

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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Gülben SAYILAN ÖZGÜN

**PALMİTAT İLE YAĞLANMA OLUŞTURULAN İNSAN
KAYNAKLI HEPATOMA HÜCRELERİNDE VANİLİK
ASİDİN OKSİDATİF STRESE VE HSP70 PROTEİN
DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Regaip EKİCİLER

Referans no: 10179084

EDİRNE – 2019

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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Gülben SAYILAN ÖZGÜN

**PALMİTAT İLE YAĞLANMA OLUŞTURULAN İNSAN
KAYNAKLI HEPATOMA HÜCRELERİNDE VANİLİK
ASİDİN OKSİDATİF STRESE VE HSP70 PROTEİN
DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Regaip EKİCİLER

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2018/267

Tez no:

EDİRNE - 2019

T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde ve Dr. Öğretim Üyesi Gülben SAYILAN ÖZGÜN' ün danışmanlığında Yüksek Lisans öğrencisi Regaip EKİCİLER' e ait tez başlığı "Palmitat İle Yağlanma Oluşturulan İnsan Kaynaklı Hepatoma Hücrelerinde Vanilik Asidin Oksidatif Strese ve HSP70 Protein Düzeylerine Etkisi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 27.05.2019 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN
JÜRİ BAŞKANI

Dr. Öğr.Üyesi Gülben SAYILAN ÖZGÜN

ÜYE


Dr.Öğr.Üyesi Aliye ÇELİKKÖL

ÜYE


Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tamam SİPAHİ
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimim süresince, tez çalışmamın her aşamasında değerli bilgilerini ve zamanını benden esirgemeyerek çalışmamla yakından ilgilenen sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Gülben SAYILAN ÖZGÜN başta olmak üzere Anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, sayın Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'a, sayın Prof. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a, sayın Prof. Dr. İlker DIBIRDIK'a, sayın Dr. Öğr. Üyesi Eray ÖZGÜN'e, tüm çalışma arkadaşlarıma ve bu çalışmayı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI	3
OKSİDATİF STRES	6
ISI ŞOK PROTEİNLERİ	8
ISI ŞOK PROTEİNİ 70	8
VANİLİK ASİT	9
GEREÇ VE YÖNTEMLER	11
BULGULAR	17
TARTIŞMA	27
SONUÇLAR	31
ÖZET	33
SUMMARY	35
KAYNAKLAR	37
ŞEKİLLER LİSTESİ	46
ÖZGEÇMİŞ	47
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

AOPP	: İleri oksidasyon protein ürünleri
CAT	: Katalaz
ER	: Endoplazmik retikulum
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HSP	: Işı şok proteini
NAFLD	: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
NASH	: Non-alkolik steatohepatit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
VA	: Vanilik asit

GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde kronik karaciğer hastalığının en yaygın nedenlerinden biri olan non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), hastalık ile ilişkilendirilebilecek düzeyde alkol tüketmeyen hastaların karaciğerinde yağ birikmesi olarak tanımlanan, histolojik olarak ve/veya görüntüleme yöntemleri ile teşhis edilebilen hepatik bir hastalıktır (1,2). NAFLD, basit yağlanma, non-alkolik steatohepatit (NASH), hepatik fibroz, hepatik siroz ve hepatoselüler karsinom gibi geniş bir karaciğer hastalık spektrumunu kapsamaktadır (2). NAFLD'nin prevalansı giderek artmaktadır (3) ve 2030 yılına kadar dünya çapında karaciğer nakli için ana endikasyon olması beklenmektedir (4).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık riskini arttırmaktadır (5). Obezite, insülin direnci, tip 2 diabetes mellitus ve dislipidemi, bu hastalık spektrumuyla ilişkili metabolik durumlardır (3).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, karaciğerde trigliserit birikmesiyle seyreder ve bu yüzden insan HepG2 hücreleri serbest yağ asitleri ile muamele edilerek deneysel NAFLD modeli oluşturulmaktadır (6). HepG2 hücrelerinin birçok biyolojik özelliği hepatositlere benzediği için, bu hücreler karaciğer protein sentezinin araştırılmasında da kullanılmaktadır (7).

Hem sağlıklı bireylerde hem de NAFLD hastalarının karaciğerlerinde trigliseritlerin yapısında en fazla bulunan yağ asitleri palmitat ve oleattır. Bu nedenle palmitat ve oleat in vitro steatozu indüklemek için yaygın olarak kullanılan yağ asitleridir (8,9). Palmitat doza bağımlı bir şekilde sitotoksik etki göstermektedir (10).

Karaciğerde, oksidatif stres ve endoplazmik retikulum (ER) stresi NAFLD gelişimini etkilemektedir (11). Proteinlerin reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından oksidasyonu ileri

oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP) oluşmasına yol açar (12). AOPP birçok hastalıkta yaygın olarak ölçülen oksidatif stres belirteçlerinden biridir (13).

Çoğu organizmada bol olan ısı şok proteini (HSP) 70 şaperon olarak görev yaparak, yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanmasında, hasarlı ya da yanlış katlanan proteinlerin tekrar katlanmasında ve aynı zamanda şaperon aracılıklı protein yıkımında rol alırlar (14,15). Hücrelerin fiziksel veya kimyasal strese maruz kalması durumunda HSP70 ekspresyonu artmaktadır (16).

Katalaz (CAT) hidrojen peroksit (H_2O_2)'in detoksifiye edilmesinde görevli antioksidan bir enzimdir (17). Endojen şekilde üretilen H_2O_2 , oksidatif stresi indükleyerek, çeşitli hücre tiplerinde NAFLD patofizyolojisinde rol oynayan mitokondriyal disfonksiyona neden olabilir (11,18). CAT ise, H_2O_2 konsantrasyonu yükseldiğinde artan aktivite göstererek NAFLD'nin daha şiddetli hale gelmesini önleyebilir (19).

Vanilik asit (4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit) (VA), yenilebilir bitkiler ve meyvelerden elde edilen fenolik bir bileşiktir ve antioksidan (20), antibakteriyel, antimikrobiyal, anti-filaryal ve hepatoprotektif özelliklere sahiptir (21). VA'nın deneysel yağlanma modellerinde, lipit birikimini ve hepatotoksik/inflamatuar belirteçleri azalttığı bildirilmektedir (22).

Vanilik asidin hücre canlılığına ve palmitat ile oluşturulmuş yağlanmaya etkisini araştıran tek bir çalışma bulunmaktadır ancak bu çalışmada sadece 0-20 μ M arası VA konsantrasyonları kullanılmıştır. Literatürde VA'nın palmitat ile oluşturulmuş yağlanma modelinde HSP70 ve AOPP düzeylerine ve CAT aktivitesine etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan çalışmamız bir ilki teşkil etmektedir.

Çalışmamızın amacı, palmitat ile yağlanma oluşturulan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde VA'nın hücre canlılığına, hücre içi yağlanmaya, oksidatif strese ve HSP70 protein düzeylerine etkisini araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI

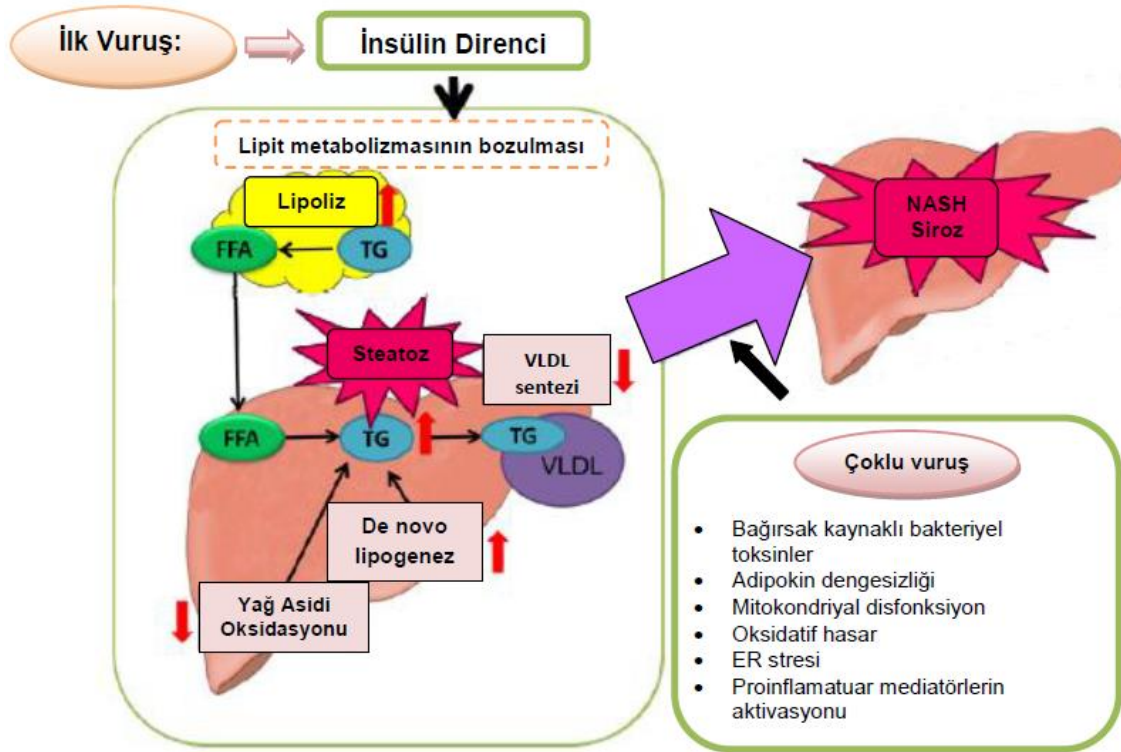
Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, anlamlı alkol tüketimi öyküsü olmayan hastaların karaciğerlerinde trigliseritlerin birikmesiyle karakterizedir ve basit yağlanma, NASH, fibrozis ve siroza kadar çeşitli aşamaları içermektedir (19,23).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, dünya genelinde kronik karaciğer hastalığının en sık nedenlerinden biridir ve karaciğer ile ilişkili morbidite ve mortalitenin ana nedenidir (24). Görülme sıklığı; ırk, yaş, cinsiyet, vücut ağırlığı ve başka hastalıklara bağlı olarak değişmektedir. İleri yaş, erkek cinsiyet ve obezite görülme sıklığını arttırmaktadır (25-28). Obezite, insülin direnci, metabolik sendrom, tip 2 diabetes mellitus, polikistik over sendromu, sigara kullanımı, obstrüktif uyku apnesi, sedanter yaşam tarzı, genetik faktörler gibi durumlar NAFLD'nin görülme sıklığını arttırmaktadır (29).

Günümüzde NAFLD patogenezi tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, öne sürülen mekanizmalardan biri çift vuruş hipotezidir. Karaciğerde yağ birikimi ve insülin direncinin mekanizmaları ilk vuruşu temsil eder (19). İnsülin direncinin neden olduğu hiperinsülinemi, yağ dokusundan artan lipoliz nedeniyle karaciğere serbest yağ asitlerinin akışının artması, karaciğerde de novo lipogenezin artışı, serbest yağ asidi oksidasyonunun azalması, hepatik VLDL (Çok düşük yoğunluklu lipoprotein) salgılanmasının azalması karaciğerde yağlanma ile sonuçlanır (18). İkinci vuruş ise yağlanmaya bağlı olarak gelişen durumları tanımlamaktadır. Mitokondriyal uzun zincirli yağ asitlerinin β -oksidasyonu artar. Hepatositlerde β -oksidasyon aşırı arttığında ROS üretilir (19,30). ROS, mitokondriyal solunum zinciri enzimlerinin inhibisyonu, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenazın inaktivasyonu, membran sodyum

kanallarının inaktivasyonu, lipit peroksidasyonu, sitokin üretimi ve Fas Ligand indüksiyonu gibi patolojilere yol açarak hepatosellüler hasar ve fibrozise yol açabilir (31).

Son yıllarda çift vuruş hipotezinin yetersiz kalması nedeniyle NAFLD patogenezinde çoklu vuruş hipotezi öne sürülmüştür. Bu hipotez; oksidatif stres, inflamasyon, ER stresi, insülin direnci, adipoz dokudan salgılanan hormonlar, bağırsak mikrobiyotası, besin faktörleri, genetik ve epigenetik gibi birçok faktörün patogeneizde yer aldığını öne sürer (Şekil 1) (18,32).



Şekil 1. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının patogenezi (18)

FFA: Serbest yağ asidi; **TG:** Trigliserit; **VLDL:** Çok düşük yoğunluklu lipoprotein; **ER:** Endoplazmik retikulum; **NASH:** Non-alkolik steatohepatit

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında karaciğerde serbest yağ asitlerinin, serbest kolesterolün ve diğer lipit metabolitlerin birikimi lipotoksositeye yol açar. Bunun sonucunda katlanmamış protein cevabı aktive olarak ER stresine yol açar (18,32,33). NAFLD’de, katlanmamış protein cevabını indükleyen faktörler arasında hiperglisemi, mitokondriyal hasar, hiperkolesterolemi, fosfatidilkolin tükenmesi ve oksidatif stres bulunur (32).

İnsülin direnci, adipoz dokusu üzerine negatif olarak etki ederek adiposit disfonksiyonuna neden olup, adipokinlerin ve pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını indükler

(32). Adipoz dokudan salgılanan bir hormon olan adiponektin, yağ asidi oksidasyonunu düzenleyen ve hem yağ dokusunda hem de karaciğerde lipit birikimini önlemeyi sağlayan bir adipokindir. Serum adiponektin düzeylerinin NAFLD olmayan hastalarda daha düşük olduğu gösterilmiştir (34).

Yüksek yağlı diyet gibi diyetel faktörler ve metabolik değişiklikler bağırsak mikrobiyotasını ve bağırsak geçirgenliğini etkileyebilir (35). Lipopolisakkaritler gibi bağırsak kaynaklı mikrobiyal ürünlerin artan bağırsak geçirgenliği, inflamazom aktivasyonuna, ER stresine ve inflamatuvar kaskadların aktivasyonuna katkıda bulunur (36).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastaları için öncelikle diyet ve egzersiz önerilmektedir (37). Ek olarak, insülin duyarlılığını artıran ilaçlar (metformin ve tiazolidindionlar gibi), kilo kaybı ilaçları (orlistat ve sibutramin gibi) ve morbid obez hastalar için bariatrik cerrahi, son evre sirozu için karaciğer nakli (38), ve karaciğeri sekonder hasarlardan korumak için antioksidanlar (39) önerilmektedir (37). Ancak NAFLD veya NASH için spesifik bir tedavi bulunmamaktadır ve yeni tedavi arayışları sürmektedir.

HepG2 Hücreleri Ve Deneysel Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Modeli

Palmitik ve oleik asitler, hem sağlıklılarda hem de NAFLD'li hastalarda karaciğer trigliseritlerinde en fazla bulunan yağ asitleridir. Bu nedenle NAFLD hastalığının araştırılmasında; deneysel olarak palmitat ve oleik asit ile oluşturulan yağlanma modelleri kullanılmaktadır (6).

HepG2 hücreleri, primer hücre kültürlerine alternatif olarak, çoğaltma kapasitesi sürekli ve geniş olan, kararlı bir fenotipe sahip ve aynı hücrelerin bir araştırma boyunca kullanılmasını sağlayan ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarıdır. HepG2 gibi ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarına örnek bir modelin kültivasyonunu standardize etmek daha basit ve kolaydır (40). HepG2 hücreleri; çeşitli karaciğer fonksiyonlarını taklit eden, karaciğerde protein sentezinin incelenmesinde kullanılan ve ticari olarak satılan insan kaynaklı karaciğer hepatoma hücreleridir (7). Deneysel NAFLD oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu hücreler ile elde edilen sonuçların primer hepatositlere benzediği bildirilmektedir (40,41).

OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres, hücrelerde ve dokularda pro-oksidan oluşumu ile biyolojik sistemin antioksidan savunması arasındaki dengenin pro-oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır (42,43).

Oksidatif stres, kanser, nörolojik bozukluklar, ateroskleroz, hipertansiyon, iskem/reperfüzyon, diyabet, akut solunum sıkıntısı sendromu, idiyopatik pulmoner fibrozis, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve astım dahil olmak üzere birçok patolojik durum ile ilişkilidir (44). Oksidatif stres, NAFLD patogenezinde de önemli rol oynar (45).

Oksidatif strese düşük maruziyet redoks sinyalizasyonu için faydalıdır, buna karşın yüksek maruziyet redoks sinyalinin bozulmasına neden olur ve protein, lipit ve DNA (Deoksiribo nükleik asit) gibi önemli biyomoleküllere zarar verir (17,46). Artmış redoks durumu ile ilgili diğer olaylar özellikle mitokondriyal hasara bağlı olarak, ATP (Adenozin trifosfat) düzeyinde azalma, azalmış mitokondriyal protein sentezi ve NAFLD'nin patogenezinde önemli bir bileşen olan bozulmuş mitokondriyal β -oksidasyondur (46).

Reaktif oksijen türlerinin üretimi büyük ölçüde bir oksijen molekülüne bir elektron verilmesi sonucu süperoksit üretimi ile başlar. Süperoksit, süperoksit dismutaz enzimi tarafından hızlı bir şekilde H_2O_2 ' ye dismutasyona uğrar. Oluşan H_2O_2 ; CAT, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksin gibi peroksidazlarla hızlı bir şekilde elimine edilebilir (47). ROS'un ana endojen hücre içi kaynakları mitokondri, ER ve peroksizomlar olsa da, süperoksit anyon radikalleri, ksantin oksidaz ve sitokrom P450 metabolizması gibi enzimatik aktivitenin bir sonucu olarak da üretilir (48).

Azot bazlı radikaller ve azot dioksit, nitrik oksit radikalleri ve peroksinitrit gibi radikal olmayanları içeren reaktif azot türleri, indüklenebilir nitrik oksit sentaz ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz yoluyla nitrik oksit ve süperoksitten oluşur (49). ROS ve reaktif azot türlerinin oluşumu ve glutatyon tükenmesi NAFLD'nin gelişmesi için kritik başlangıç olaylarıdır (50). Ayrıca tüm endojen hücre içi ROS kaynaklarının NAFLD'de hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğu görülmektedir ve NAFLD'de ana ROS kaynağının mitokondriyal oksidasyondaki artış olduğuna inanılmaktadır (51).

İleri Oksidasyon Protein Ürünleri

Reaktif oksijen türleri tarafından indüklene protein oksidasyonu, proteinlerin ana omurgası ya da yan zincirinde kovalent modifikasyonlara yol açar (52). Proteinlerin kovalent modifikasyonuna yol açan başlıca moleküler mekanizmalar metal katalizli protein oksidasyonu nedeniyle protein karbonil oluşumu, protein tiyol gruplarının kaybı, nitrotirozin ve AOPP oluşumu olarak sıralanabilir (12). Proteinlerdeki oksidatif değişiklikler, enzimatik aktivitelerinin ve bağlanma aktivitelerinin inhibe edilmesi, proteoliz duyarlılığının artması, reseptör aracılıklı endositozun bozulması ve immünojenitede değişiklikler gibi çeşitli fonksiyonel sonuçlara yol açabilir (53).

1996 yılında yeni oksidatif stres biyobelirteci olarak tanımlanan AOPP, ilk olarak Witko-Sarsat ve ark. (54) tarafından kronik üremik hastaların plazmasında gösterilmiştir ve oksidan aracılıklı protein oksidasyonunun göstergesi olan plazma ditirozin ve ileri glikasyon son ürünleri (AGE)-pentosidin plazma konsantrasyonları ile korele olduğu bildirilmiştir. AOPP in vivo oksidatif stresi değerlendirmek için yararlı bir belirteçtir (53). AOPP, oksidan-antioksidan dengesizliği, glikol oksidasyon işlemleri ve bir arada varolan inflamasyon dahil olmak üzere birçok durumda oluşturulabilir (55,56). AOPP'lerin primer kaynağı oksitlenmiş insan albüminidir (56,57). Çünkü hücre dışı sıvılar sadece küçük miktarlarda antioksidan enzimler içerir ve bu nedenle plazma proteinleri ROS tarafından oksidasyona eğilimlidir. Albüminin, ROS'a karşı oldukça savunmasız olduğu ve diyaliz hastalarının, karaciğer sirozu ve akut kronik karaciğer yetmezliğine sahip hastaların plazmasında yüksek düzeylerde albümin karbonil gruplarının bulunduğu bildirilmiştir (58). AOPP'nin oluşumu geri dönüşsüzdür ve proteolitik enzimler tarafından kolayca hidrolize edilemezler veya C vitamini, glutatyon gibi antioksidanlar tarafından indirgenemezler (56,59). Ayrıca, AOPP, fagositleri aktive etme ve interlökin-6, tümör nekroz faktörü- α ve interlökin-1 β gibi sitokinlerin üretimini indükleyen pro-inflamatuar mediatörlerdir (60).

Protein oksidasyonu, Alzheimer hastalığı, kanser, gebelik, obezite ve siroz gibi çeşitli hastalıklarda önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir (61,62). Aynı zamanda AOPP'nin artışı, oksidatif stres ile yakından ilişkili olan diyabet, üremi ve kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıklarda da görülmektedir (56). Literatürde NAFLD ve NASH tanısı konulan hastalarda AOPP düzeylerinin yüksek olduğu bulunmuştur (61,62).

Katalaz enzimi

İnsanlarda, sıçanlarda ve farelerde ifade edilen memeli CAT, molekül ağırlığı 240-kDa olan hem içeren tetramerik bir enzimdir (63-65). CAT hem H₂O₂ katabolizmasında hem de metanol, etanol gibi eksojen substratların oksidasyonunda işlev görür. İnflamasyon, mutajenez ve karsinogenezde, apoptoza karşı korunmada özel bir rol üstlenir. CAT aktivitesinin azalması, pnömoni, tüberküloz, ateroskleroz, diyabet, sarılık, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, nefrit gibi birçok hastalıkla ilişkilidir (66).

İnsan vücudundaki en önemli intraselüler antioksidanlardan olan CAT (19,67) peroksizomlarda bulunur ve iki H₂O₂ molekülünü, iki su molekülü ve bir oksijene (2H₂O₂ → 2H₂O + O₂) parçalar (68,69). Shin ve ark. (19), CAT eksikliğinin lipid birikimini hızlandırarak farelerde steatoza neden olduğunu göstermiştir. Bu, CAT'ın, NASH'lı hastaların

karaciğerlerinde antioksidan olarak koruyucu bir rol oynadığını ve oksidatif stresin önemli bir terapötik veya önleyici hedef olduğunu göstermektedir (19).

Katalaz ekspresyonu, en yüksek seviyelerde karaciğer, böbrek ve kanda, en düşük seviyelerde bağ dokusu ve beyinde gerçekleşir (19,68). Ho ve ark. (70), CAT'ın antioksidan aktivitesinin derecesi, doku tipine bağlı olduğunu ve CAT'ın, H₂O₂'yi karaciğerden uzaklaştırmada önemli bir role sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle CAT'ın NAFLD ve NASH'da çok önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

ISI ŞOK PROTEİNLERİ

Isı şok proteinleri veya stres proteinleri, tüm organizmalarda ve bütün hücrelerde bulunur (71). HSP'lerin ısı şoku, soğuk, UV ışığına maruz kalma, yara iyileşmesi, dokuda yeniden şekillenme gibi çok çeşitli stresler tarafından indüklendikleri bilinmektedir (72).

Isı şok proteinleri moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılmış geniş bir protein ailesini oluştururlar (73). HSP'ler, sitozolün yanı sıra, ER, kloroplastlar, mitokondri ve çekirdek gibi diğer organellerde bulunur, bu da protein homeostazında farklı ve dinamik roller oynadıklarını gösterir. HSP'lerin çoğu üyesi yeni sentezlenmiş proteinlerin ve/veya hücre içi strese bağlı hasarlanmış proteinlerin 3 boyutlu katlanması gibi önemli şaperon fonksiyonları gösterir (72).

Isı şok proteinleri protein düzeylerinin, ateroskleroz, konjestif kalp yetmezliği, ateş, enfeksiyon ve yaşlanma gibi durumlarda, Alzheimer hastalığı, malign hastalıklar ve otoimmün hastalıklarda değiştiği bildirilmiştir (74).

ISI ŞOK PROTEİNİ 70

Isı şok proteini 70 proteini, 70 kDa ağırlığında bir moleküler şaperondur. İnsan HSP70 gen ailesi, amino asit dizisi, ekspresyon düzeyi ve hücre içi lokalizasyonu ile birbirinden farklı en az sekiz gen ürünü içerir. HSP70-5 (diğer adıyla Bip veya Grp78) ve HSP70-9'un lokalizasyonu, sırasıyla ER ve mitokondriyal matriksin lümeni ile sınırlıdır, geri kalan altı HSP70 proteini ise esas olarak sitozol ve nükleus içinde bulunur (75).

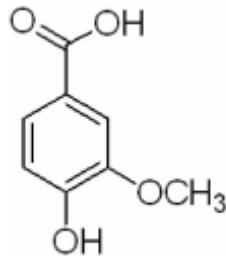
Isı şok proteini 70, membranlar boyunca protein translokasyonunun sürdürülmesi, hücrenin kısımları arasında proteinlerin taşınması, protein agregasyonunun önlenmesi ve çözünmesi, ribozomlarda üretilen yeni polipeptit zincirlerinin katlanması, yanlış katlanmış proteinlerin bozulması ve yeniden katlanması, klatriin kaplı veziküllerin kaplanması ve düzenleyici proteinlerin kontrolü ve Fe/S (demir/sülfür) kümelerinin sentezinin kolaylaştırılması gibi çok çeşitli hücresel işlemlerde rol alır (75,76).

Işı şok proteini 70 ayrıca anti-apoptotiktir ve bazı durumlarda HSP70 fonksiyonunun inhibe edilmesi, tümör hücrelerinin ölümünü indüklemektedir (77).

Işı şok proteini 70'in, sağlıklı bireylerin periferik dolaşımında mevcut olduğu ve hamilelik, yaşlanma ve çeşitli patofizyolojik koşullarla seviyelerinin değiştiği tespit edilmiştir (78). Kronik hepatit, karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinomda HSP70 düzeylerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (79,80). Zhang ve ark. (81) obez farelerde karaciğer HSP70 mRNA (mesajcı Ribonükleik asit) ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını aynı zamanda palmitat ile oluşturulmuş yağlı karaciğer modelinde HSP70 mRNA ekspresyonunun ve protein düzeyinin arttığını bildirmişlerdir (81).

VANİLİK ASİT

Vanilinin okside bir formu olan dihidroksibenzoik asitten elde edilen VA, yenilebilir bitki ve meyvelerde bulunan fenolik bir bileşiktir ve bir tadlandırıcı ajan olarak kullanılır (82,83,84). Ferulik asidin vanilin'e iki aşamalı biyolojik dönüşümünün ara ürünüdür (85). *Angelica sinensis*'in bitki köklerinde yüksek oranda bulunur (83) ve aynı zamanda şarap, sirke ve argan yağının bir bileşenidir (22). VA ayrıca kafeik asidin metabolik bir yan ürünü olması nedeniyle sıklıkla kahve, çikolata, çay ve vanilya aromalı şekerleme tüketen insanların idrarında bulunur (86).



Şekil 2. Vanilik asidin yapısı (84)

Vanilik asit, geleneksel Çin tıbbında diyabet, hemorajik iltihap, hipertansiyon, ülser ve ateş için kullanılır (21). Antimalariyal (87) ve antibakteriyel özellikte olmasının yanı sıra yılan zehiri aktivitesinin inhibe edilmesi, hepatoprotektif özellikler (88) ve hipertansif sıçanlarda kardiyoprotektif etkiler gibi çeşitli tıbbi özelliklerle ve farmakolojik aktivitelerle ilişkilendirilmiştir (21,83). VA ayrıca, üriner problemleri tedavi etmek için geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan bir bileşiktir (21).

Hsu ve Yen tarafından yapılan bir çalışma (89), VA'nın 3T3-L1 adipositlerinde hücre içi trigliserit düzeyinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. VA, immün aracılı karaciğer inflamasyonunu baskılayarak hepatoprotektif etki gösterir (90).

Vanilik asidin NAFLD ile ilişkisini araştıran çalışma sayısı az olmakla beraber, bir çalışmada hepatotoksisiteyi ve yağ birikimini azalttığı, in vivo ve in vitro olarak yağ asidi oksidasyonunu aktive ettiği bildirilmiş olup obeziteye bağlı NAFLD gelişimini önlemek için kullanılabileceği önerilmiştir (22).



GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 01.10.2018 tarihinde TÜTF-BAEK 2018/328 protokol kodu ve 16/06 karar no ile onaylandı (Ek 1).

Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Akrilamid (Merck)

Amonyum persülfat (Merck)

Antibiyotik-Antimikotik (Thermo)

Bradford reaktifi (Abcam)

Bromofenol blue (Merck)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma)

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

EMEM-Fenol red içermeyen (Wisent)

Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma)

Fetal sığır serumu (FBS) (Thermo)

Gliserol (Sigma)

Glisin (Sigma)

Hidrojen peroksit (Merck)

HSP70 antikoru (Abcam)

İsopropanol (Honeywell)

Kemilüminesans substrat (Thermo)

Metanol (Merck)

N,N-Metilenbis-akrilamid (Merck)
N,N,N,N-tetrametiletilendiamin (TEMED) (Sigma)
Oil Red O (Sigma)
Paraformaldehit (Sigma)
Poliviniliden diflorid (PVDF) membran (Roche)
Potasyum iyodür (Merck)
Pre-stained protein ladder (Thermo)
Proteaz inhibitör kokteyli (Sigma)
Sekonder antikorlar (Abcam)
Sığır serum albumini (Sigma)
Sığır serum albumini (yağ asidi içermeyen) (GoldBio)
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)
Sodyum klorür(Sigma)
Sodyum palmitat (Sigma)
Trizma base (Sigma)
Tuzlu fosfat tamponu (PBS) tablet (Thermo)
Tübülin antikor (Abcam)
Tween 20 (Sigma)
Vanilik asit (Sigma)
Yağsız süt tozu (Sigma)
2-merkaptoetanol (Sigma)
3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür (MTT) (Sigma)
% 0.25 Tripsin-EDTA (Thermo)

Deneylerde Kullanılan Plastik ve Cam Laboratuvar Malzemeleri

Balon joje (Isolab)
Beher (Isolab)
Flask (25 cm² ve 75 cm²)(Nest)
Hücre kazıyıcı (Biosorfa)
Mezür (Isolab)
Mikroplaka (6 kuyucuklu ve 96 kuyucuklu)(SPL)
Quartz küvet (Hellma)
Steril otomatik pipet uçları (20, 200 ve 1000 µL)(Isolab)
Steril santrifüj tüpü (15 ve 50 mL) (Isolab)

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

Analizlerde Kullanılan Aletler

Biyogüvenlik kabini (Thermo Scientific Safe 2020)
Biyokimya otoanalizörü (Beckman Coulter AU5800)
Çalkalayıcı (Cleaver Scientific CW23)
Dikey elektroforez sistemi (Cleaver Scientific Omnipage Mini Vertical System)
Faz kontrast invert mikroskop (Olympus CKX 53)
Güç kaynağı (Cleaver Scientific)
Homojenizatör (Next Advance Bullet Blender Storm)
Isı kontrollü UV-VİS spektrofotometre (Shimadzu UV 1700A)
Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Daihan Scientific WiseStir)
Karbon dioksitli inkübatör (Thermo Scientific Forma Steri-cycle 371)
Kemilüminesans görüntüleme sistemi (Bio-rad ChemiDoc MP Imaging System)
Mikrobiyolojik inkübatör (Thermo Scientific Heratherm IMC-18)
Mikroplaka okuyucu (Biotek µQuant)
Otomatik pipetler (Eppendorf ve Capp)
pH metre (İnolab)
Santrifüjler (Nüve NF048), (Heraeus multifuge 3 S-R)
Sıvı azot tankı (Air Liquide GT21)
Su banyosu (GFL 1083)
Western blotting sistemi (Cleaver Scientific Semi Dry Blotter)
-80 °C Derin dondurucu (Heraeus HERAFreeze)

Hücre Kültürü

Çalışmada Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda bulunan sıvı azot tankında depoladığımız HepG2 hücreleri kullanılmıştır. HepG2 hücrelerinin sıvı azot tankında saklanması için kullanılan sıvı azot Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden satın alındı. Deneilerde kullanılan 12-20. pasajlar arasındaki hücreler 75 cm² flaskların içinde, %10 FBS ve %1 antibiyotik-antimikotik içeren EMEM ile %5 CO₂'li ortamda 37°C'de inkübatörde yaşatıldı. Tüm uygulamalar biyogüvenlik kabini içerisinde steril malzemeler kullanılarak yapıldı. Hücrelerin besiyeri 3 günde bir değiştirildi ve %80-90 hücre yoğunluğuna ulaşıldığında 1:4 oranında pasajlandı.

Vanilik Asidin Hücre Canlılığına Etkisi

HepG2 hücrelerinde VA'nın hücre canlılığına etkisi MTT hücre canlılığı testi ile gösterildi (91). 96 kuyucuklu plakalarda her bir kuyucuğa 10^4 adet hücre ekildi. VA besiyerinde çözüldü ve hücreler 24 saat boyunca 20, 40, 100, 200, 500, 1000, 1500 ve 2000 μM konsantrasyonlarda VA ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırıldı. Devamında 10 μl PBS'de hazırlanmış 5 mg/mL MTT ve 100 μl fenol red içermeyen besiyeri eklenerek 4 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası MTT içeren besiyeri uzaklaştırılarak kuyucuklarda oluşan formazan 200 μl DMSO ve 25 μl Sorenson tamponu (0.1 M glisin ve 0.1 M sodyum klorür; 0.1 M sodyum hidroksit ile pH:10.5'e ayarlandı) ile çözüldü ve oluşan renk mikropłaka okuyucuda spektrofotometrik olarak 570/630 nm'de ölçüldü (92). Ölçülen absorbanslar kontrol grubunun ortalamasına bölünerek sonuçlar aynı plakadaki kontrol grubunun yüzdesi olarak verildi.

Palmitat ile NAFLD Modeli Oluşturulması ve NAFLD oluşturulan HepG2 Hücrelerinde Vanilik Asidin Hücre Canlılığına Etkisi

Yukarıda belirtilen şekilde aynı sayıda hücre ve aynı yöntem ile MTT hücre canlılığı testi yapıldı (91,92). HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan VA dozlarından kontrol grubuna göre %80'in altında hücre canlılığına neden olan 1500 ve 2000 μM VA konsantrasyonları ve hücre canlılığına diğer düşük dozlara benzer şekilde etki eden 40 μM konsantrasyonu çalışmadan çıkarıldı. 20, 100, 200, 500, 1000 μM konsantrasyonlarında VA, 1 mM palmitat ile aynı anda hücrelere uygulandı. Sodyum palmitat steril su ile çözüldü (93) ve 0.7 mM yağ asidi içermeyen sığır serum albumini ile konjuge edildi (94). Devamında hücrelere 24 saat süreyle uygulandı. Kontrol grubuna ise sadece 0.7 mM albumin içeren besiyeri uygulandı.

Vanilik Asidin Hücre İçi Yağlanmaya Etkisinin Gösterilmesi

Trigliserit Ölçümü

Hücreler 25 cm² flasklara ekildi. 20, 100, 200, 500, 1000 μM konsantrasyonlarında VA, 1 mM palmitat ile aynı anda 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. Kontrol grubuna ise 0.7 mM yağ asidi içermeyen sığır serum albumini içeren besiyeri uygulandı. Deneysel prosedür sonrası soğuk PBS ile yıkanan hücreler, daha sonra %1 proteaz inhibitörü ve %0.1 Triton X-100 içeren PBS tamponu ile kazındı. Numuneler uygun cam bilyeler kullanılarak homojenize edildi ve 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantların hücre içi trigliserit düzeyleri, biyokimya otoanalizörünün orijinal kitleri kullanılarak ölçüldü. Lowry ve ark.

(95)'nin yöntemine göre protein ölçümü yapılarak, trigliserit değerleri protein düzeylerine oranlandı ve kontrol grubunun ortalamasına oranlanarak kontrol grubunun katı olarak verildi.

Oil Red O Boyama

Hücreler 6 kuyucuklu mikropalakalara ekildi. 20, 100, 200, 500, 1000 μ M konsantrasyonlarında VA, 1 mM palmitat ile aynı anda 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. Kontrol grubuna ise 0.7 mM yağ asidi içermeyen sığır serum albumini içeren besiyeri uygulandı. Deneysel prosedür sonrası hücreler PBS ile yıkandı, %10 paraformaldehit ile fikse edildi. Devamında %60 isopropanol ile yıkayıp, %60 isopropanol içeren oil red O ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası boya uzaklaştırılarak distile su ile yıkandı ve faz kontrast invert mikroskopu altında mikroskop görüntü yansıtıcı kullanılarak fotoğraflandı (96).

Katalaz Aktivitesi Ölçümü

Supernatant elde edilmesi dahil tüm aşamalar yukarıda trigliserit ölçümünde anlatıldığı şekilde yapıldı. CAT aktivitesi ölçümü Aebi ve ark. (97)'nin yöntemine göre substrat olarak H_2O_2 kullanılarak ve 240 nm'de absorbanstaki azalma ölçülerek yapıldı. Aynı homojenattan protein düzeyleri ticari Optiblot Bradford reaktifi kullanılarak ölçüldü. CAT aktivitesi sonuçları protein düzeylerine oranlandı ve kontrol grubunun ortalamasına oranlanarak kontrol grubunun katı olarak verildi.

AOPP Düzeyi Ölçümü

Katalaz aktivitesi için elde edilen homojenat kullanıldı. Witko-Sarsat ve ark. (54)'nin metoduna göre çalışıldı. Aynı homojenattan protein düzeyleri ticari Optiblot Bradford reaktifi kullanılarak ölçüldü ve AOPP düzeyi sonuçları protein düzeylerine oranlandı ve kontrol grubunun ortalamasına oranlanarak kontrol grubunun katı olarak verildi.

SDS PAGE Elektroforezi ve Western Blot Yöntemleri

Deneysel prosedür sonrası hücreler soğuk PBS ile yıkandı. Hücreler 90°C sıcaklıkta %1 SDS ve 50 mM EDTA içeren 10 mM Tris (pH:8) tamponu ile homojenize edildi. Protein düzeyleri ticari Optiblot Bradford reaktifi kullanılarak ölçüldü. 15 ug protein %4-8 SDS-PAGE jel elektroforezi ile ayrıldı. Proteinler jelden yarı-ıslak western blot sistemi kullanılarak PVDF membrana aktarıldı. %5 yağsız süt tozu ile bir saat inkübe edilen membranlar gece boyu +4 °C'de HSP70 primer antikoru (1:10000 dilüsyon) ile inkübe edildi. Ardından primer antikor ile uyumlu sekonder antikor (1:10000 dilüsyon) ile inkübe edilen membranlardaki spesifik

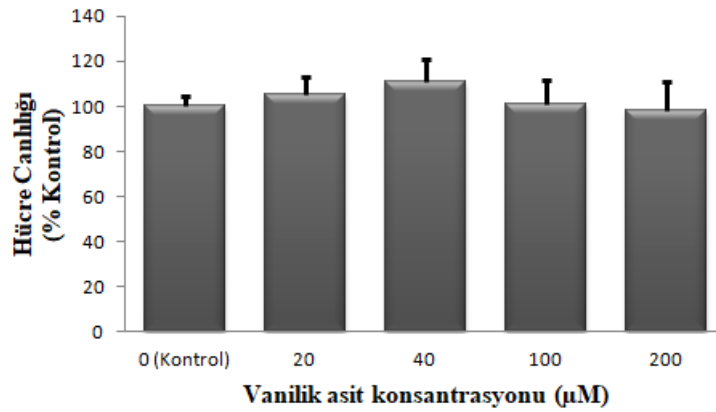
proteinler kemilüminesans substrat ile görüntülendi. Ardından membranlar stribing yapıldı ve membranlar yükleme kontrolü olarak tübülün primer antikoru (1:10000 dilüsyon) ile inkübe edilerek prosedür tekrarlandı. Western blot membranlarının kemilüminesans görüntülenmesi için Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet satın alındı. Elde edilen protein bantlarına ait yoğunluklar Image-J programı (98) kullanılarak hesaplandı ve her bir protein sonucu aynı numunenin tübülün protein düzeyine oranlandı. Her bir grup için sonuçlar aynı deneydeki kontrol grubuna oranlanarak kontrol grubunun katı olarak verildi.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel analizler için SPSS 20 programı (Lisans no: 10240642) kullanıldı. Deney parametrelerinin karşılaştırılması için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey ve Tamhane testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edildi ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Düşük konsantrasyonlarda 24 saat süreyle uygulanan VA'nın HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi Şekil 3'de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası hücre canlılıkları; kontrol grubunda %100±4, 20 µM VA uygulanan hücrelerde %105±8, 40 µM VA uygulanan hücrelerde %111±10, 100 µM VA uygulanan hücrelerde %101±10, 200 µM VA uygulanan hücrelerde %98±13 bulundu. 20, 40, 100 ve 200 µM VA hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak değiştirmede (tümü için p>0.05).

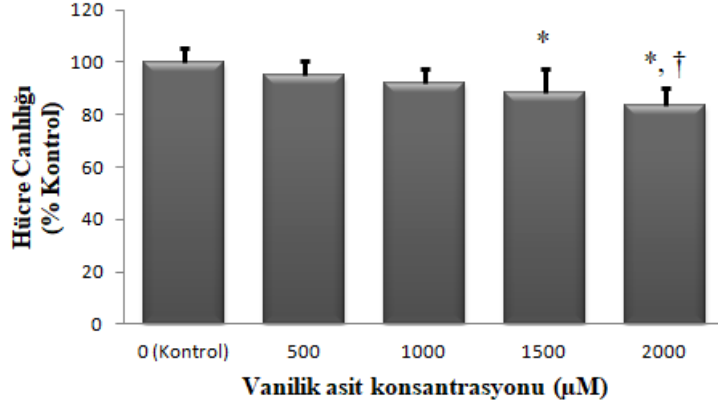


İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi kullanıldı (n=8) (p>0.05).

Şekil 3. Vanillik asidin düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığına etkisi.

Yüksek konsantrasyonlarda 24 saat süreyle uygulanan VA'nın HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi Şekil 4'de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası hücre canlılıkları; kontrol grubunda %100±6, 500 µM VA uygulanan hücrelerde %95±6, 1000 µM VA uygulanan hücrelerde %92±6, 1500 µM VA uygulanan hücrelerde

%88±9, 2000 µM VA uygulanan hücrelerde %83±7 bulundu. 500 ve 1000 µM VA hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak değiştirmediler (her ikisi için p>0.05). 1500 ve 2000 µM VA hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak azalttı (her ikisi için p<0.05). 2000 µM VA uygulanan hücrelerde hücre canlılığı 500 µM VA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azaldı (p<0.05).



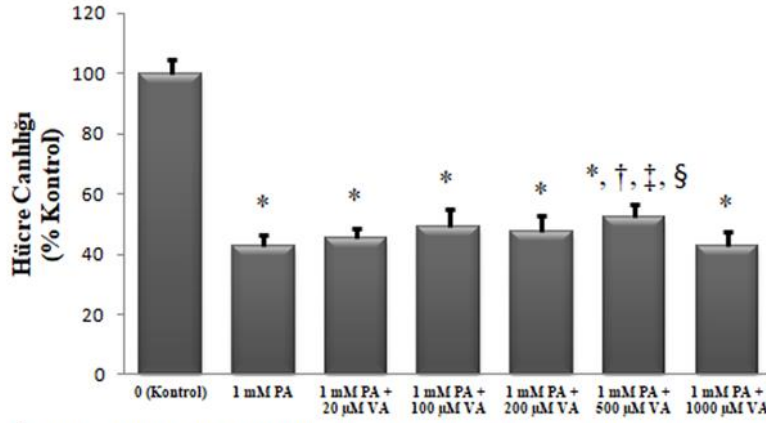
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı (n=8).

*: Kontrol ile karşılaştırıldığında p<0.05.

†: 500 µM vanilic asit uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında p<0.05.

Şekil 4. Vanilic asidin yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığına etkisi.

Vanilic asidin HepG2 hücrelerinde palmitat ile oluşturulan yağlanmada hücre canlılığına etkisi Şekil 5’de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası hücre canlılıkları; kontrol grubunda %100±4, 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde %43±4; 1 mM palmitat ile birlikte 20 µM VA uygulanan hücrelerde %45±4, 100 µM VA uygulanan hücrelerde %49±6, 200 µM VA uygulanan hücrelerde %48±5, 500 µM VA uygulanan hücrelerde %52±4, 1000 µM VA uygulanan hücrelerde %43±5 bulundu. Palmitat uygulanan tüm hücrelerde hücre canlılığı kontrole göre anlamlı olarak azaldı (tümü için p<0.05). 500 µM VA uygulanan hücrelerde hücre canlılığı, sadece palmitat uygulanan hücrelere ve palmitat ile birlikte 20 µM ve 1000 µM VA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak arttı (tümü için p<0.05).



İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı (n=8).

*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

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

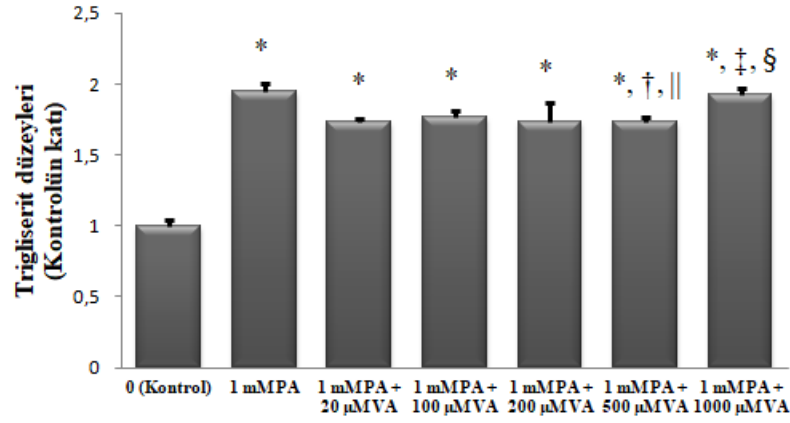
‡: 1 mM PA ile birlikte 20 μM VA uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

§: 1 mM PA ile birlikte 1000 μM VA uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

Şekil 5. Vanilik asidin palmitat ile oluşturulan yağlanmada hücre canlılığına etkisi.

PA: Palmitat; VA: Vanilik asit.

Vanilik asidin palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde trigliserit düzeylerine etkisi Şekil 6'da görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası trigliserit düzeyleri kontrol grubunun ortalamasına bölünerek kontrolün katı olarak verildi. Trigliserit düzeyleri kontrol grubunda 1.00 ± 0.04 , 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde 1.95 ± 0.06 ; 1 mM palmitat ile birlikte 20 μM VA uygulanan hücrelerde 1.73 ± 0.03 , 100 μM VA uygulanan hücrelerde 1.77 ± 0.04 , 200 μM VA uygulanan hücrelerde 1.73 ± 0.14 , 500 μM VA uygulanan hücrelerde 1.73 ± 0.04 , 1000 μM VA uygulanan hücrelerde 1.93 ± 0.04 bulundu. Palmitat uygulanan tüm hücrelerde trigliserit düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak arttı (tümü için $p<0.05$). 500 μM VA uygulanan hücrelerde trigliserit düzeyleri, sadece palmitat uygulanan hücrelere ve palmitat ile birlikte 1000 μM VA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü (her ikisi için $p<0.05$). 1000 μM VA uygulanan hücrelerde trigliserit düzeyleri, palmitat ile birlikte 20 ve 100 μM VA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak yükseldi (her ikisi için $p<0.05$).



İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tamhane testi kullanıldı (n=4).

*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

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

‡: 1 mMPA ile birlikte 20 µM VA uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

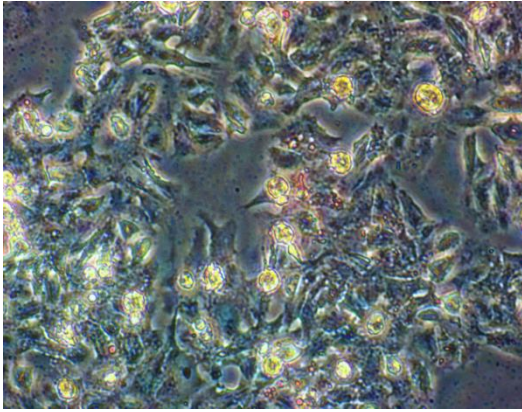
§: 1 mMPA ile birlikte 100 µM VA uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

||: 1 mMPA ile birlikte 1000 µM VA uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

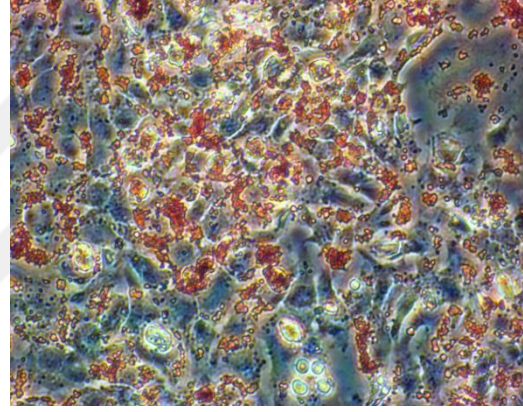
Şekil 6. Vanililik asidin palmitat ile oluşturulan yağlanmada trigliserit düzeylerine etkisi.

PA: Palmitat; VA: Vanililik asit.

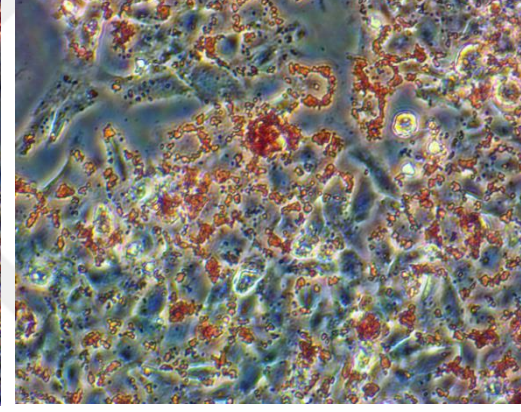
HepG2 hücrelerinde yağlanmayı göstermek için oil red O ile boyanan hücreler Şekil 7’de görülmektedir. Mikroskopik inceleme sonrası palmitat uygulanan hücrelerde kontrole göre yağlanma artışı görüldü.



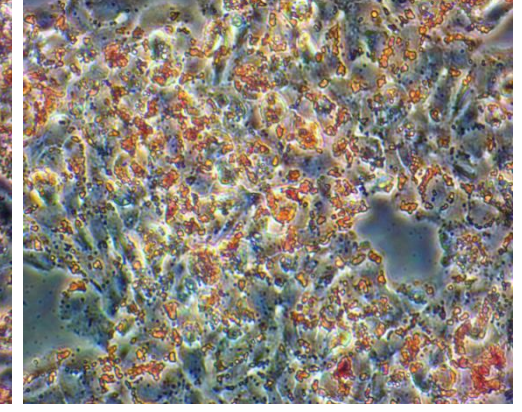
KONROL



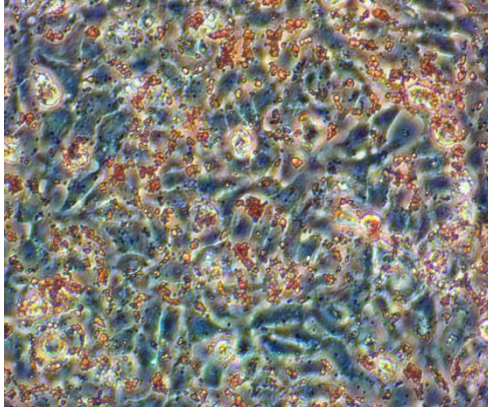
PALMİTAT



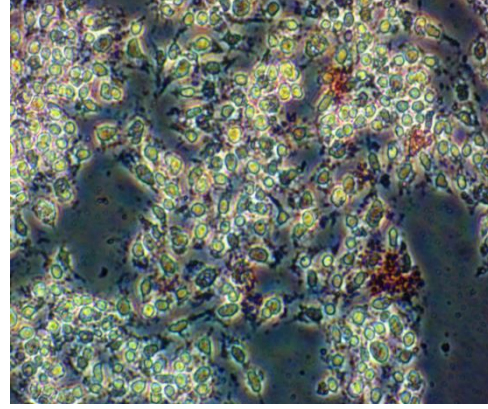
20 μM VA + PALMİTAT



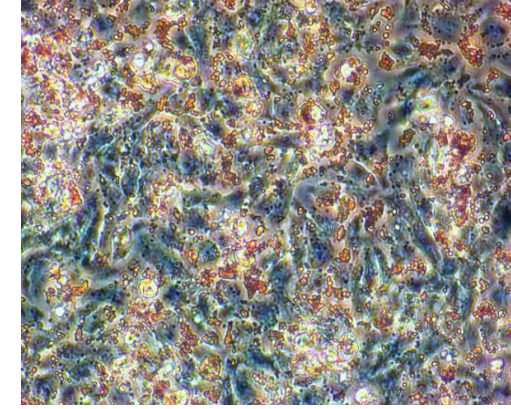
100 μM VA + PALMİTAT



200 μM VA + PALMİTAT



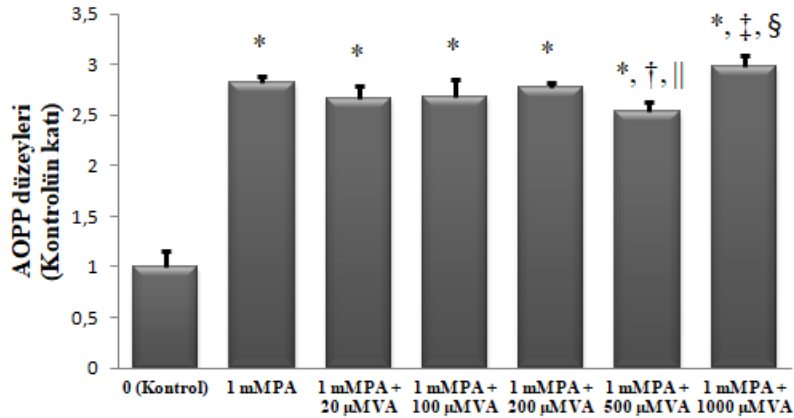
500 μM VA + PALMİTAT



1000 μM VA + PALMİTAT

Şekil 7: HepG2 hücrelerinde vanilik asidin yağlanma üzerine etkisi (Oil Red O boyama, 400X büyütme) (VA; Vanilik asit)

Vanilik asidin palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde AOPP düzeylerine etkisi Şekil 8’de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası AOPP düzeyleri kontrol grubunun ortalamasına bölünerek kontrolün katı olarak verildi. AOPP düzeyleri kontrol grubunda 1.00 ± 0.16 , 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde 2.82 ± 0.07 ; 1 mM palmitat ile birlikte 20 μM VA uygulanan hücrelerde 2.67 ± 0.12 , 100 μM VA uygulanan hücrelerde 2.69 ± 0.16 , 200 μM VA uygulanan hücrelerde 2.77 ± 0.05 , 500 μM VA uygulanan hücrelerde 2.53 ± 0.11 , 1000 μM VA uygulanan hücrelerde 2.99 ± 0.10 bulundu. Palmitat uygulanan tüm hücrelerde AOPP düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak arttı (tümü için $p < 0.05$). 500 μM VA uygulanan hücrelerde AOPP düzeyleri, sadece palmitat uygulanan hücrelere ve palmitat ile birlikte 1000 μM VA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü (her ikisi için $p < 0.05$). 1000 μM VA uygulanan hücrelerde AOPP düzeyleri, palmitat ile birlikte 20 ve 100 μM VA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak yüksekti (her ikisi için $p < 0.05$).



İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı (n=4).

*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

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

‡: 1 mM PA ile birlikte 20 μM VA uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

§: 1 mM PA ile birlikte 100 μM VA uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

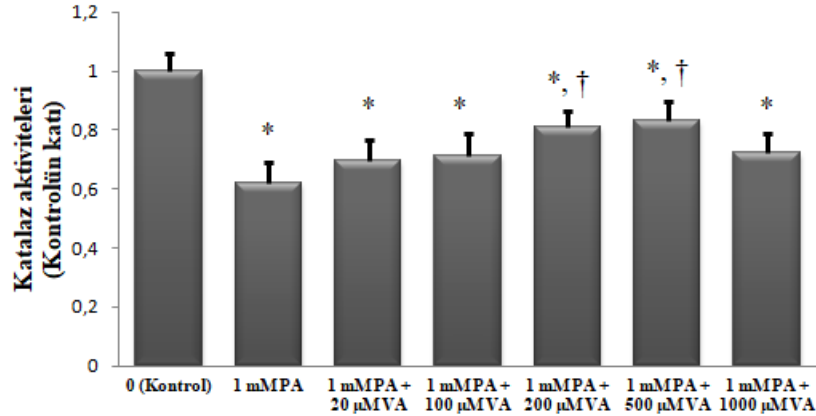
||: 1 mM PA ile birlikte 1000 μM VA uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

Şekil 8. Vanillik asidin palmitat ile oluşturulan yağlanmada ileri oksidasyon protein ürünleri düzeylerine etkisi.

AOPP: İleri oksidasyon protein ürünleri; **PA:** Palmitat; **VA:** Vanilik asit.

Vanilik asidin palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde CAT aktivitesine etkisi Şekil 9’da görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası CAT aktivitesi kontrol grubunun ortalamasına bölünerek kontrolün katı olarak verildi. CAT aktiviteleri kontrol grubunda 1.00 ± 0.06 , 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde 0.62 ± 0.07 ; 1 mM palmitat ile birlikte 20 μM VA uygulanan hücrelerde 0.70 ± 0.07 , 100 μM VA uygulanan

hücrelerde 0.71 ± 0.07 , 200 μM VA uygulanan hücrelerde 0.81 ± 0.06 , 500 μM VA uygulanan hücrelerde 0.83 ± 0.06 , 1000 μM VA uygulanan hücrelerde 0.72 ± 0.07 bulundu. Palmitat uygulanan tüm hücrelerde CAT aktiviteleri kontrole göre anlamlı olarak azaldı (tümü için $p < 0.05$). 200 ve 500 μM VA uygulanan hücrelerde CAT aktiviteleri, sadece palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak yükseldi (her ikisi için $p < 0.05$).



İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı (n=4).

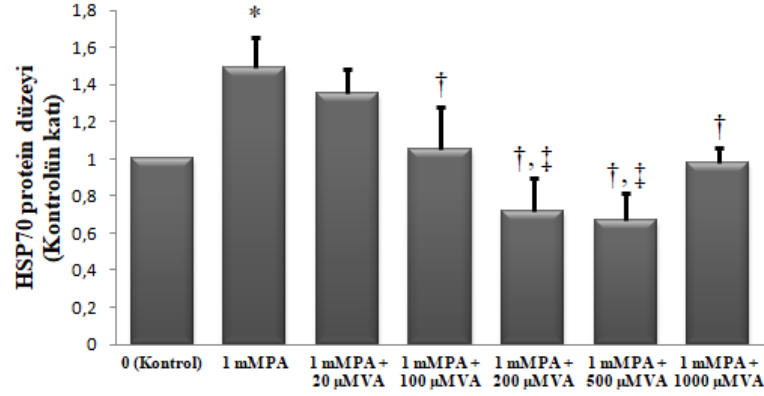
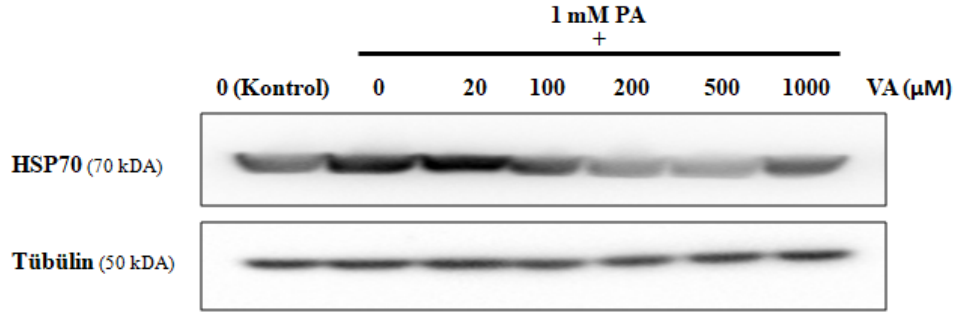
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

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

Şekil 9. Vanililik asidin palmitat ile oluşturulan yağlanmada katalaz aktivitelerine etkisi.

PA: Palmitat; VA: Vanililik asit.

Vanililik asidin palmitat ile yağlanma oluşturulan HepG2 hücrelerinde HSP70 düzeylerine etkisi Şekil 10'da görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası HSP70 düzeyleri; 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde kontrolün 1.49 ± 0.17 katı, 1 mM palmitat ile birlikte 20 μM VA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.36 ± 0.13 katı, 100 μM VA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.05 ± 0.23 katı, 200 μM VA uygulanan hücrelerde kontrolün 0.72 ± 0.18 katı, 500 μM VA uygulanan hücrelerde kontrolün 0.67 ± 0.14 katı, 1000 μM VA uygulanan hücrelerde kontrolün 0.98 ± 0.08 katı bulundu. Tek başına 1 mM palmitat uygulanan hücrelerde HSP70 düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak arttı ($p < 0.05$). 100, 200, 500 ve 1000 μM VA uygulanan hücrelerde HSP70 düzeyleri, sadece palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü (tümü için $p < 0.05$). 200 ve 500 μM VA uygulanan hücrelerde HSP70 düzeyleri, palmitat ile birlikte 20 μM VA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü (her ikisi için $p < 0.05$).



İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı (n=3).

*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

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

‡: 1 mM PA ile birlikte 20 µM VA uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

Şekil 10. Vanillik asidin palmitat ile oluşturulan yağlanmada ısı şok proteini 70 düzeylerine etkisi.

HSP70: Isı şok proteini 70; **PA:** Palmitat; **VA:** Vanillik asit.

Çalışmada elde edilen hücre canlılığı yüzdeleri, trigliserit düzeyleri, AOPP düzeyleri, CAT aktivitesi ve HSP70 protein düzeylerine ait tüm sonuçlar Tablo 1’de görülmektedir.

Tablo 1. Çalışmada elde edilen hücre canlılığı yüzdeleri, trigliserit düzeyleri, ileri protein oksidasyon ürünleri düzeyleri, katalaz aktivitesi ve ısı sok proteini 70 protein düzeylerine ait tüm sonuçlar

HÜCRE CANLILIĞI (% KONTROL)	VA'nın düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığına etkisi	KONTROL		20 µM VA	40 µM VA	100 µM VA	200 µM VA	
		1	93,59	92,94	99,23	87,29	79,23	
		2	93,75	97,78	101,49	89,71	88,26	
	3	97,78	101,98	101,82	96,17	89,07		
	4	101,82	103,91	110,37	98,75	94,88		
	5	102,30	106,49	110,69	102,30	99,56		
	6	102,46	109,24	119,89	107,62	107,46		
	7	102,62	109,88	120,21	113,92	113,92		
	8	105,69	118,43	125,37	114,89	114,08		
VA'nın yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığına etkisi	KONTROL		500 µM VA	1000 µM VA	1500 µM VA	2000 µM VA		
	1	92,70	89,43	83,41	75,28	72,54		
	2	95,24	89,75	85,52	80,03	78,55		
	3	96,92	89,75	88,58	82,88	80,56		
	4	97,98	92,49	90,48	86,37	81,40		
	5	100,51	93,76	95,55	88,69	83,30		
	6	102,73	97,45	96,61	94,39	86,37		
	7	103,05	102,84	96,92	98,51	91,22		
	8	110,86	102,94	97,88	100,73	93,55		
VA'nın palmitat ile yağlanmada hücre canlılığına etkisi	KONTROL		1 mM palmitat	1 mM palmitat + 20 µM VA	1 mM palmitat + 100 µM VA	1 mM palmitat + 200 µM VA	1 mM palmitat + 500 µM VA	1 mM palmitat + 1000 µM VA
	1	92,83	37,03	40,16	42,24	41,72	46,41	35,46
	2	96,48	39,11	42,76	42,76	42,24	48,50	38,07
	3	97,52	40,16	43,29	44,33	44,33	50,07	40,16
	4	99,09	42,76	43,81	46,94	45,89	52,15	42,24
	5	100,65	44,33	44,85	47,46	49,02	52,67	44,85
	6	103,26	44,85	45,37	53,19	50,59	55,28	45,89
	7	104,30	45,37	49,02	56,84	53,72	56,32	46,94
	8	105,87	47,46	51,63	57,89	54,24	57,89	48,50

Tablo 1 (Devam). Çalışmada elde edilen hücre canlılığı yüzdeleri, trigliserit düzeyleri, ileri protein oksidasyon ürünleri düzeyleri, katalaz aktivitesi ve ısı şok proteini 70 protein düzeylerine ait tüm sonuçlar

Trigliserit Düzeyleri (KONTROLÜN KATI)		KONTROL	1 mM palmitat	1 mM palmitat + 20 µM VA	1 mM palmitat + 100 µM VA	1 mM palmitat + 200 µM VA	1 mM palmitat + 500 µM VA	1 mM palmitat + 1000 µM VA
		1	1,03	1,93	1,72	1,73	1,60	1,68
2	0,94	1,97	1,70	1,76	1,63	1,72	1,88	
3	1,00	2,01	1,73	1,82	1,83	1,78	1,95	
4	1,02	1,86	1,77	1,78	1,86	1,74	1,91	
VA'nın palmitat ile oluşturulan yağlanmada AOPP düzeylerine etkisi (KONTROLÜN KATI)		KONTROL	1 mM palmitat	1 mM palmitat + 20 µM VA	1 mM palmitat + 100 µM VA	1 mM palmitat + 200 µM VA	1 mM palmitat + 500 µM VA	1 mM palmitat + 1000 µM VA
		1	1,22	2,82	2,52	2,55	2,84	2,61
2	0,93	2,88	2,82	2,79	2,72	2,41	3,09	
3	0,85	2,85	2,68	2,86	2,74	2,63	2,98	
4	0,99	2,72	2,66	2,55	2,80	2,47	2,85	
VA'nın palmitat ile oluşturulan yağlanmada CAT aktivitesine etkisi (KONTROLÜN KATI)		KONTROL	1 mM palmitat	1 mM palmitat + 20 µM VA	1 mM palmitat + 100 µM VA	1 mM palmitat + 200 µM VA	1 mM palmitat + 500 µM VA	1 mM palmitat + 1000 µM VA
		1	1,02	0,54	0,66	0,81	0,86	0,86
2	0,92	0,70	0,68	0,67	0,77	0,90	0,63	
3	1,06	0,66	0,65	0,73	0,75	0,76	0,71	
4	1,00	0,59	0,80	0,64	0,86	0,80	0,78	
VA'nın palmitat ile oluşturulan yağlanmada HSP70 düzeylerine etkisi (KONTROLÜN KATI)		KONTROL	1 mM palmitat	1 mM palmitat + 20 µM VA	1 mM palmitat + 100 µM VA	1 mM palmitat + 200 µM VA	1 mM palmitat + 500 µM VA	1 mM palmitat + 1000 µM VA
		1	1,00	1,64	1,21	0,85	0,63	0,59
2	1,00	1,31	1,41	1,01	0,59	0,59	1,04	
3	1,00	1,52	1,44	1,30	0,92	0,83	1,00	

VA: Vanilik asit; **AOPP:** İleri oksidasyon protein ürünleri; **CAT:** Katalaz; **HSP70:** Isı şok proteini 70

TARTIŞMA

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, dünyada en sık görülen karaciğer hastalığıdır ve aşırı alkol tüketmeyen hastaların karaciğerinde yağ birikmesi olarak tanımlanır (2). Artan diyabet ve obezitenin NAFLD prevalansını arttırması nedeniyle siroz ve son dönem karaciğer hastalığı görülme sıklığının da gittikçe artması beklenmektedir. Artmış morbidite ve mortalite, sağlık maliyetleri ve sağlığa bağlı yaşam kalitesinin düşmesi NAFLD'yi zorlu bir hastalık haline getirmektedir ve bu hastalığın daha derinlemesine araştırılması gerektirmektedir (99).

Hepatik steatozun in vitro olarak incelenmesi için, insan HepG2 hücrelerinin serbest yağ asitleri ile muamele edilmesiyle bir yağlanma modeli oluşturulmuştur (6). İnsan vücudundaki temel yağ asitleri olan palmitik asit ve oleik asit, in vitro steatozu indüklemek için yaygın olarak kullanılan yağ asitleridir (8).

Vanilik asit tatlandırıcı olarak kullanılan benzoik asit türevidir, immün aracılı karaciğer inflamasyonuna baskılayıcı etkisi ve hepatoprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir (100).

Literatürde VA'nın HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisini gösteren tek bir çalışma bulunmaktadır. Jung ve ark. (22) 0-20 μM arası konsantrasyonlarda 48 saat süreyle uygulanan 20 μM konsantrasyonda VA'nın hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığını bildirmiştir. Çalışmamızda ise HepG2 hücrelerine öncelikle 20-2000 μM konsantrasyonları arası VA 24 saat boyunca uygulanarak VA'nın hücre canlılığı üzerine etkisi araştırıldı. 20-1000 μM arası konsantrasyonlarda VA HepG2 hücrelerinde hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmezken, 1000 μM üzeri VA konsantrasyonları hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı ve bu sebeple palmitat ile yağlanmaya karşı 1000 μM 'a kadar VA konsantrasyonları uygulandı.

HepG2 hücrelerinde deneysel NAFLD modeli oluşturmak için palmitat yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak palmitat uygulanan gruplarda hücre

canlılığı azaldı, hücre içi trigliserit düzeyi ise arttı. Palmitat uygulamasının hücre içi lipit içeriğini arttırdığı mikroskopik olarak oil red O boyama ile de görüldü (8,101). Bu bulgularımız HepG2 hücrelerinde palmitat ile oluşturulan hücreSEL NAFLD modelinin başarılı olarak gerçekleştiğini ve 1mM palmitat dozunun bu modeli oluşturmak için yeterli olduğunu göstermektedir.

Jung ve ark. (22) 0-10 μ M arası konsantrasyonlarda 24 saat süreyle uygulanan VA'nın 10 μ M konsantrasyonda yağlanmayı anlamlı olarak azalttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise sadece 500 μ M VA uygulamasının yağlanmayı anlamlı olarak azalttığı görülmüştür.

Oksidatif stres, hepatosit içinde aşırı ROS üretimi veya azalmış antioksidan savunmaların bir sonucu olarak ortaya çıkar ve hastalığın gelişmesinde en önemli nedenler arasındadır (51). Oksidatif stres bozulmuş mitokondriyal β -oksidasyona neden olur. β -oksidasyonun bozulması hepatositler içinde yağ asitlerinin birikmesine ve ROS'un mitokondri tarafından aşırı üretilmesi lipit peroksidasyonuna neden olabilir. Bu hepatik steatoz ve NASH'ın indüksiyonunda önemli bir rol oynayabilir (46). Antioksidan sistemler oksidatif stres ile başa çıkmak için gereklidir. CAT oksidatif stres seviyesini değerlendirmek için kullanılan antioksidan bir enzimdir (49). Aerobik hücrelerin çoğunda bulunan CAT, H_2O_2 'nin ayrışmasını katalizleyerek hücreyi oksidatif strese karşı korur (102).

Literatürde yağlı karaciğerde CAT ekspresyonu veya aktivitesi ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Perlemuter ve ark. (103) NAFLD hastalarının karaciğer CAT aktivitelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bunun inflamasyon ve fibrojenizde rol oynayan oksidatif stresi yansıttığını olabileceğini bildirmişlerdir. Kumar ve ark. (104) NAFLD'li hastalarda oksidatif stresin varlığını CAT ve diğer bazı antioksidan enzimler ile göstermiş ve NAFLD'li hastalarda sağlıklı bireylere kıyasla eritrosit CAT aktivitesinin anlamlı derecede azaldığını bildirmişlerdir. Jain ve ark. (105) HepG2 hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada, kontrol gruplarına kıyasla palmitat ile tedavi edilen grupta, CAT ve diğer çeşitli antioksidan biyobelirteçlerin mRNA ekspresyonunda azalma olduğunu göstermişlerdir. Murakami ve ark. (106) yüksek yağlı diyet ile NAFLD modeli oluşturulan farelerde, karaciğerdeki oksidatif stresi, azalmış CAT aktivitesi ile göstermişlerdir. Literatürde NAFLD'de VA'nın CAT aktivitesi üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda palmitat uygulanan hücrelerde kontrole kıyasla CAT aktivitesinin azalmış olduğu görüldü. Palmitat ile birlikte VA uygulanan hücrelerde palmitat grubuna kıyasla CAT aktivitesinde doza bağlı bir şekilde artış olduğu, özellikle 200 μ M ve 500 μ M VA uygulanan hücrelerde CAT aktivitesinde anlamlı artış olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu, 200 μ M ve 500 μ M

konsantrasyonlarında VA'nın HepG2 hücrelerini oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

İleri oksidasyon protein ürünleri, oksidanların plazma proteinleriyle reaksiyonu sonucu oluşan, birçok hastalıkta yaygın olarak ölçülen bir oksidatif stres belirteçidir (13). Çiftçi ve ark. (62) NAFLD'li bireylerin serum AOPP düzeyinin sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak artmış olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da kontrole kıyasla palmitat ile yağlanma oluşturulan hücrelerde AOPP düzeyleri artmıştır. Bu bulgumuz Çiftçi ve ark. (62)'nin çalışması ile uyumludur. VA uygulanan hücrelerde ise sadece palmitat uygulanan hücrelere göre AOPP düzeylerinde azalma gözlenmesine rağmen sadece 500 µM VA grubunda anlamlı azalma saptanmıştır. Ayrıca 1000 µM VA uygulanan hücrelerde AOPP düzeyi 20 µM ve 100 µM VA uygulananlara göre anlamlı olarak artmıştır. Bu bulgu 1000 µM üzerindeki konsantrasyonların oksidatif stresi önlemediğinin bir göstergesidir.

Isı şok proteinleri ailesinin 70 kDa'lık üyesi olan HSP70 (107), prokaryotlardan ökaryotlara kadar çeşitli hücre tiplerinin sitozol ve subselüler kompartmanlarında (örneğin, çekirdek, mitokondri) bulunur. HSP70'in intrasellüler sitoprotektif etkisi ve şaperon özelliği bulunmaktadır. Isı stresi, iskemi reperfüzyon, ağır metallere maruz kalma ve oksidatif stres gibi faktörler HSP70 ekspresyonunu indükleyebilir (108).

Zhang ve ark. (81) yüksek yağlı diyet ile beslenmiş farelerde ve HepG2 hücrelerinde palmitat ile oluşturulmuş NAFLD modelinde HSP70 mRNA ekspresyonunun ve protein düzeyinin belirgin bir şekilde arttığını, HSP70'in aşırı ekspresyonunun, lipojenik genlerin mRNA ekspresyonlarında ve trigliserit ve total kolesterol sentezinde artışa neden olduğunu, böylece, HSP70'in HepG2 hücrelerinde hepatik steatozu desteklediğini bildirmişlerdir. Zhang ve ark. (81) ayrıca HSP70'i kodlayan HSPA1A geninin aşırı ekspresyonunun HepG2 hücrelerinde lipit birikimini desteklediğini, bu genin bloke edilmesinin ise lipit birikiminin ve lipojenik genlerin ekspresyonlarının azalmasına neden olduğunu bilmişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde sadece palmitat uygulanan hücrelerde HSP70 protein düzeyi kontrole göre yüksekti. Ayrıca VA uygulanan hücrelerde, sadece palmitat uygulanan hücrelere kıyasla özellikle 200 µM ve 500 µM konsantrasyonlarında VA'nın HSP70 protein düzeylerini anlamlı olarak azalttığı gözlenmiştir. Bu bulgumuz, 200 µM ve 500 µM konsantrasyonlarında VA'nın HepG2 hücrelerini oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Bilindiği üzere NAFLD patogeneğinde artan serbest yağ asidi ve kolestrol kaynaklı lipit birikimi lipotoksisiteye yol açmakta ve ardından ER stresi ve oksidatif stres ile ilişkili mekanizmalar aktive edilmektedir (32). Literatürde VA'nın NAFLD veya başka hastalıklarda HSP70 düzeylerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda 200 µM ve 500

μM VA ile tedavi edilen hücrelerde, palmitat ile tedavi edilen hücelere kıyasla HSP70 protein düzeyleri azaldı.

Sonuç olarak çalışmamız VA'nın, karaciğer hepatoma hücrelerinde hücre canlılığını arttırdığını, hücre içi yağlanmayı, oksidatif stresi ve HSP70 protein düzeyini azalttığını gösterdi. Bu açılardan VA, NAFLD'nin önlenmesi için faydalı olabilir.



SONUÇLAR

Bu çalışmada deneysel NAFLD modeli oluşturulan HepG2 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda vanilik asidin, hücre canlılığına, hücre içi yağlanmaya, oksidatif strese ve HSP70 protein düzeylerine etkisini göstermeyi amaçladık. Vanilik asidin hücre canlılığına etkisini MTT testiyle, yağlanma üzerine etkisini trigliserit ölçümü ve oil Red O boyama ile, CAT aktivitesine etkisini Aebi ve ark. (97)'nin metoduna göre, AOPP düzeyleri Witko-Sarsat ve ark. (54)'nin metoduna göre ve HSP70 protein düzeylerini Western Blot yöntemiyle ölçtük. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar şunlardır:

1. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 20 μM , 40 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM ve 1000 μM VA hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak değiştirmedir. 1500 μM ve 2000 μM VA hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak azalttı. 2000 μM VA uygulanan hücrelerde hücre canlılığı 500 μM VA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azaldı.
2. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 1mM palmitat hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı, palmitat ile birlikte 500 μM VA uygulanan hücrelerde hücre canlılığı, sadece palmitat uygulanan hücrelere ve palmitat ile birlikte 20 μM ve 1000 μM VA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak arttı.
3. 1mM palmitat trigliserit düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırdı, palmitat ile birlikte 500 μM VA uygulanan hücrelerin trigliserit düzeyleri, sadece palmitat uygulanan hücrelere ve palmitat ile birlikte 1000 μM VA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalırken, 1000 μM VA uygulanan hücrelerin trigliserit düzeyleri, palmitat ile birlikte 20 μM ve 100 μM VA uygulanan hücrelerin trigliserit düzeylerine göre anlamlı olarak yüksekti.

4. Palmitat uygulanan HepG2 hücrelerinin oil Red O ile boyanmasının kontrole göre fazla olduğu gözle görüldü. Palmitat ile birlikte uygulanan VA konsantrasyonlarının sadece palmitat uygulanan hücrelere göre oil Red O ile boyanmayı gözle görünür şekilde azalttı.

5. Palmitat uygulanan hücrelerde CAT aktivitesi kontrole göre anlamlı olarak azaldı, palmitat ile birlikte 200 μM ve 500 μM VA uygulanan hücrelerin CAT aktiviteleri, sadece palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak arttı.

6. Palmitat uygulanan hücrelerde AOPP düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak yüksekti. Palmitat ile birlikte 500 μM VA uygulanan hücrelerde AOPP düzeyleri, sadece palmitat uygulanan hücrelere ve palmitat ile birlikte 1000 μM VA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü. 1000 μM VA uygulanan hücrelerde AOPP düzeyleri, palmitat ile birlikte 20 μM ve 100 μM VA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak yüksekti.

7. Palmitat uygulanan hücrelerde HSP70 düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak arttı, palmitat ile birlikte uygulanan 100 μM , 200 μM , 500 μM ve 1000 μM VA konsantrasyonları hücrelerin HSP70 düzeylerini, sadece palmitat uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı. Palmitat ile birlikte 200 μM ve 500 μM VA uygulanan hücrelerde HSP70 düzeyleri, palmitat ile birlikte 20 μM VA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü.

Sonuç olarak bulgularımız, VA'nın palmitat ile NAFLD modeli oluşturulan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde, hücre canlılığını ve CAT aktivitesini arttırdığını, yağlanmayı, AOPP ve HSP70 protein düzeylerini azalttığını gösterdi.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı palmitat ile non-alkolik yağlı karaciğer modeli oluşturulan HepG2 hücrelerinde vanilik asidin hücre canlılığına, yağlanmaya, oksidatif strese ve ısı şok proteini 70 düzeylerine etkisini araştırmaktır.

Non-alkolik yağlı karaciğer modeli oluşturmak için HepG2 hücreleri 1 mM palmitat ile 24 saat inkübe edildi. Hücre canlılığı 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür testi ile ölçüldü. Yağlanma; trigliserit düzeyleri ticari kitler ile ölçülerek ve oil red O boyama ile mikroskopik olarak gösterildi. İleri oksidasyon protein ürünleri, ve katalaz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Isı şok proteini 70 düzeyleri western blot yöntemi ile ölçüldü.

1500 ve 2000 μ M vanilik asit HepG2 hücrelerinde canlılığı anlamlı olarak azalttı ($p<0.05$) ve bu sebeple 0-1000 μ M arası vanilik asidin non-alkolik yağlı karaciğer modelinde etkisi araştırıldı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1 mM palmitat hücre canlılığını ve katalaz aktivitesini anlamlı olarak azalttı ve trigliserit, ileri oksidasyon protein ürünleri ve ısı şok proteini 70 düzeylerini anlamlı olarak arttırdı (tümü için $p<0.05$). 1 mM palmitat uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında 1 mM palmitat ile birlikte uygulanan 500 μ M vanilik asit; hücre canlılığını ve katalaz aktivitesini anlamlı olarak arttırırken trigliserit, ileri oksidasyon protein ürünleri ve ısı şok proteini 70 düzeylerini anlamlı olarak azalttı (tümü için $p<0.05$). 1 mM palmitat uygulan hücreler ile karşılaştırıldığında 1 mM palmitat ile birlikte uygulanan 200 μ M vanilik asit ısı şok proteini 70 düzeylerini anlamlı olarak azalttı ($p<0.05$).

Sonuç olarak çalışmamız; palmitat ile non-alkolik yağlı karaciğer modeli oluşturulan HepG2 hücrelerinde vanilik asidin, özellikle 500 μ M konsantrasyonda, hücre canlılığını

arttırdığını ve yağlanmayı, oksidatif stresi ve ısı şok proteini 70 düzeylerini ise azalttığını gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Vanilik asit (VA), Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), Isı şok proteini 70 (HSP70), İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (AOPP), Katalaz (CAT).



EFFECT OF VANILLIC ACID ON OXIDATIVE STRESS AND HSP 70 PROTEIN LEVELS IN PALMITATE-INDUCED STEATOSIS IN HUMAN-DERIVED HEPATOMA CELLS

SUMMARY

The aim of this study is to investigate the effect of vanillic acid on cell viability, steatosis, oxidative stress and heat shock protein 70 levels in palmitate-induced non-alcoholic fatty liver disease model in HepG2 cells.

To induce non-alcoholic fatty liver disease model, HepG2 cells were incubated with 1 mM palmitate for 24 hours. Cell viability was measured by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay. Steatosis was shown by measuring triglyceride levels with commercial kits and by microscopically with oil red O staining. Advanced oxidation protein products and catalase activity were measured spectrophotometrically. Heat shock protein 70 levels were measured by western blot.

1500 ve 2000 μ M vanillic acid significantly decreased the viability of HepG2 cells and therefore effect of vanillic acid on non-alcoholic fatty liver disease were investigated at the vanilic acid concentrations between 0-1000 μ M. When compared with control group, 1 mM palmitate significantly decreased cell viability and catalase activity and significantly increased triglyceride, advanced oxidation protein products and heat shock protein 70 levels ($p < 0.05$ for all). When compared with 1 mM palmitate incubated cells, 500 μ M vanillic acid incubated with 1 mM palmitate significantly increased cell viability and catalase activity and significantly decreased triglyceride, advanced oxidation protein products and heat shock protein 70 levels

($p < 0.05$ for all). When compared with 1 mM palmitate incubated cells, 200 μM vanillic acid incubated with 1 mM palmitate significantly decreased heat shock protein 70 levels ($p < 0.05$).

As a result, our study showed that vanillic acid, especially at 500 μM concentration, increases cell viability and decreases steatosis, oxidative stress and heat shock protein 70 levels in palmitate-induced non-alcoholic fatty liver disease model in HepG2 cells.

Key Words: Vanillic acid (VA), Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), Heat Shock Protein 70 (HSP70), Advanced oxidation protein products (AOPP), Catalase (CAT)



KAYNAKLAR

1. Dumitrascu DL, Neuman MG. Non-alcoholic fatty liver disease: an update on diagnosis. *Clujul Med* 2018;91(2):147-150.
2. Meng Y, Liu Y, Fang N, Guo Y. Hepatoprotective effects of cassia semen ethanol extract on non-alcoholic fatty liver disease in experimental rat. *Pharm Biol* 2019;57(1):98-104.
3. Leoni S, Tovoli F, Napoli L, Serio I, Ferri S, Bolondi L. Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review with comparative analysis. *World J Gastroenterol* 2018;24(30):3361-73.
4. Munteanu MA, Nagy GA, Mircea PA. Current management of NAFLD. *Clujul Med* 2016;89(1):19-23.
5. Lonardo A, Ballestri S, Guaraldi G, Nascimbeni F, Romagnoli D, Zona S. et al. Fatty liver is associated with an increased risk of diabetes and cardiovascular disease - Evidence from three different disease models: NAFLD, HCV and HIV. *World J Gastroenterology* 2016;22(44):9674-9693.
6. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* 2007;165(2):106-16.
7. Bouma ME, Rogier E, Verthier N, Labarre C, Feldmann G. Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989;25(3 Pt 1):267-75.
8. Liang H, Zhang L, Wang H, Tang J, Yang J, Wu C, et al. Inhibitory effect of gardenoside on free fatty acid-induced steatosis in HepG2 hepatocytes. *Int J Mol Sci* 2015;16(11):27749-56.

9. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* 2004;106(6):635-43.
10. Moravcová A, Červinková Z, Kučera O, Mezera V, Rychtrmoc D, Lotková H. The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. *Physiol Res* 2015;64 Suppl 5:S627-36.
11. Shin SK, Cho HW, Song SE, Bae JH, Im SS, Hwang I, et al. Ablation of catalase promotes non-alcoholic fatty liver via oxidative stress and mitochondrial dysfunction in diet-induced obese mice. *Pflugers Arch* 2019.
12. Kayalı R, Çakatay U. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpaşa J Med* 2004;35(2):83-9.
13. Grysczyńska B, Formanowicz D, Budzyń M, Wanic-Kossowska M, Pawliczak E, Formanowicz P, et.al. Advanced oxidation protein products and carbonylated proteins as biomarkers of oxidative stress in selected atherosclerosis-mediated diseases. *Biomed Res Int* 2017;2017:4975264.
14. Reeg S, Jung T, Castro JP, Davies KJA, Henze A, Grune T. The molecular chaperone Hsp70 promotes the proteolytic removal of oxidatively damaged proteins by the proteasome. *Free Radic Biol Med* 2016;99:153-66.
15. Kettern N, Dreiseidler M, Tawo R, Höhfeld J. Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. *Biol Chem* 2010;391(5):481-9.
16. Qu B, Jia Y, Liu Y, Wang H, Ren G, Wang H. The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell Stress Chaperones* 2015;20(6):885-92.
17. Ore A, Akinloye OA. Oxidative stress and antioxidant biomarkers in clinical and experimental models of non-alcoholic fatty liver disease. *Medicina (Kaunas)* 2019;55(2):26.
18. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 2014;15(4):6184-223.
19. Shin SK, Cho HW, Song SE, Song DK. Catalase and nonalcoholic fatty liver disease. *Pflugers Arch* 2018;470(12):1721-37.
20. Rasheeda K, Bharathy H, Nishad Fathima N. Vanillic acid and syringic acid: exceptionally robust aromatic moieties for inhibiting in vitro self-assembly of type I collagen. *Int J Biol Macromol* 2018;113:952-60.

21. Sindhu G, Nishanthi E, Sharmila R. Nephroprotective effect of vanillic acid against cisplatin induced nephrotoxicity in wistar rats: a biochemical and molecular study. *Environ Toksikol Pharmacol* 2015;39(1):392–404.
22. Jung Y, Park J, Kim HL, Sim JE, Youn DH, Kang J, et al. Vanillic acid attenuates obesity via activation of the AMPK pathway and thermogenic factors in vivo and in vitro. *FASEB J* 2018;32(3):1388-1402.
23. Takahashi Y, Sugimoto K, Inui H, Fukusato T. Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholicsteatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2015;21(13):3777-85.
24. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol* 2015;62(1 Suppl):S47-64.
25. Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010;28(1):155-61.
26. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011;140(1):124-31.
27. Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 2009;13(1):9-19.
28. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34(3):274-85.
29. Satapathy SK, Sanyal AJ. Epidemiology and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2015;35(3):221-35.
30. Marzuillo P, Grandone A, Perrone L, Miraglia Del Giudice E. Understanding the pathophysiological mechanisms in the pediatric non-alcoholic fatty liver disease: the role of genetics. *World J Hepatol* 2015;7(11):1439-43.
31. Giorgio V, Prono F, Graziano F, Nobili V. Pediatric non alcoholic fatty liver disease: old and new concepts on development, progression, metabolic insight and potential treatment targets. *BMC Pediatr* 2013;13:40.
32. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 2016;65(8):1038-48.
33. Perla FM, Prelati M, Lavorato M, Visicchio D, Anania C. The role of lipid and lipoprotein metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Children (Basel)* 2017;4(6):46.

34. Kitade H, Chen G, Ni Y, Ota T. Nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance: new insights and potential new treatments. *Nutrients* 2017;9(4):387.
35. Bieghs V, Trautwein C. Innate immune signaling and gut-liver interactions in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2014;3(6):377-85.
36. El Hadi H, Vettor R, Rossato M. Vitamin E as a treatment for nonalcoholic fatty liver disease: reality or myth? *Antioxidants (Basel)* 2018;7(1):12.
37. Adams LA, Angulo P. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J* 2006;82(967):315-22.
38. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM* 2010;103(2):71-83.
39. Lam B, Younossi ZM. Treatment options for nonalcoholic fatty liver disease. *Therap Adv Gastroenterol* 2010;3(2):121-37.
40. Kanuri G, Bergheim I. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Int J Mol Sci* 2013;14(6):11963-80.
41. Gunn PJ, Green CJ, Pramfalk C, Hodson L. In vitro cellular models of human hepatic fatty acid metabolism: differences between Huh7 and HepG2 cell lines in human and fetal bovine culturing serum. *Physiol Rep* 2017;5(24):e13532.
42. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:8416763.
43. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 2012;52(1):59–69.
44. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012;5(1):9-19.
45. Mann JP, Raponi M, Nobili V. Clinical implications of understanding the association between oxidative stress and pediatric NAFLD. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;11(4):371-82.
46. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol* 2014;20(25):8082-91.
47. Fujii J, Homma T, Kobayashi S, Seo HG. Mutual interaction between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of diseases specifically focusing on non-alcoholic fatty liver disease. *World J Biol Chem* 2018;9(1):1-15.

48. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281(5):G1135–9.
49. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci* 2015;16(11):26087-124.
50. Grattagliano I, de Bari O, Bernardo TC, Oliveira PJ, Wang DQ, Portincasa P. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease—from origin to propagation. *Clin Biochem* 2012;45(9):610–8.
51. Ucar F, Sezer S, Erdogan S, Akyol S, Armutcu F, Akyol O. The relationship between oxidative stress and nonalcoholic fatty liver disease: its effects on the development of nonalcoholic steatohepatitis. *Redox Rep* 2013;18(4):127-33.
52. Zhang W, Xiao S, Ahn DU. Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2013;53(11):1191-201.
53. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 2000;32(3-4):307-26.
54. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49(5):1304-13.
55. Piwowar A. Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property. *Pol Merkur Lekarski* 2010;28(164):166-9.
56. Ou H, Huang Z, Mo Z, Xiao J. The characteristics and roles of advanced oxidation protein products in atherosclerosis. *Cardiovasc Toxicol* 2017;17(1):1-12.
57. Ozenirler S, Erkan G, Konca Degertekin C, Ercin U, Cengiz M, Bilgihan A, et al. The relationship between advanced oxidation protein products (AOPP) and biochemical and histopathological findings in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Dig Dis* 2014;15(3):131-6.
58. Marsche G, Frank S, Hrzenjak A, Holzer M, Dirnberger S, Wadsack C, et al. Plasma-advanced oxidation protein products are potent high-density lipoprotein receptor antagonists in vivo. *Circ Res* 2009;104(6):750-7.
59. Witko-Sarsat V, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products: novel uraemic toxins and pro-inflammatory mediators in chronic renal failure? *Nephrol Dial Transplantation* 1997;12(7):1310-2.
60. Garibaldi S, Barisione C, Marengo B, Ameri P, Brunelli C, Balbi M, et al. Advanced oxidation protein products-modified albumin induces differentiation of RAW264.7

- macrophages into dendritic-like cells which is modulated by cell surface thiols. *Toxins (Basel)* 2017;9(1):27.
61. Başkol M, Dolbun Seçkin K, Başkol G. Advanced oxidation protein products, total thiol levels and total oxidant/antioxidant status in patients with nash. *Turk J Gastroenterol* 2014;25 Suppl 1:32-7.
 62. Çiftci A, Yilmaz B, Köklü S, Yüksel O, Özsoy M, Erden G, et al. Serum levels of nitrate, nitrite and advanced oxidation protein products (AOPP) in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Acta Gastroenterol Belg* 2015;78(2):201-5.
 63. Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H. Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene* 1989;79(2):279-88.
 64. Quan F, Korneluk RG, Tropak MB, Gravel RA. Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Res* 1986;14(13):5321-35.
 65. Reimer DL, Bailey J, Singh SM. Complete cDNA and 5' genomic sequences and multilevel regulation of the mouse catalase gene. *Genomics* 1994;21(2):325-36.
 66. Scibior D, Czeczot H. Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2006;60:170-80.
 67. Steinbrenner H, Sies H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790(11):1478-85.
 68. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem* 2017;398(10):1095-1108.
 69. Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Žák A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha)* 2014;60(4):153-67.
 70. Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem* 2004;279(31):32804-12.
 71. Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 1986;55:1151-91.
 72. Park CJ, Seo YS. Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones for plant immunity. *Plant Pathol J* 2015;31(4):323-33.
 73. Li Z, Srivastava P. Heat-shock proteins. *Curr Protoc Immunol* 2004;Appendix 1:Appendix 1T.
 74. Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg* 1999;29(4):748-51.

75. Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 2007;581(19):3702-10.
76. Schilke BA, Ciesielski SJ, Ziegelhoffer T, Kamiya E, Tonelli M, Lee W, et al. Broadening the functionality of a J-protein/Hsp70 molecular chaperone system. *PLoS Genet* 2017;13(10):e1007084.
77. Brodsky JL, Chiosis G. Hsp70 molecular chaperones: emerging roles in human disease and identification of small molecule modulators. *Curr Top Med Chem* 2006;6(11):1215-25.
78. Merchant S, Korbelik M. Heat shock protein 70 is acute phase reactant: response elicited by tumor treatment with photodynamic therapy. *Cell Stress Chaperones* 2011;16(2):153-62.
79. Gehrman M, Cervello M, Montalto G, Cappello F, Gulino A, Knape C, et al. Heat shock protein 70 serum levels differ significantly in patients with chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Front Immunol* 2014;5:307.
80. Honsawek S, Udomsinprasert W, Jirathanathornnukul N, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. Elevated serum heat shock protein 70 and liver stiffness reflect hepatic dysfunction and severity in postoperative biliary atresia. *Pediatr Surg Int* 2017;33(8):893-9.
81. Zhang J, Fan N, Peng Y. Heat shock protein 70 promotes lipogenesis in HepG2 cells. *Lipids Health Dis* 2018;17(1):73.
82. Kumar S, Prahalathan P, Raja B. Antihypertensive and antioxidant potential of vanillic acid, a phenolic compound in L-NAME-induced hypertensive rats: a dose-dependence study. *Redox Rep* 2011;16(5):208-15.
83. Kumar S, Prahalathan P, Saravanakumar M, Raja B. Vanillic acid prevents the deregulation of lipid metabolism, endothelin 1 and up regulation of endothelial nitric oxide synthase in nitric oxide deficient hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2014;743:117-25.
84. Huang SM, Chuang HC, Wu CH, Yen GC. Cytoprotective effects of phenolic acids on methylglyoxal-induced apoptosis in Neuro-2A cells. *Mol Nutr Food Res* 2008;52(8):940-9.
85. Lesage-Meessen L, Delattre M, Haon M, Thibault JF, Ceccaldi BC, Brunerie P, et al. A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *J Biotechnol* 1996;50(2-3):107-13.
86. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000484> Erişim tarihi: 17.04.2019
87. Varma RS, Shukla A, Chatterjee RK. Evaluation of vanillic acid analogues as a new class of antifilarial agents. *Indian J Exp Biol* 1993;31(10):819-21.
88. Singh M, Tiwari V, Jain A, Ghoshal S. Protective activity of picroliv on hepatic amoebiasis associated with carbon tetrachloride toxicity. *Indian J Med Res* 2005;121(5):676-82.

89. Hsu CL, Yen GC. Effects of flavonoids and phenolic acids on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *J Agric Food Chem* 2007;55(21):8404-10.
90. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Kobayashi M, Tamesada M, et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 2009;32(7):1215-9.
91. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2):55-63.
92. Ahmadian S, Barar J, Saei AA, Fakhree MA, Omid Y. Cellular toxicity of nanogenomedicine in MCF-7 cell line: MTT assay. *J Vis Exp* 2009;(26):1191.
93. Xu S, Nam SM, Kim JH, Das R, Choi SK, Nguyen TT, et al. Palmitate induces ER calcium depletion and apoptosis in mouse podocytes subsequent to mitochondrial oxidative stress. *Cell Death Dis* 2015;6:e1976.
94. Yang X, Chan C. Repression of PKR mediates palmitate-induced apoptosis in HepG2 cells through regulation of Bcl-2. *Cell Res* 2009;19(4):469-86.
95. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
96. Jang E, Shin MH, Kim KS, Kim Y, Na YC, Woo HJ, et al. Anti-lipoapoptotic effect of *Artemisia capillaris* extract on free fatty acids-induced HepG2 cells. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:253.
97. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
98. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9(7):671-5.
99. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2017;23(47):8263-8276.
100. Kim SJ, Kim MC, Um JY, Hong SH. The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. *Molecules* 2010;15(10):7208-17.
101. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24(5):830-40.
102. Al-Abrash AS, Al-Quobaili FA, Al-Akhras GN. Catalase evaluation in different human diseases associated with oxidative stress. *Saudi Med J* 2000;21(9):826-30.

103. Perlemuter G, Davit-Spraul A, Cosson C, Conti M, Bigorgne A, Paradis V, et al. Increase in liver antioxidant enzyme activities in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005;25(5):946-53.
104. Kumar A, Sharma A, Duseja A, Das A, Dhiman RK, Chawla YK, et al. Patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) have higher oxidative stress in comparison to chronic viral hepatitis. *J Clin Exp Hepatol* 2013;3(1):12-8.
105. Jain MR, Giri SR, Bhoi B, Trivedi C, Rath A, Rathod R, et al. Dual PPAR α/γ agonist saroglitazar improves liver histopathology and biochemistry in experimental NASH models. *Liver Int* 2018;38(6):1084-94.
106. Murakami S, Ono A, Kawasaki A, Takenaga T, Ito T. Taurine attenuates the development of hepatic steatosis through the inhibition of oxidative stress in a model of nonalcoholic fatty liver disease in vivo and in vitro. *Amino Acids* 2018;50(9):1279-88.
107. Mardan-Nik M, Pasdar A, Jamialahmadi K, Avan A, Mohebbati M, Esmaily H, et al. Association of heat shock protein70-2 (HSP70-2) gene polymorphism with obesity. *Ann Hum Biol* 2016;43(6):542-6.
108. Li W, Zhong X, Zhang L, Wang Y, Wang T. Heat shock protein 70 expression is increased in the liver of neonatal intrauterine growth retardation piglets. *Asian-Australas J Anim Sci* 2012;25(8):1096-101.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller	Sayfa no
Şekil 1. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının patogenezi.....	4
Şekil 2. Vanilik asidin yapısı.....	9
Şekil 3. Vanillik asidin düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığına etkisi.....	17
Şekil 4. Vanillik asidin yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığına etkisi.	18
Şekil 5. Vanillik asidin palmitat ile oluşturulan yağlanmada hücre canlılığına etkisi.	19
Şekil 6. Vanillik asidin palmitat ile oluşturulan yağlanmada trigliserit düzeylerine etkisi.....	20
Şekil 7. HepG2 hücrelerinde vanilik asidin yağlanma üzerine etkisi.....	21
Şekil 8. Vanillik asidin palmitat ile oluşturulan yağlanmada ileri oksidasyon protein ürünleri düzeylerine etkisi.....	22
Şekil 9. Vanillik asidin palmitat ile oluşturulan yağlanmada katalaz aktivitelerine etkisi.....	23
Şekil 10. Vanillik asidin palmitat ile oluşturulan yağlanmada ısı şok proteini 70 düzeylerine etkisi.	24

TABLolar

Tablo 1. Çalışmada elde edilen tüm sonuçlar	25
---	----

ÖZGEÇMİŞ

01.05.1993 tarihinde Tekirdağ'da doğdum. İlk ve orta eğitimimi Tekirdağ'da tamamladım. 2011 yılında girdiğim Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2016 yılında mezun oldum. 2016 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.

EKLER



Ek 1

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2018/328	
	PROTOKOL ADI	Palmitat ile Yağlanma Oluşturulan İnsan Kaynaklı Hepatoma Hücrelerinde Vanilik Asidin Oksidatif Strese ve HSP 70 Protein Düzeylerine Etkisi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Dr. Öğr. Üyesi Gülben SAYILAN ÖZGÜN	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 16/06	Tarih:01.10.2018	
	Fakültemiz Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Gülben SAYILAN ÖZGÜN'ün sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Regaip EKİCİLER'in tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödendiği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E H	E H	
Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Başkan Yardımcısı	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi F. Nesrin TURAN Üye	Biyostatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Cafer Sadık ZORKUN Üye	Kardiyoloji	T.Ü.T.F. Kardiyoloji A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOCAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Niyazi Cenk SAYIN Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Avukat Özden İPÇİ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E H	E H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a.
Dekan Yrd.