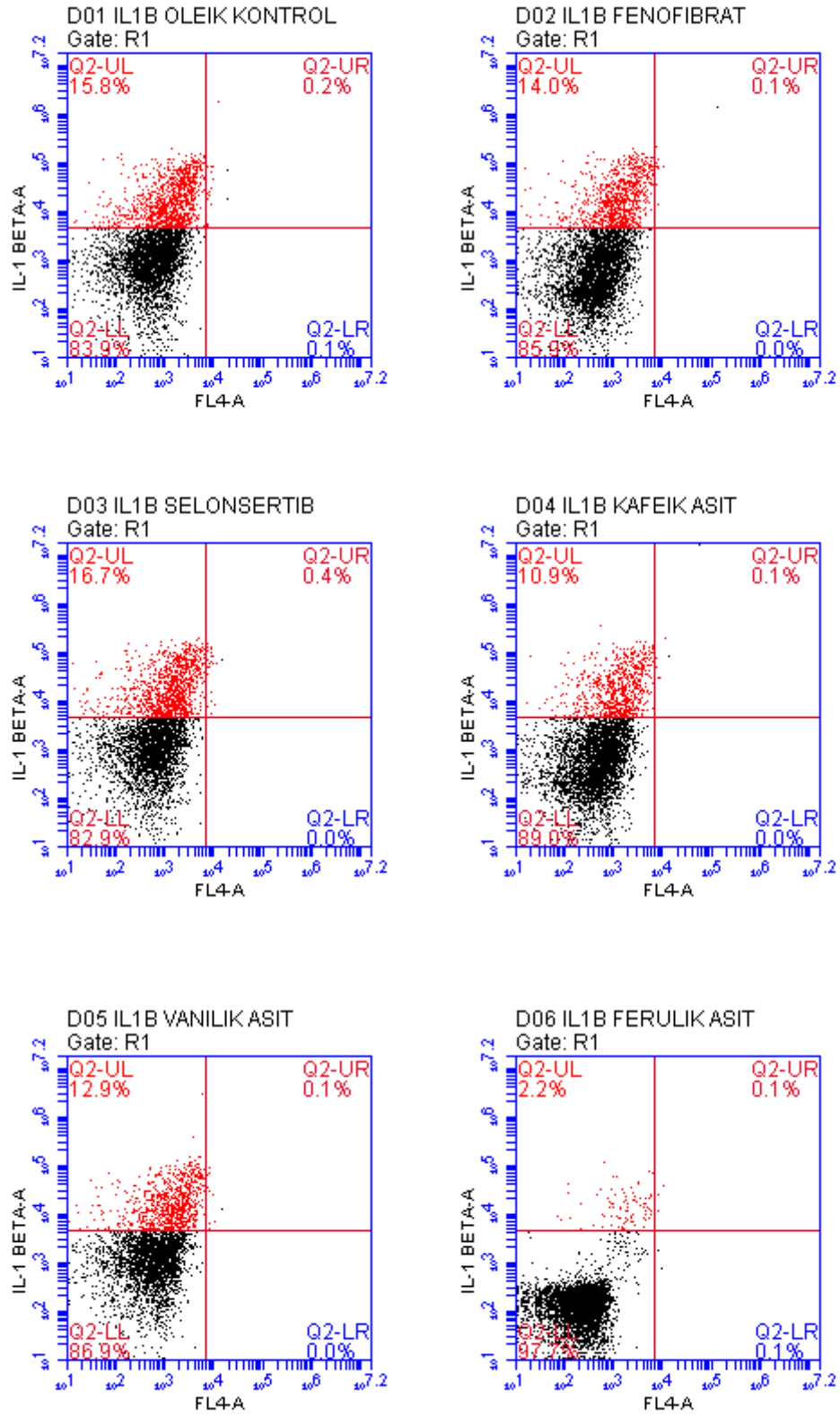
NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin akış sitometride apoptotik etkilerinin belirlenebilmesi için, 6 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra hücrelerin adhere hale gelebilmesi için 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra hücrelere 0.5 mM oleik asit verilip tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi

biten yağlı hücrelere IC₅₀ değerlerine uygun konsantrasyonlarda maddeler verilmiştir. Madde verilmiş plakalar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde her bir modelden elde edilen hücreler kaldırılarak, hücre içi IL-1beta seviyeleri akış sitometri cihazında analiz edilmiştir. Sonuçlar, Şekil 4.5 ve Tablo 4.5’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.5. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki IL-1beta etkisinin belirlenmesi.

Maddeler	% IL-1BETA NEGATİF	% IL-1BETA POZİTİF
HepG-2 Kontrol	100	0
Yağ Kontrol	83.9	15.8
Fenofibrat	85.9	14.0
Vanilik Asit	86.09	12.9
Selonsertib	82.9	16.7
Ferulik Asit	97.7	2.2
Kafeik Asit	89.0	10.9





Şekil 4.5. NAYK Modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki IL-1B sitokin seviyesinin akış sitometride değerlendirilmesi

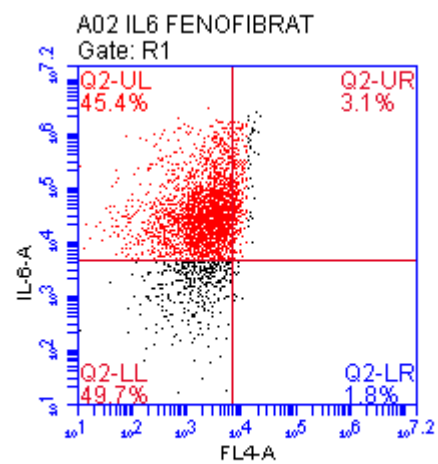
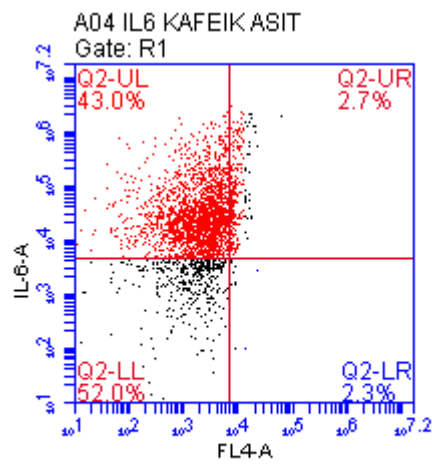
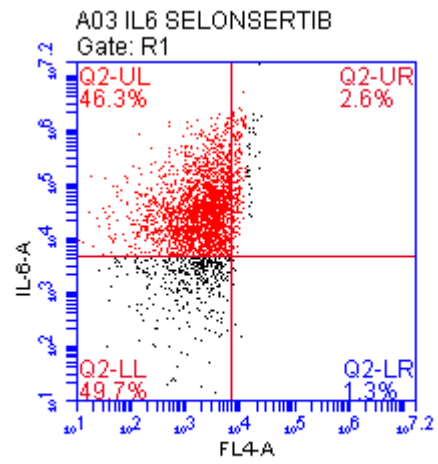
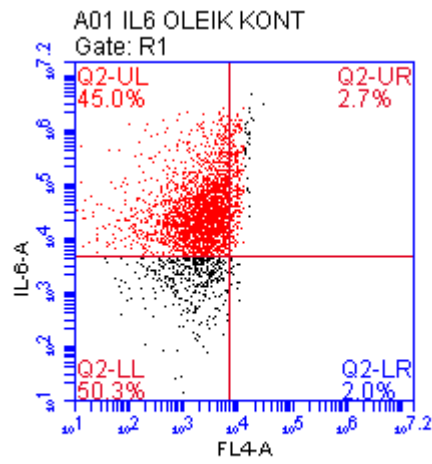
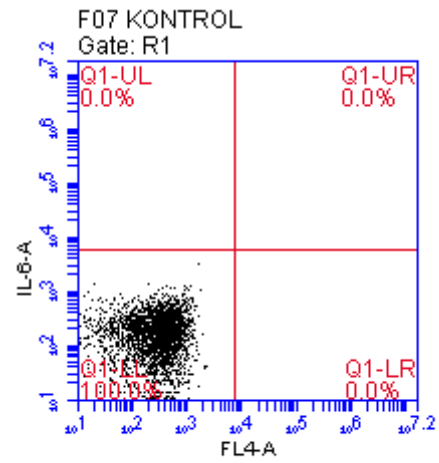
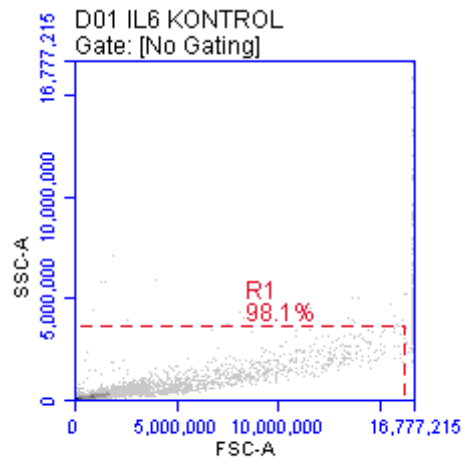
Önceki çalışmalarda, IL-1 β seviyesinin NAYK hastalığıyla ilişkili olduğu Szabo ve Petrasek tarafından kanıtlanmıştır (Szabo ve Petrasek, 2015). Fenofibrat'ın 2023 yılında yayınlanan literatür çalışmasında tez kapsamında olduğu gibi inflamatuvar etkiyi azalttığı bulunmuştur (Jin vd., 2023). Ferulik asit ile yapılan bir başka çalışmada ise ferulik asidin apoptozu engellediği ve inflamasyonu düzenlediği kanıtlanmıştır (Chen vd., 2023).

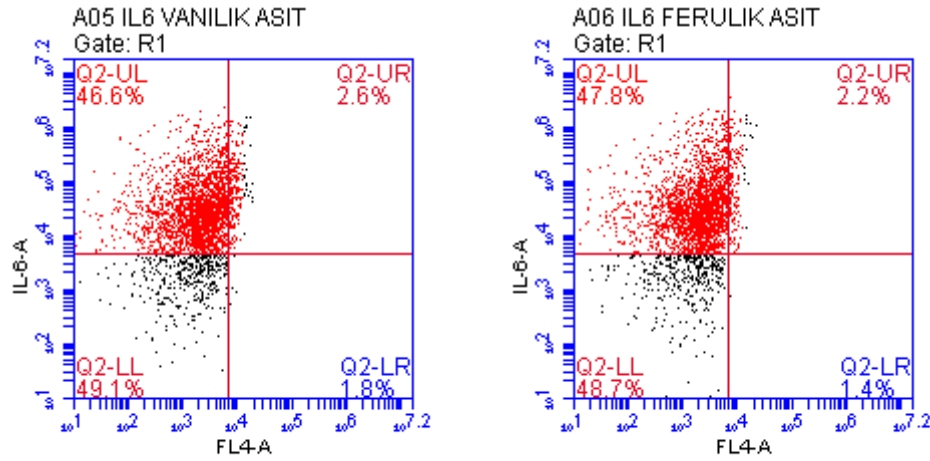
4.3.3. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin akış sitometride interlökin-6, interlökin-10 ve tümör nekroz faktör- α düzeylerinin değerlendirilmesi

NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücrelerinin akış sitometride apoptotik etkilerinin belirlenebilmesi için, 6 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra hücrelerin adhere hale gelebilmesi için 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra hücrelere 0.5 mM oleik asit verilir ve tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi biten yağlı hücrelere IC₅₀ değerlerine uygun konsantrasyonlarda maddeler verilmiştir. Madde verilmiş plakalar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda herbir modele ait hücreleri kaldırılarak, hücre içi IL-6, IL-10 ve TNF- α seviyeleri akış sitometri cihazında analiz edilmiştir.

Tablo 4.6. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki IL-6 etkisinin belirlenmesi.

Maddeler	% IL-6 NEGATİF	% IL-6 POZİTİF
HepG-2 Kontrol	100	0
Yağ Kontrol	50.3	45
Fenofibrat	49.7	45.4
Vanilik Asit	49.1	46.6
Selonsertib	49.7	46.3
Ferulik Asit	48.7	47.8
Kafeik Asit	52	43





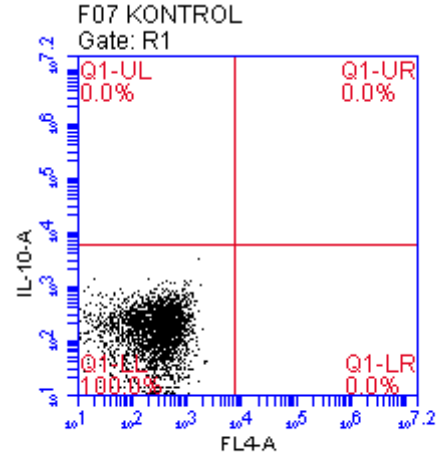
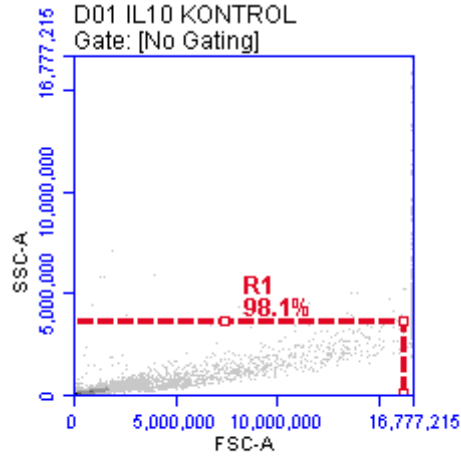
Şekil 4.6. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki IL-6 sitokin seviyesinin akış sitometride değerlendirilmesi

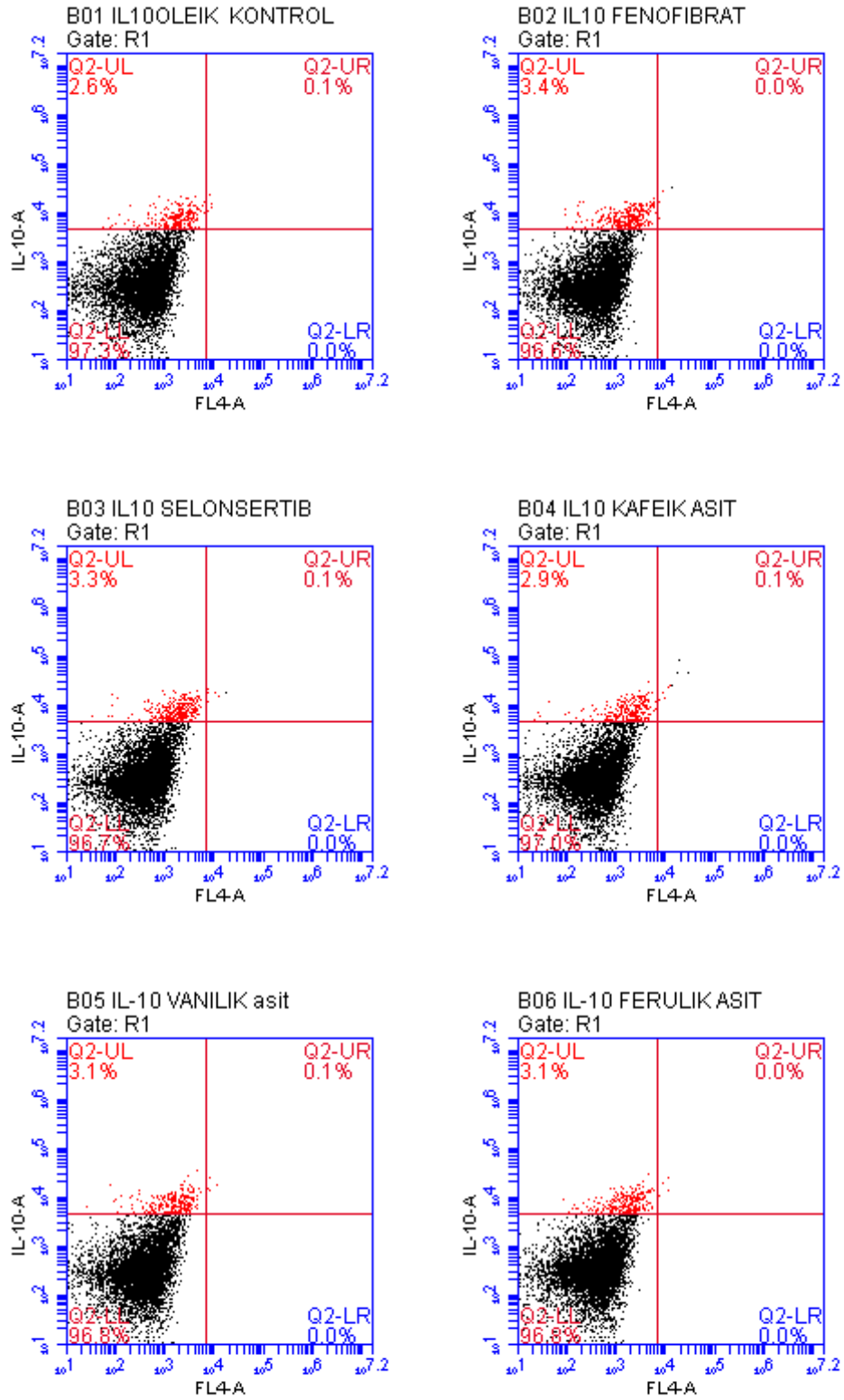
Akış sitometri cihazı kullanılarak analiz edilen verilere göre, HepG-2 kontrol grubunun IL-6 seviyesi %0 bulunmuştur. NAYK modeli oluşturulan HepG-2 hücre hattının IL-6 seviyesi %45.0 bulunmuştur. NAYK modeline uygulanan Selonsertib'in IL-6 seviyesi %46.3 bulunarak NAYK modeline kıyasla %1.03 oranında artış göstermiştir. NAYK modeline uygulanan Kafeik asit'in IL-6 seviyesi %43.0 bulunarak NAYK modeline kıyasla %0.96 oranında azalış göstermiştir. NAYK modeline uygulanan Fenofibrat'ın IL-6 seviyesi %45.4 bulunarak NAYK modeline kıyasla %1.01 oranında artış göstermiştir. NAYK modeline uygulanan Vanilik asit'in IL-6 seviyesi %46.6 bulunarak NAYK modeline kıyasla %1.03 oranında artış göstermiştir. NAYK modeline uygulanan Ferulik Asit'in IL-6 seviyesi %47.8 bulunarak NAYK modeline kıyasla %1.06 oranında artış göstermiştir.

IL-6, NAYK gibi karaciğer hastalıklarında önemli bir rol oynayan bir sitokindir. Bu sitokin, adipoziteden kaynaklanan yüksek seviyelerde inflamasyonu artırabilir. Bu da enflamatuvar sitokinlerin NAYK ile ilişkili olabileceğini gösterdi (Duan vd., 2022). Yapılan literatür çalışmalarında kafeik asidin NAYK modeli oluşturulmuş *in vivo* modelde sıçanlarda trigliserit seviyesini azalttığı tespit edilmiştir (Mu vd., 2021).

Tablo 4.7. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki IL-10 etkisinin belirlenmesi.

Maddeler	% IL-10 NEGATİF	% IL-10 POZİTİF
HepG-2 Kontrol	100	0
Yağ Kontrol	97.3	2.6
Fenofibrat	96.6	3.4
Vanilik Asit	96.9	3.1
Selonsertib	98.7	3.3
Ferulik Asit	96.8	3.1
Kafeik Asit	97	2.9



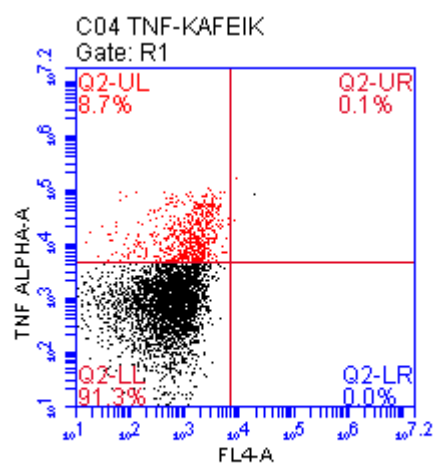
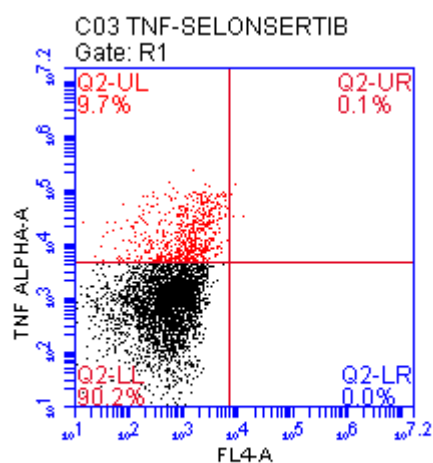
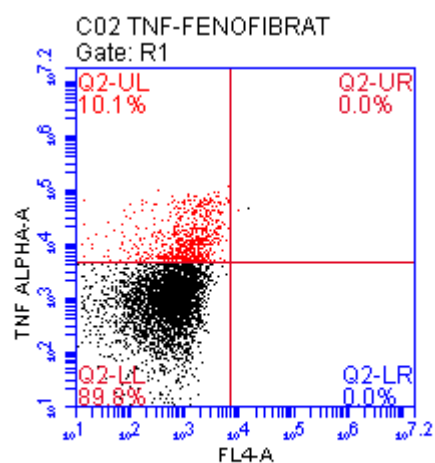
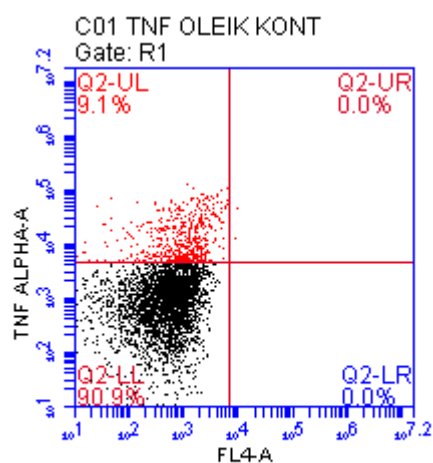
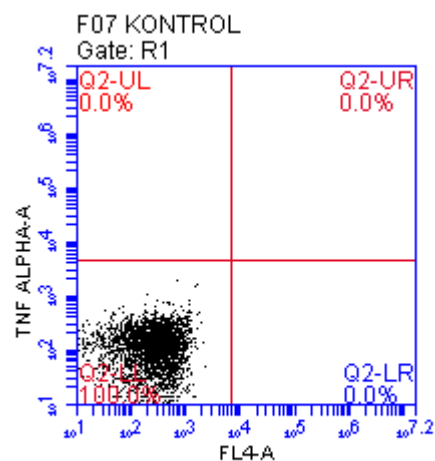
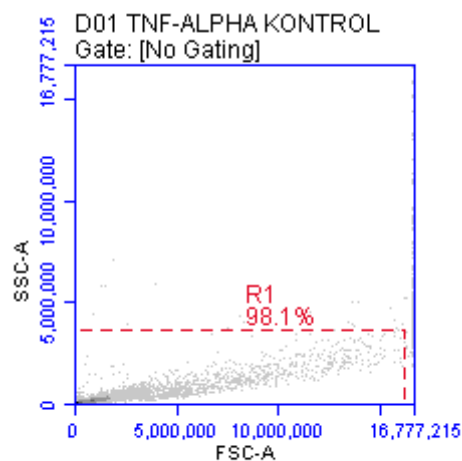


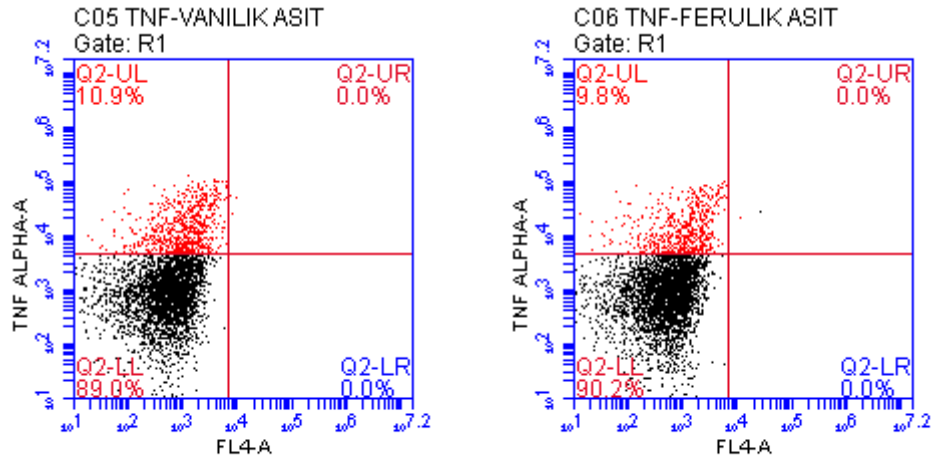
Şekil 4.7. NAYK Modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki IL-10 sitokin seviyesinin akış sitometride değerlendirilmesi

Akış sitometri cihazı kullanılarak analiz edilen verilere göre, HepG-2 kontrol grubunun IL-10 seviyesi %0 bulunmuştur. NAYK modeli oluşturulan HepG-2 hücre hattının IL-10 seviyesi %2.6 bulunmuştur. NAYK modeline uygulanan Selonsertib'in IL-10 seviyesi %3.3 bulunarak NAYK modeline kıyasla %1.27 oranında artış göstermiştir. NAYK modeline uygulanan Kafeik asit'in IL-10 seviyesi %2.9 bulunarak NAYK modeline kıyasla %1.11 oranında artış göstermiştir. NAYK modeline uygulanan Fenofibrat'ın IL-10 seviyesi %3.4 bulunarak NAYK modeline kıyasla %1.31 oranında artış göstermiştir. NAYK modeline uygulanan Vanilik asit'in IL-10 seviyesi %3.1 bulunarak NAYK modeline kıyasla %1.20 oranında artış göstermiştir. NAYK modeline uygulanan Ferulik Asit'in IL-10 seviyesi %3.1 bulunarak NAYK modeline kıyasla %1.20 oranında artış göstermiştir.

Tablo 4.8. NAYK modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki TNF- α etkisinin belirlenmesi.

Maddeler	% TNF- α Negatif	% TNF- α Pozitif
HepG-2 Kontrol	100	0
Yağ Kontrol	90.9	9.1
Fenofibrat	89.8	10.1
Vanilik Asit	89	10.1
Selonsertib	90.2	9.7
Ferulik Asit	90.2	9.8
Kafeik Asit	91.3	8.7





Şekil 4.8. NAYK Modeli oluşturulmuş HepG-2 hücre hattındaki apoptotik etkisinin akış sitometride değerlendirilmesi

Akış sitometri cihazı kullanılarak analiz edilen verilere göre, HepG-2 kontrol grubunun TNF- α seviyesi %0 bulunmuştur. NAYK modeli oluşturulan HepG-2 hücre hattının TNF- α seviyesi %9.1 bulunmuştur. NAYK modeline uygulanan Selonsertib'in TNF- α seviyesi %9.7 bulunarak NAYK modeline kıyasla %1.07 oranında artış göstermiştir. NAYK modeline uygulanan Kafeik asit'in TNF- α seviyesi %8.7 bulunarak NAYK modeline kıyasla %0.96 oranında azalış göstermiştir. NAYK modeline uygulanan Fenofibrat'ın TNF- α seviyesi %10.1 bulunarak NAYK modeline kıyasla %1.11 oranında artış göstermiştir. NAYK modeline uygulanan Vanilik asit'in TNF- α seviyesi %10.9 bulunarak NAYK modeline kıyasla %1.20 oranında artış göstermiştir. NAYK modeline uygulanan Ferulik Asit'in TNF- α seviyesi %9.8 bulunarak NAYK modeline kıyasla %1.08 oranında artış göstermiştir.

Pro ve anti-inflamatuar sitokinler arasındaki dengenin sağlanması, bağışıklık sisteminin normal işleyişi için kritik öneme sahiptir. NAYK hastalığında, TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin seviyelerinin arttığı ve aynı zamanda anti-inflamatuar IL-10 gibi sitokinlerin seviyelerinin azaldığı gözlemlenmiştir (Duan vd., 2022). Bu sitokin profilleri, hastalığın patogenezi ve seyrinin anlaşılması açısından önemlidir. Ancak, önceki çalışmalarda NAYK hastalığı için tez kapsamında kullanılan ilaçlar ve fenolik asitlerin bu sitokinler üzerindeki etkileri hakkında net bir bulguya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışma, hastalığın bağışıklık yanıtı üzerindeki etkilerini daha kapsamlı bir şekilde

değerlendirerek, eksiklikleri gidermeye ve tedavi stratejilerini iyileştirmeye yardımcı olabilir. Bu, NAYK hastalığının patogenezi ve tedavi yaklaşımlarını daha iyi anlamamıza olanak sağlayabilir, böylece hastalığın etkin bir şekilde yönetilmesine katkıda bulunabilir.



5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında HepG-2 hücre hattı kullanılarak, oleik asit ile *in vitro* ortamda oluşturulmuş non-alkolik karaciğer yağlanması modeli üzerinde çalışılmıştır. Oluşturulan yağlanma modelinde fenolik asitlerin etkisi incelenmiş ve toksik olmayan konsantrasyonlar belirlenmiştir. Toksik olmayan konsantrasyonlar belirlendikten sonra, non-alkolik yağlı karaciğer modeline olan etkileri araştırılmıştır. Yağlanma modeli oluşturulan HepG-2 hücre hattı mikroskop altında incelenerek fotoğraflanmıştır. Ayrıca, non-alkolik yağlı karaciğer yağlanma modelinde apoptotik etki ve sitokin seviyeleri de akış sitometride çalışılmıştır.

Bu çalışmalar kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar, oleik asidin farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerini ortaya koymaktadır. 0.25 mM ve 0.5 mM konsantrasyonlarda hücre canlılığı kontrole göre anlamlı olarak değişmemişken, 1 mM ve 2 mM konsantrasyonlarda hücre canlılığını azaltmıştır. Bu bulgular ışığında, HepG-2 hücre hattında NAYK modeli oluşturmak için, toksik olmayan konsantrasyon olan 0.5 mM oleik asit uygulanmıştır. Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

NAYK modeli oluşturmak için oleik asit konsantrasyonu seçildikten sonra fenolik asit ve ilaç taraması yapılmıştır. Fenolik asitler arasında Vanilik asit, Ferulik asit, Kafeik asit ve Ellajik asit bulunmaktadır. İlaçlar arasında ise Selonsertib ve Fenofibrat yer almaktadır. Bu tarama süreci, modelimizin oluşumundan sonraki deneylerimiz için önemli bir adım olmuştur.

Tarama sonuçlarına göre;

Vanilik asidin farklı konsantrasyonlarının NAYK modelindeki hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelendiğinde, 80 μ M konsantrasyonda hücre canlılığını azalttığı, 40 μ M konsantrasyonda anlamlı bir değişiklik olmadığı ve 10-20 μ M konsantrasyonlarında hücre canlılığını anlamlı şekilde değiştirdiği bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.

Ferulik asidin farklı konsantrasyonlarının NAYK modelindeki hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelendiğinde, 40 μ M ile 80 μ M konsantrasyonda anlamlı bir değişiklik olmadığı ve 10 μ M konsantrasyonlarında hücre canlılığını anlamlı şekilde değiştirdiği bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.

Kafeik asidin farklı konsantrasyonlarının NAYK modelindeki hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelendiğinde, 80 μ M konsantrasyonda hücre canlılığını azalttığı, 40

μM , 20 μM ve 10 μM konsantrasyonlarında hücre canlılığını anlamlı şekilde değiştirdiği bulunmuştur. Sonuçlar şekil 4.4.'te gösterilmiştir.

Ellajik asidin farklı konsantrasyonlarının NAYK modelindeki hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelendiğinde, 80, 40, 20, 10 μM konsantrasyonlarının hepsinin hücre canlılığını azalttığı bulunmuştur. Sonuçlar şekil 4.4.'te gösterilmiştir.

Selonsertib farklı konsantrasyonlarının NAYK modelindeki hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelendiğinde, 80 μM konsantrasyonda hücre canlılığını azalttığı, 40 μM ile 20 μM konsantrasyonda anlamlı bir değişiklik olmadığı ve 10 μM konsantrasyonlarında hücre canlılığını iyi sayılabilecek derecede değiştirdiği bulunmuştur. Sonuçlar şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

Fenofibrat farklı konsantrasyonlarının NAYK modelindeki hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelendiğinde, 80 μM konsantrasyonda hücre canlılığını azalttığı, 40 μM konsantrasyonda anlamlı bir değişiklik olmadığı 20 μM ile 10 μM konsantrasyonlarında hücre canlılığını anlamlı derecede değiştirdiği bulunmuştur. Sonuçlar şekil 4.3.'de gösterilmiştir.

NAYK modeline uygulanan ilaç konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle belirlenmiş ve IC_{50} değerleri tablo 4.1 ve 4.2'de verilmiştir. NAYK modeline uygulanan fenolik asit konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle belirlenmiş ve IC_{50} değerleri tablo 4.3'de verilmiştir. Fenofibrat ve Selonsertib'in IC_{50} değerleri sırasıyla 70 μM , ve 47 μM olarak belirlenmiştir. Kafeik asit, vanilik asit, ellajik asit ve ferulik asidin IC_{50} değerleri sırasıyla 50 μM , 53 μM , 7 μM ve 77 μM olarak belirlenmiştir.

Toksik olmayan konsantrasyonları belirlenen ilaç ve fenolik asitlerin etkilerini değerlendirmek için Yağ Kırmızıısı O ile boyama yapılmıştır. Tablo 4.2.'deki fotoğraflama sonuçlarının incelenmesi doğrultusunda, NAYK modelini iyileştirdiğine dair en olumlu etkiyi Ferulik asidin gösterdiği, NAYK modeliyle aynı etkiye sahip etkiyi gösteren ise Kafeik asidin olduğu görülmüştür.

NAYK modelinin fenolik asit ve ilaçlarda apoptotik etkisinin belirlenmesi için akış sitometride analiz edilmiştir. Analiz sonucunda HepG-2 kontrolünün canlı hücreleri %96.8 olarak belirlenmiştir. Oleik asit kontrolünde hücrelerin %34.9 apoptoza neden olduğu NAYK modeline Fenofibrat eklendiğinde %15.8 apoptoza neden olduğu, NAYK modeline vanilik asit eklendiğinde %5.1 apoptoza neden olduğu, NAYK modeline

Selonsertib eklendiğinde %15.1 apoptoza neden olduğu, NAYK modeline ferulik asit eklendiğinde % 0.1 apoptoza neden olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar 4.5.'te gösterilmiştir.

NAYK modelinin fenolik asit ve ilaçlarda hücre içi ve hücre dışı sitokin seviyelerinin etkisinin belirlenmesi için akış sitometride analiz edilmiştir. Analiz sonucunda ise IL-1 β sitokin seviyesini yağlı kontrol grubuna göre fenofibrat %1.13 azaltmış, kafeik asit %1.45 azaltmış, vanilik asit %1.22 azaltmış, ferulik asit ise en etkili asit çıkarak %7.2 azaltmıştır. IL-6 sitokin seviyesini yağlı kontrol grubuna göre kafeik asit %0.96 azaltmıştır. TNF- α sitokin seviyesini yağlı kontrol grubuna göre kafeik asit %0.96 azaltmıştır.

Patogenezi tam olarak çözümlenmemiş olan non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının belirli bir ilacı yoktur. Bu sebeple hastalığın ilerlememesi için öncelikle yaşam tarzı değişiklikleri ve Akdeniz diyeti önerilir. Deney sonuçlarında en etkili çıkan ferulik asit ise buğday, yulaf ve bazı meyvelerin ana bileşigidir ve ferulik asitin bulunduğu tahıllar Akdeniz diyetine de uygundur. Aynı zamanda Selonsertib'in non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ilacı olarak Faz III aşamasında çalışmalarının sonlandırılması, tez kapsamında yapılan deney sonuçlarıyla paralel olarak çıkmıştır.

KAYNAKÇA

- Addison T. Observations on fatty degeneration of the liver. *Guys Hosp. Rep.* 1836;1:485.
- Alam MA. Anti-hypertensive Effect of Cereal Antioxidant Ferulic Acid and Its Mechanism of Action. *Front Nutr.* 2019 Aug 7;6:121. doi: 10.3389/fnut.2019.00121. PMID: 31448280; PMCID: PMC6692439.
- Alhadid A, Bustanji Y, Harb A, Al-Hiari Y, Abdalla S. Vanillic Acid Inhibited the Induced Glycation Using In Vitro and In Vivo Models. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2022 Nov 18;2022:7119256. doi: 10.1155/2022/7119256. PMID: 36437826; PMCID: PMC9699731.
- Arrese, M., Cabrera, D., Kalergis, A. M., & Feldstein, A. E. (2016). Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci*, 61(5), 1294-1303. doi:10.1007/s10620-016-4049-x
- Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol.* 2019 Jan;70(1):151-171. doi: 10.1016/j.jhep.2018.09.014. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30266282.
- Bedossa P, Carrat F. Liver biopsy: The best, not the gold standard. *J Hepatol.* Ocak 2009;50(1):1-3.
- Bharati S, Anjaly K, Thoidingjam S, et al. Oil Red O based method for exosome labelling and detection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022. Jun;611(611):179–10.
- Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* 2016 Aug;65(8):1038-48. doi: 10.1016/j.metabol.2015.12.012. Epub 2016 Jan 4. PMID: 26823198.
- Chang, Y., Jeong, S. W., & Jang, J. Y. (2024). Recent updates on pharmacologic therapy in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and molecular hepatology*, 30(1), 129–133. <https://doi.org/10.3350/cmh.2023.0356>
- Chen S, Zhao D, Luan C, Zheng J, Liu W, Feng Z, Luo R, Han X, Wang D. Ferulic Acid Induces Autophagy and Apoptosis in Colon Cancer CT26 Cells via the MAPK Pathway. *Molecules.* 2023 Aug 11;28(16):6014. doi: 10.3390/molecules28166014. PMID: 37630266; PMCID: PMC10458248.

- Choi KH, Nam KC, Lee SY, Cho G, Jung JS, Kim HJ, Park BJ, 2017. Antioxidant potential and antibacterial efficiency of caffeic acid-functionalized ZnO nanoparticles. *Nanomaterials*, 7(6), 148.
- Colina, J. R., Suwalsky, M., Manrique-Moreno, M., Petit, K., Aguilar, L. F., JemiolaRzeminska, M., & Strzalka, K., 2019, An in vitro study of the protective effect of caffeic acid on human erythrocytes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 662, 75–82 pp.
- Cui W, Chen SL, Hu KQ. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Am J Transl Res*. 2010 Jan 1;2(1):95-104. PMID: 20182586; PMCID: PMC2826826.
- Davenport RD. An introduction to chemokines and their roles in transfusion medicine. *Vox Sang*. 2009 Apr;96(3):183-98. doi: 10.1111/j.1423-0410.2008.01127.x. Epub 2008 Dec 8. PMID: 19076338.
- Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*. 2007 Nov;37 Suppl 1(Suppl 1):S34-45. doi: 10.1002/eji.200737772. PMID: 17972343; PMCID: PMC3140102.
- Duan Y, Pan X, Luo J, Xiao X, Li J, Bestman PL, Luo M. Association of Inflammatory Cytokines With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Immunol*. 2022 May 6;13:880298. doi: 10.3389/fimmu.2022.880298. PMID: 35603224; PMCID: PMC9122097.
- E. Kaya And Y. Yılmaz, "Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Turkey and in the World," In *Türkiye Klinikleri Gastroenterohepatoloji-Özel Konular* , Ankara: Türkiye Klinikleri (Ortadoğu Reklam Tanıtım Yayıncılık), 2019, pp.1-7.
- Erkekoğlu P, Baydar T. Güncel İn Vitro Sitotoksikite Testleri. *HUJPHARM*. 2021;41(1):45-63.
- Gao B. Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol*. 2005 Apr;2(2):92-100. PMID: 16191414.

- Gavanji, S., Bakhtari, A., Famurewa, A.C., & Othman, E.M. (2023). Cytotoxic Activity of Herbal Medicines as Assessed in Vitro: A Review. *Chemistry & Biodiversity*, 20.
- Goldenberg I, Benderly M, Goldbourt U. Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate. *Vascular Health and Risk Management*. 2008 ;4(1):131-141. DOI: 10.2147/vhrm.2008.04.01.131. PMID: 18629356; PMCID: PMC2464751.
- Grant LM, Lisker-Melman M. Nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*. 2004 Jul-Sep;3(3):93-9. PMID: 15505593.
- Han Y, Wang S, Zhang Z, Ma X, Li W, Zhang X, ... Cui Z. In vivo imaging of protein-protein and RNA-protein interactions using novel far-red fluorescence complementation systems. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(13):e103. doi: 10.1093/nar/gku408.
- Hu SJ, Jiang SS, Zhang J, Luo D, Yu B, Yang LY, Zhong HH, Yang MW, Liu LY, Hong FF, Yang SL. Effects of apoptosis on liver aging. *World J Clin Cases*. 2019 Mar 26;7(6):691-704.
- Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 1997 Jan 3;275(5296):90-4. doi: 10.1126/science.275.5296.90. PMID: 8974401.
- Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, Lee SR, Yang SH. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 8;22(5):2719. doi: 10.3390/ijms22052719. PMID: 33800290; PMCID: PMC7962638.
- Jin L, Hua H, Ji Y, Jia Z, Peng M, Huang S. Anti-inflammatory role of fenofibrate in treating diseases. *Biomol Biomed*. 2023 May 1;23(3):376-391. doi: 10.17305/bb.2022.8534. PMID: 36724021; PMCID: PMC10171448.
- Kanev, M., & Gökalp Muranlı, F. (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Sakarya University Journal of Science*, 20(1), 33-38. <https://doi.org/10.16984/saufenbilder.45424>

- Kasper, P., Martin, A., Lang, S. et al. NAFLD and cardiovascular diseases: a clinical review. *Clin Res Cardiol* 110, 921–937 (2021).
- Kim S-J, Kim M-C, Um J-Y, Hong S-H. The Beneficial Effect of Vanillic Acid on Ulcerative Colitis. *Molecules* 2010;15(10).
- Kinkel AD, Fernyhough ME, Helterline DL, Vierck JL, Oberg KS, Vance TJ, Hausman GJ, Hill RA, Dodson MV. Oil red-O stains non-adipogenic cells: a precautionary note. *Cytotechnology*. 2004 Sep;46(1):49-56. doi: 10.1007/s10616-004-3903-4. Epub 2005 Jun 16. PMID: 19003258; PMCID: PMC3449473.
- Kiokias S, Oreopoulou V. A Review of the Health Protective Effects of Phenolic Acids against a Range of Severe Pathologic Conditions (Including Coronavirus-Based Infections). *Molecules*. 2021 Sep 6;26(17):5405. doi: 10.3390/molecules26175405. PMID: 34500838; PMCID: PMC8433690.
- Kneeman JM, Misdraji J, Corey KE. Secondary causes of nonalcoholic fatty liver disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2012 May;5(3):199-207. doi: 10.1177/1756283X11430859. PMID: 22570680; PMCID: PMC3342568.
- Koopman, R., Schaart, G. & Hesselink, M.K. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol* 116, 63–68 (2001). <https://doi.org/10.1007/s004180100297>
- Kosmalski M, Frankowski R, Ziółkowska S, Różycka-Kosmalska M, Pietras T. What's New in the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *J Clin Med*. 2023 Feb 26;12(5):1852. doi: 10.3390/jcm12051852. PMID: 36902639; PMCID: PMC10003344.
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- Lakshmanan I, Batra SK. Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. *Bio Protoc*. 2013 Mar 20;3(6):e374. doi: 10.21769/bioprotoc.374. PMID: 27430005; PMCID: PMC4943750.

- Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P, Abrams SH, Scheimann AO, Sanyal AJ, Chalasani N, Tonascia J, Ünalp A, Clark JM, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA*. 2011 Apr 27;305(16):1659-68. doi: 10.1001/jama.2011.520. PMID: 21521847; PMCID: PMC3110082.
- Leipold MD, Newell EW, Maecker HT. Multiparameter Phenotyping of Human PBMCs Using Mass Cytometry. *Methods Mol Biol*. 2015; 1343:81–95. doi: 10.1007/978-1-4939-2963-4_7.
- Li X, Wu J, Xu F, Chu C, Li X, Shi X, Zheng W, Wang Z, Jia Y, Xiao W. Use of Ferulic Acid in the Management of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Molecules*. 2022 Sep 15;27(18):6010. doi: 10.3390/molecules27186010. PMID: 36144745; PMCID: PMC9503003.
- Liang W, Menke AL, Driessen A, Koek GH, Lindeman JH, Stoop R, Havekes LM, Kleemann R, van den Hoek AM. Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. *PLoS One*. 2014 Dec 23;9(12): e115922. doi: 10.1371/journal.pone.0115922. PMID: 25535951; PMCID: PMC4275274.
- Loomba R, Lawitz E, Mantry PS, Jayakumar S, Caldwell SH, Arnold H, Diehl AM, Djedjos CS, Han L, Myers RP, Subramanian GM, McHutchison JG, Goodman ZD, Afdhal NH, Charlton MR; GS-US-384-1497 Investigators. The ASK1 inhibitor selonsertib in patients with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, phase 2 trial. *Hepatology*. 2018 Feb;67(2):549-559. doi: 10.1002/hep.29514. Epub 2017 Dec 26. Erratum in: *Hepatology*. 2018 May;67(5):2063. PMID: 28892558; PMCID: PMC5814892.
- Lou, G., Li, A., Cen, Y. et al. Selonsertib, a potential drug for liver failure therapy by rescuing the mitochondrial dysfunction of macrophage via ASK1–JNK–DRP1 pathway. *Cell Biosci* 11, 9 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00525-w>
- Luo Z, Li M, Yang Q, Zhang Y, Liu F, Gong L, Han L, Wang M. Ferulic Acid Prevents Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Promoting Fatty Acid Oxidation and Energy

- Expenditure in C57BL/6 Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients*. 2022 Jun 18;14(12):2530. doi: 10.3390/nu14122530. PMID: 35745260; PMCID: PMC9230086.
- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*. 1980. July;55(7):434–8.
- Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Med (Lond)*. 2018 Jun;18(3):245-250. doi: 10.7861/clinmedicine.18-3-245. PMID: 29858436; PMCID: PMC6334080.
- Maxwell KN, Soccio RE, Duncan EM, Sehayek E, Breslow JL. Kolesterolle beslenen farelerin karaciğerinde mikrodizi analizi ile tanımlanan yeni varsayılan SREBP ve LXR hedef genleri. *J Lipid Res*. 2003; 44 (11):2109–19. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300203-JLR200>.
- Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, et al. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc*. 2013. Jun;8(6):1149–1154.
- Mu HN, Zhou Q, Yang RY, Tang WQ, Li HX, Wang SM, Li J, Chen WX, Dong J. Caffeic acid prevents non-alcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet through gut microbiota modulation in mice. *Food Res Int*. 2021 May; 143:110240. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110240. Epub 2021 Feb 25. PMID: 33992352.
- Nadir I, Oğuz D. Adipokinler. *Güncel Gastroenteroloji* 2009; 13; 107-109.
- Negrin KA, Roth Flach RJ, DiStefano MT, Matevossian A, Friedline RH, Jung D, et al. IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. *PloS one*. 2014;9(9):e107265.
- Nile, S.H., Ko, E.Y., Kim, D.H. *et al*. Screening of ferulic acid related compounds as inhibitors of xanthine oxidase and cyclooxygenase-2 with anti-inflammatory activity. *Rev. Bras. Farmacogn*. 26, 50–55 (2016).
- Obara Y, Nakahata N. The signaling pathway leading to extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) activation via G-proteins and ERK5-dependent neurotrophic

- effects. *Mol Pharmacol*. 2010 Jan;77(1):10-6. doi: 10.1124/mol.109.060236. Epub 2009 Oct 26. PMID: 19858097.
- Onat K.A, Sezer Kürkçü M, Çöl B, 2021. *Fenolik Bileşiklerden Sinnamik Asit, Kafeik Asit ve p-kumarik Asit'in Bazı Biyolojik Aktiviteleri. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(4): 2587-2598.
- Ozkan, F., & Canturk, Z. (2023). The Anti-inflammatory Effect of Selonsertib (GS-4997), an ASK1 Inhibitor, on LPS-Stimulated THP-1 Cells. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 66, e23220053.
- Perumpail, B. J., Khan, M. A., Yoo, E. R., Cholankeril, G., Kim, D., & Ahmed, A. (2017). Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 23(47), 8263-8276. doi:10.3748/wjg.v23.i47.8263
- Plumb, J. A. (2004). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, 165-169
- Rafaqat S, Gluscevic S, Mercantepe F, Rafaqat S, Klisic A. Interleukins: Pathogenesis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolites*. 2024; 14(3):153. <https://doi.org/10.3390/metabo14030153>
- Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry*. 1992. Jul;97(6):493–497.
- Rokitansky C.A. Skizze der Größen und Formabweichungen der Leber. *Bruchstück Med Jahrb des kaisl, königl Österr Staates* 1839. Bd 29 oder neueste Folge Bd 20 Wien: 557
- Rong L, Zou J, Ran W, Qi X, Chen Y, Cui H, Guo J. Advancements in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Jan 16;13:1087260. doi: 10.3389/fendo.2022.1087260. PMID: 36726464; PMCID: PMC9884828.
- Schaffner F., Thaler H. Nonalcoholic fatty liver disease. *Prog. Liver Dis*. 1986;8:283–298.

- Seo YY, Cho YK, Bae JC, Seo MH, Park SE, Rhee EJ, Park CY, Oh KW, Park SW, Lee WY. Tumor Necrosis Factor- α as a Predictor for the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A 4-Year Follow-Up Study. *Endocrinol Metab* (Seoul). 2013 Mar;28(1):41-5. doi: 10.3803/EnM.2013.28.1.41. Epub 2013 Mar 25. PMID: 24396649; PMCID: PMC3811803.
- Sharma N, Tiwari N, Vyas M, Khurana N, Muthuraman A, Utreja P. An overview of therapeutic effects of vanillic acid. *Plant Archives* 2020;20(2):3053-9.
- Szabo G, Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jul;12(7):387-400. doi: 10.1038/nrgastro.2015.94. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26055245.
- Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci*. 2013 Oct 15;14(10):20704-28. doi: 10.3390/ijms141020704. PMID: 24132155; PMCID: PMC3821639.
- Tan Q, Hu J, Yu X, Guan W, Lu H, Yu Y, et al. The Role of IL-1 Family Members and Kupffer Cells in Liver Regeneration. *Biomed Res Int*. 2016;2016 6495793.
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Sep 4;6(10):a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295. PMID: 25190079; PMCID: PMC4176007.
- TaqviS, AhmedBhatE, SajjadN, SabirJSM, QureshiA, RatherIA, et al. Protectiveeffect of vanillic acid in hydrogen peroxide-induced oxidative stress in D. Mel -2 cell line. *Saudi J Biol Sci* 2021;28(3):1795-800.
- Teng ML, Ng CH, Huang DQ, Chan KE, Tan DJ, Lim WH, Yang JD, Tan E, Muthiah MD. Global incidence and prevalence of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol*. 2023 Feb;29(Suppl):S32-S42. doi: 10.3350/cmh.2022.0365. Epub 2022 Dec 14. PMID: 36517002; PMCID: PMC10029957.
- Thaler H. The fatty liver and its pathogenetic relation to liver cirrhosis. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*. 1962; 335:180–210. PMID: 13920484.

- Tilg H. The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis.* 2010;28(1):179-85. doi: 10.1159/000282083. Epub 2010 May 7. PMID: 20460908.
- Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators Inflamm.* 2009; 2009:831670. doi : 10.1155/2009/831670. Epub 2009 Jun 3. PMID: 19753129; PMCID: PMC2694309.
- Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 274-80.
- Wang J, Zhao F, Wu W, Lyu L, Li W, Zhang C. Ellagic Acid from Hull Blackberries: Extraction, Purification, and Potential Anticancer Activity. *Int J Mol Sci.* 2023 Oct 16;24(20):15228. doi: 10.3390/ijms242015228. PMID: 37894909; PMCID: PMC10607623.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(12):1785-8. doi: 10.1172/JCI20514. PMID: 14679172; PMCID: PMC297006.
- Xu H, Wang L. The Role of Notch Signaling Pathway in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Mol Biosci.* 2021 Nov 24;8:792667. doi: 10.3389/fmolb.2021.792667. PMID: 34901163; PMCID: PMC8652134.
- Yao X, Jiao S, Qin M, Hu W, Yi B, Liu D. Vanillic Acid Alleviates Acute Myocardial Hypoxia/Reoxygenation Injury by Inhibiting Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Apr 20;2020:8348035. doi: 10.1155/2020/8348035. Erratum in: *Oxid Med Cell Longev.* 2022 Jan 27;2022:9891489. PMID: 32377308; PMCID: PMC7191373.
- Yilmaz Y, Yilmaz N, Ateş F, Karakaya F, Gökcan H, Kaya, E. et al. The prevalence of metabolic associated fatty liver disease in the Turkish population: A multicenter study. *Hepatology Forum.* 2021;2:37-42. doi: 10.14744/hf.2021.2020.0033

- Yoon YC, Fang Z, Lee JE, Park JH, Ryu JK, Jung KH, Hong SS. Selonsertib Inhibits Liver Fibrosis via Downregulation of ASK1/ MAPK Pathway of Hepatic Stellate Cells. *Biomol Ther (Seoul)*. 2020 Nov 1;28(6):527-536.
- You, BJ., Hour, MJ., Chen, LY. *et al*. Fenofibrate induces human hepatoma Hep3B cells apoptosis and necroptosis through inhibition of thioesterase domain of fatty acid synthase. *Sci Rep* **9**, 3306 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39778-y>
- Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-metaanalytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64:73–84.
- Zahran, W. E., Salah El-Dien, K. A., Kamel, P. G., & El-Sawaby, A. S. (2013). Efficacy of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 Analysis in the Follow-up of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 28(2), 141–146.
- Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007 Spring;45(2):27-37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e. PMID: 17426506; PMCID: PMC2785020.
- Zhang M, Bai X, Du Q, Xu J, Wang D, Chen L, Dong K, Chen Z, Yang J. The Different Mechanisms of Lipid Accumulation in Hepatocytes Induced by Oleic Acid/Palmitic Acid and High-Fat Diet. *Molecules*. 2023; 28(18):6714. <https://doi.org/10.3390/molecules28186714>
- Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 21;20(23):7312-24. doi: 10.3748/wjg. v20. i23.7312. PMID: 24966602; PMCID: PMC4064077.
- http 1: <https://doi.org/10.1007/s00392-020-01709-7> (erişim tarihi 22.10.2023)
- http 2: <https://www.profdryusufyilmaz.com/tr/article/desc/48593/non-alkolik-yagli-karaciger-hastaligi.html> (erişim tarihi 22.11.2023)
- http 3: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/liver-disease/nafl-d-nash/treatment> (erişim tarihi 25.11.2023)

- http 4: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Siroz> (erişim tarihi 26.11.2023)
- http 5: <https://www.selleckchem.com/ASK.html> (erişim tarihi 27.11.2023)
- http 6: [https://www.selleckchem.com/products/Fenofibrate\(Tricor\).html](https://www.selleckchem.com/products/Fenofibrate(Tricor).html) (erişim tarihi 28.11.23)
- http 7: <https://docplayer.biz.tr/20897055-Bitkilerdeki-fenolik-bilesikler-fenolik-asitler-veya-fenolkarbonik-asitler-flavonoidler-ile-kucuk-molekullu-ve-cogunlukla-ucucu-olan.html> (erişim tarihi 29.11.2023)
- http 8: https://en.wikipedia.org/wiki/Caffeic_acid (erişim tarihi 02.12.2023)
- http 9: https://en.wikipedia.org/wiki/Ferulic_acid (erişim tarihi 02.12.2023)
- http 10: https://en.wikipedia.org/wiki/Vanillic_acid (erişim tarihi 03.12.2023)
- http 11: <https://www.senorgalab.com/product/4-hidroksibenzoik-asit/> (erişim tarihi 03.12.2023)

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : İrem Nur ÖZKAN
Yabancı Dil : İngilizce, Almanca
ORCID ID :

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- Lisans: 2018-2022, Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü.
- Lise: 2014-2018, Ortaklar Fen Lisesi

