


Naringin CCl₄ indüklü hepatosit hasarını endoplazmik retikulum stresini engelleyerek hafifletir

Naringin attenuates CCl₄-Induced hepatocyte damage through inhibiting endoplasmic reticulum stress

Umut Kerem Kolaç 

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

ÖZ

Amaç: Karaciğerin çeşitli kimyasallara maruz kalması hepatik hasar oluşmasına neden olur. Karbon tetraklorür (CCl₄), kimyasal toksin kaynaklı hepatik hasarı araştırmak için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Çalışmamızda turunçgillerde bol bulunan bir flavanon olan naringinin (NRG), CCl₄ ile indüklenen karaciğer hasarında endoplazmik retikulum (ER) stresi ve stres aracılı apoptoz üzerine etkileri incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: THLE-3 hücreleri 24 saat boyunca değişen konsantrasyonlarda CCl₄' e maruz bırakıldıktan sonra farklı dozlarda NRG ile 4 saat tedavi edildi. Konsantrasyonların hücre canlılığı üzerindeki etkileri belirlendi. Ardından hepatositlerde ER stres belirteçlerinin protein ifadeleri tespit edildi. Son olarak akış sitometri ile Bcl2 aktif / inaktif hücre oranları belirlendi.

Bulgular: NRG tedavisi (5 ve 10 µM), CCl₄ uygulaması ile azalan hücre canlılıklarında anlamlı bir artış sağladı. Benzer biçimde ER stres belirteçlerinde CCl₄ uygulaması sonucu artan seviyeler NRG tedavisiyle anlamlı biçimde azaldı. Son olarak NRG, Bcl2 inaktif hücre oranını anlamlı seviyede düşürerek apoptozun önüne geçilmesinde faydalı oldu.

Sonuç: NRG tedavisi CCl₄ ile indüklenen hepatosit hasarında ER stresinin bastırılmasında ve ER stresi kaynaklı apoptozun önlenmesinde etkilidir.

Anahtar Sözcükler: Karaciğer hasarı, naringin, endoplazmik retikulum stresi, apoptoz.

ABSTRACT

Aim: Exposure of the liver to diverse chemicals induce hepatic damage. Carbon tetrachloride (CCl₄) is widely used toxin to investigate hepatic injury. In our study, the effects of naringin (NRG), a flavanone abundant in citrus fruits, on endoplasmic reticulum (ER) stress and stress-mediated apoptosis in CCl₄-induced liver injury were investigated.

Materials and Methods: THLE-3 cells were exposed to varying concentrations of CCl₄ for 24 hours and then treated with different doses of NRG for 4 hours. The effects of varying concentrations on cell viability were determined. Then, protein expressions of ER stress markers were detected in hepatocytes. Finally, Bcl2 active / inactive cell ratios were determined by flow cytometry.

Results: NRG treatment (5 and 10 µM) resulted in a significant increase in cell viability, which decreased with CCl₄ administration. Similarly, the increased levels of ER stress markers as a result of CCl₄ application were significantly reduced with NRG treatment. Finally, NRG prevented apoptosis by significantly reducing ratio of Bcl2 inactive cells.

Conclusion: NRG treatment is effective in suppressing ER stress in CCl₄-induced hepatocyte damage and preventing ER stress-induced apoptosis.

Keywords: Liver damage, naringin, endoplasmic reticulum stress, apoptosis.

Sorumlu yazar: Umut Kerem Kolaç
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi
Biyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye
E-posta: umutkolac@gmail.com
Başvuru tarihi: 21.06.2022 Kabul tarihi: 18.07.2022

GİRİŞ

Kronik karaciğer hastalıklarının prevalansı kimyasal toksinlere, virüslere ve uyuşturucu maddelere maruz kalınma sıklıklarının artışıyla bağlantılı olarak son yıllarda genç ve yaşlı nüfusta önemli derecede yükselmiştir (1). Sürekli ve ilerleyen karaciğer bozuklukları, artan hücre ve doku fonksiyon kayıpları nedeniyle ciddi karaciğer hasarına neden olur ve yüksek mortalite ile ilişkilidir (2). Karaciğer hasarının yönetimi, çağdaş tıbbın en zorlu konuları arasında yer almaya devam etmektedir (3) ve akut karaciğer hasarı için yeni tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Karaciğer mikrozomal sitokrom P450 tarafından katalize edilen karbon tetraklorür (CCl_4) metabolizması, hızla hepatik glutatyonu tüketen ve hepatosit zarının lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu indükleyen serbest radikaller üretir (4). Endoplazmik retikulumdaki (ER) bu CCl_4 metabolizması, ER fonksiyonunun kaybının bir göstergesi olarak katlanmamış protein yanıtına yol açar. Bu kusur ER stresini tetikler ve birçok karaciğer hastalığında gösterilmiştir. Katlanmamış protein yanıtının karaciğer yağlanmasında, obezitede, hepatik insülin direncinde, iskemi-reperfüzyon hasarında, hepatit B/C' de, alkole bağlı karaciğer hasarında ve asetaminofen toksisitesi dahil olmak üzere birçok toksik ajan kaynaklı hastalıkta meydana geldiği gözlemlenmiştir (5). Bu nedenle CCl_4 , deneysel olarak ksenobiyotiklerin neden olduğu hepatotoksitite modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (6).

Katlanmamış protein yanıtı, bağlayıcı immünooglobulin proteini (BIP, GRP78) tarafından algılanır ve ER' de katlanmamış proteinlerin birikmesi üzerine aktive edilir. Katlanmamış proteinlerin birikmesi, BIP 'in serbest kalmasına yol açarak üç ER transmembran proteininin uyarılmasını sağlar. Bu proteinler, inozitol-gerektiren enzim 1 (IRE) 1, pankreatik ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6)'dir. PERK, ökaryotik başlama faktörü (EIF2 α)'nın fosforilasyonunu sağlayarak hücrede genel translasyonun zayıflamasına neden olur. Aynı zamanda, ATF4 transkripsiyon faktörü ve onun hedefi CCAAT-enhansır-bağlayıcı homolog proteini (CHOP) dahil olmak üzere çeşitli mRNA' ların ekspresyonunu artırır. IRE1 otofosforilasyonu, aktif transkripsiyon faktörü kırılmış X-kutusu bağlayıcı protein 1 (sXBP1) üretimi için harekete geçer. ATF6 Golgi'de

kırılarak aktif formuna dönüşür ve çekirdeğe transfer olur. Bunların tümü, protein katlanma kusurlarını çözmek ve hücre sağ kalımını artırmak için yapılan uyarlamalardır. Stres sabit hale gelirse, bu adaptasyon başarısız olacak ve ER fonksiyonlarının bozulmasına yol açacaktır. Bütün bunlar sonunda katlanmamış protein yanıtının hedefi olan pro-apoptotik transkripsiyon faktörü CHOP aktive olur ve reaktif oksijen türlerinin de oluşumuyla apoptoz tetiklenir (5, 7, 8).

Naringin (NRG), greyfurt ve portakaldan elde edilen doğal bir flavonoid glikozittir (9). On beş karbonlu yapıya sahip flavonoid grubuna aittir ve yaygın olarak antiinflamatuvar / antioksidan etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (10, 11). Bu gruba dahil olan flavanoidlerin kanser ve kronik hastalıkların önlenmesi veya tedavisi için potansiyel terapötikler olabileceği bildirilmiştir (12, 13). Ayrıca fare hepatositlerinde CCl_4 toksisitesine karşı antiinflamatuvar, antiapoptotik ve antioksidan özellikleri gösterilmiştir (14). Bununla birlikte, NRG' nin hepatositlerde CCl_4 ün neden olduğu ER stresi üzerindeki etkileri henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Çalışmada NRG'nin normal insan hepatosit toksisitesi üzerine etkileri ER stres belirteçleri üzerinden gösterilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre Kültürü ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan normal insan hepatosit hücre hattı THLE-3, American Type Culture Company (ATCC, MD, USA)'den satın alındı ve tedarikçinin talimatlarına göre muhafaza edildi. Hücreler çalışma boyunca BEGM (Lonza/Clonetics Corporation, Walkersville, MD 21793 Kat. No: CC3170) besi yeri içerisinde 37° C ve % 5 CO_2 ' lik inkübatörde kültüre edildi. Deneylerde kullanılan NRG (Sigma-Aldrich, Ürün Kodu: 71162) DMSO' da çözüldü ve toksisite deneyleri için çeşitli konsantrasyonlarda hazırlandı. DMSO konsantrasyonları hücre canlılığı üzerine etkisi olmayacak şekilde % 0,5 konsantrasyondan daha düşük tutuldu. CCl_4 Sigma-Aldrich'ten (Ürün Kodu: 289116) temin edildi ve her deney için taze hazırlandı.

Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Doksan altı kuyulu plakalardaki hücrelere akut hasarın indüklenmesi için 1, 5, 10 ve 20 mM konsantrasyonlarda CCl_4 (Sigma-Aldrich; Ürün Kodu: 289116) 24 saat boyunca verildi (6, 15) ve

uygun CCl_4 konsantrasyonu belirlendi. Hücrelere farklı konsantrasyonlarda NRG (1, 5 ve 10 μM) (16) 4 saat uygulandıktan sonra belirlenen dozda CCl_4 ile 24 saat muamele edilerek NRG' nin hücre canlılığı üzerine etkileri metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) testi ile değerlendirildi. Uygulamalardan sonra kuyulara 5 μl MTT solüsyonu aktarıldı ve 1,5 saat inkübe edildi. Plakalardaki besi yeri atıldı ve her bir kuyucuğa 200 μl DMSO ilave edildi. Absorbanslar spektrofotometre ile 570 nm' de ölçüldü.

ER Stres Belirteçlerinin Belirlenmesi

Hücre lizatlarının hazırlanması için altı kuyulu plakalardaki hücreler ml başına 1 milyon hücre olacak şekilde PBS (pH 7,4) ile seyreltildi. Hücreler tekrarlı dondurma-çözme işlemine tabi tutuldu. Ardından 3000 rpm' de 20 dakika santrifüj edildi ve supernatant alındı. Gruplardaki total protein miktarları Sigma, Total Protein Kit (Ürün kodu: TP0100) ile tespit edildi. Hücrelerdeki ER stres belirteçlerinden CHOP (Kat. No: MBS7720630), GRP78 (Kat. No: MBS3801061), ATF6 (Kat. No: MBS018412), ATF4 (Kat. No: MBS726369), IRE1 (Kat. No: MBS7720641), PERK (Kat. No: MBS1608105) MyBioSource, Inc. ELISA kit protokolüne uygun olarak belirlendi.

Bcl-2 Aktivasyonunun Belirlenmesi

Hücrelerdeki Bcl-2 fosforilasyonu (Ser70) ve total Bcl-2 ekspresyon seviyeleri "Muse™ Bcl-2 Activation Dual Detection Kit (Kat. No: MCH200105, Luminex)" ile üreticinin protokolüne uygun olarak Muse hücre analizörü yardımıyla tespit edildi. Test sonucunda gruplardaki Bcl-2 aktif hücre oranı (fosforilasyon ile), inaktif hücre oranı ve Bcl-2 eksprese etmeyen hücre oranları belirlendi.

İstatistiksel Analizler

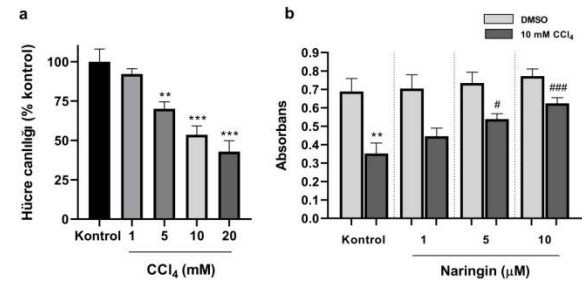
Verilerin analizi GraphPad Prism sürüm 8.0 yazılımı aracılığıyla gerçekleştirildi. Verilere ait değerler ortalama \pm standart hata şeklinde sunuldu. Her grupta ölçülen değişkenler Shapiro-Wilk testi yapılarak normal dağılıma uygunlukları belirlendi. Tüm veriler normal dağılım gösterdiği için değişkenlere ait veriler Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Anlamli fark bulunan değişkenlerde gruplar arası ikili karşılaştırmalar Bonferroni testi ile düzeltildi. $p < 0,05$ olarak tespit edilen sonuçlar anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

CCl_4 ve Naringinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

CCl_4 'ün hücre canlılıkları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla THLE-3 hücrelerine 24 saat boyunca 1, 5, 10 ve 20 mM CCl_4 uygulandı. Sonuçlarımız doza bağımlı olarak hücre canlılıklarının azaldığını gösterdi. Kontrol grubuna göre 5 mM uygulanan grupta ($p=0,006$), 10 mM uygulanan grupta ($p < 0,001$) ve 20 mM CCl_4 uygulanan grupta ($p < 0,001$) anlamlı farklar saptandı (Şekil-1a). Hücrelerin %50' sinden daha fazlasının canlı kaldığı 10 mM, deneyde kullanılacak CCl_4 konsantrasyonu olarak belirlendi.

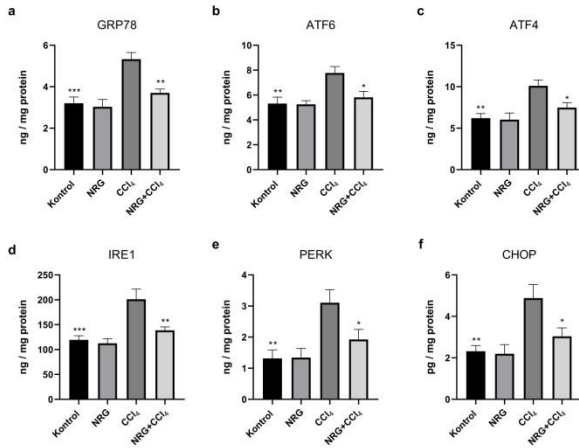
NRG'nin hücre canlılıkları üzerine etkilerinin saptanması amacıyla, 24 saat boyunca 10 mM CCl_4 uygulamasının ardından 3 farklı konsantrasyonda NRG (1, 5 ve 10 μM) 4 saat hücrelere verildi (Şekil-1b). Sonuçlarımız, 5 μM ($p=0,013$) ve 10 μM ($p=0,005$) NRG uygulanmış hücrelerde 10 mM CCl_4 kontrol grubuna göre canlılığın anlamlı derecede arttığını gösterdi. İstatistiksel anlamlılık oranı en yüksek NRG konsantrasyonu olan 10 μM ile ileri deneylere devam edilmiştir.



Şekil-1. Naringinin CCl_4 indüklü hücre ölümü üzerine etkisi. **(a)** THLE-3 hücrelerine 24 saat boyunca 1, 5, 10 ve 20 mM CCl_4 uygulanmış ve MTT testi ile hücre canlılıkları değerlendirilmiştir. **(b)** THLE-3 hücreleri 10 mM CCl_4 ile 24 saat muamele edildikten sonra 1, 5 ve 10 μM NRG ile 4 saat tedavi edilmiştir. Kontrol grubuna DMSO uygulanmıştır. Hücre canlılıkları MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar üç ayrı bağımsız deneyi yansıtmaktadır. Veriler ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kontrol grubuna göre ve # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ 10 mM CCl_4 grubuna göre anlamlı farkları ifade etmektedir. CCl_4 , karbon tetraklorür; MTT, metiltiazol difenil tetrazolyum; NRG, naringin.

Naringinin ER Stres Belirteçleri Üzerine Etkileri

THLE-3 hücrelerinde ER stresi indüklemek için hücrelere 24 saat boyunca 10 mM CCl₄ uygulandı (6, 15). Daha sonra hücreler 4 saat 10 µM NRG ile inkübe edildi. Sonuçlarımız GRP78, ATF6, ATF4, IRE1, PERK ve CHOP ER stres belirteç düzeylerinin, CCl₄ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını gösterdi. NRG ile tedavi edilen grupta ise tüm protein seviyelerinde CCl₄ grubuna kıyasla anlamlı bir azalma tespit edildi (Şekil-2a-f). Buna karşılık kontrol grubu ile NRG grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark tespit edilmedi.

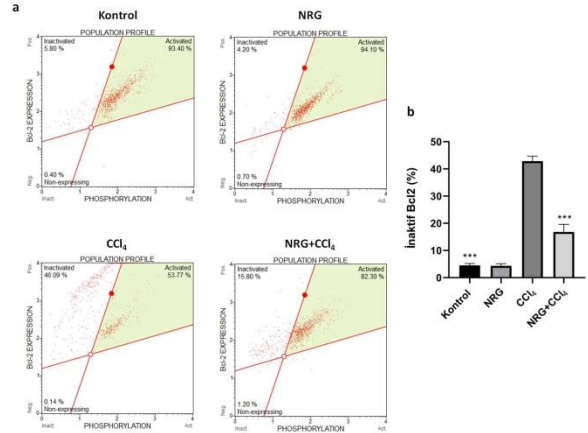


Şekil-2. Naringinin CCl₄ indüklü ER stres üzerine etkisi. (a-f) THLE-3 hücrelerine 24 saat boyunca 10 mM CCl₄ uygulanmış ve ardından hücreler 10 µM NRG ile 4 saat tedavi edilmiştir. ER stresi belirteçleri protein seviyeleri ELISA ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar üç tekrarlı olacak şekilde üç ayrı bağımsız deneyi yansıtmaktadır. Veriler ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 CCl₄ grubuna göre anlamlı farkları ifade etmektedir. CCl₄, karbon tetraklorür; NRG, naringin; GRP78, bağlayıcı immünoglobulin proteini; IRE1, inozitol-gerektiren enzim 1; PERK, pankreatik ER kinaz; ATF6, aktive edici transkripsiyon faktörü 6; ATF4, aktive edici transkripsiyon faktörü; CHOP, CCAAT-enhansır-bağlayıcı homolog proteini.

Naringinin Bcl-2 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

Hücrelerde CCl₄ kaynaklı ER stresi tarafından indüklenen apoptozun belirlenmesi amacıyla Bcl-2 aktif / inaktif hücre oranları akış sitometri yöntemiyle saptandı. Şekil-3'te gösterildiği üzere CCl₄ uygulaması anti-apoptotik Bcl-2 inaktif hücre oranını anlamlı derecede arttırdı (p<0,001). NRG

tedavisi ise CCl₄ aracılığıyla artan Bcl-2 inaktif hücre oranında anlamlı bir azalma sağladı (p<0,001). Kontrol grubu ile NRG grubu arasında herhangi bir fark tespit edilmedi.



Şekil-3. Naringinin CCl₄ indüklü Bcl-2 fosforilasyonu üzerine etkisi. (a) THLE-3 hücrelerine 24 saat boyunca 10 mM CCl₄ uygulanmış ve ardından hücreler 10 µM NRG ile 4 saat tedavi edilmiştir. Hücre popülasyonunda Bcl-2 ifade etmeyen, Bcl-2 aktif ve inaktif hücre profilleri akış sitometrisi ile belirlenmiştir. (b) Bar grafiği Bcl-2 inaktif hücre oranlarını (%) göstermektedir. Sonuçlar üç ayrı bağımsız deneyi yansıtmaktadır. Veriler ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur. ***p < 0,001 CCl₄ grubuna göre anlamlı farkları ifade etmektedir. CCl₄, karbon tetraklorür; NRG, naringin.

TARTIŞMA

Karaciğer hastalıkları dünyada önemli bir problem olarak görülmektedir. Çevresel toksinlerin birçoğu insanlarda karaciğer hasarına neden olmaktadır (17). Hepatolojideki yeni gelişmelere rağmen, karaciğer hastalıklarının tedavisi için kullanılan tedavi yöntemleri bu tür toksinlerin sebep olduğu problemleri çözmekte yetersiz kalmaktadır. Toksik maddelerin etkilediği en önemli organ olan karaciğerde meydana gelen toksisitenin hücresel düzeyde giderilmesi karaciğer hastalıklarının tedavi aşamasında yararlı olacaktır (18, 19). Bu çalışmada turuncgillerde bol bulunan bir etken madde olan naringinin, hepatositlerde CCl₄ aracılı ER stresi ve apoptoz üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

CCl₄ molekülünün triklorometil serbest radikal CCl₃'e biyoaktivasyonu, hepatositlerdeki sitokrom P450 izozimleri (P450'ler) ile gerçekleştirilir. Hepatosit ER'lerinde bulunan P450'lerin çeşitli formlarından P450 2E1 (CYP2E1), CCl₄

biyoaktivasyonu ve CCl₄ aracılı patolojik değişiklikler için önemli bir enzim olarak gösterilmiştir. P450'nin aktivasyonu için NADPH-P450 redüktaz (NPR) ve P450 arasında elektron transferi gereklidir. Elektron transferi sırasında, transfer sisteminden bir miktar elektron sızar. Bu 'elektron sızıntısı' ayrıca redoks döngüsü sırasında serbest radikal üretimine önemli ölçüde katkıda bulunur. Bu serbest radikallerin ER stresine neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (20-22).

Karaciğer hasarına karşı çalışan inflamasyon ve hücre ölümü yolları, karaciğer rejenerasyonu için hepatositleri uyarır. Bununla birlikte, kalıcı ve şiddetli toksisite durumlarında, hepatik satelit hücreleri miyofibroblast benzeri aktivasyona uğrar ve daha fazla hücre dışı matriks proteini sentezler (23, 24). Bu durumda ileri protein sentezine olan ihtiyaç ve dolayısıyla protein katlanma sürecindeki artış, ER'nin aşırı çalışmasını gerektirir. ER stresi sensörleri olarak üç ER-yerleşik transmembran protein, IRE1, PERK ve ATF6 tanımlanmıştır. ER' de proteinlerin birikmesini azaltmak için, ER stres yanıtı, PERK aktivasyonu ve ardından EIF2α'nın fosforilasyonu yoluyla özellikle salgılanan proteinlerin translasyonunu zayıflatır. Ayrıca, ER stres altındaki hücreler, ER şaperonlarını yukarı düzenleyerek (up regüle) ER'nin protein katlama kapasitesini artırır (25). CCl₄'ün hepatositlerde düz endoplazmik retikulumun şişmesine neden olduğu gösterilmiştir, bu da ER stresinin bir fenomeni olan GRP78 ve sXBP1'in ifadesinin artmasına yol açmaktadır (26). Daha önce yaptığımız çalışmalarda da CCl₄ toksisitesinin sıçanlarda ER strese neden olduğunu bildirdik (19, 27). HepG2 hücreleriyle yapılan bir çalışmada CCl₄ ile indüklenen apoptoz ve ER stresin resveratrol tedavisine verdiği yanıt incelenmiştir. Bulgular ER stres belirteçleri XBP-1, CHOP, IRE1, ATF6, ATF4, EIF2α, PERK' in mRNA ifadelerinde ve GRP78, IRE1 ve PERK protein ifadelerinde CCl₄ uygulanan hücrelerde önemli derecede artış ve resveratrol tedavisi uygulanan hücrelerde ise anahtar proteinlerin ekspresyonlarında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu çalışmada da CCl₄ uygulaması THLE-3 hepatositlerde literatürle uyumlu olarak ER stres belirteçlerinin protein ifadelerinde anlamlı bir artış göstermiştir.

Doğal ürünlerinin terapötik potansiyeli dolayısıyla bitkilerin çeşitli hastalıkların mücadelesinde kullanımının önemli bir rolü vardır. Bu bitkisel ilaçların iyileştirici özelliklerini en üst düzeye

çıkarmak için, doğal kaynaklardan elde edilme sistemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir (28). Antioksidan potansiyeli olan birçok bileşik, CCl₄ toksisitesine karşı koruyucu aktiviteleri açısından test edilmiştir (29). Naringin tedavisinin, enzimatik olmayan veya enzimatik antioksidanların (superoksit dismutaz ve katalaz gibi) seviyelerini önemli ölçüde yükselttiği, CYP2E1'in aşırı ekspresyonunu engellediği ve CCL₄'ün neden olduğu karaciğer hasarında hızlı bir iyileşmeye yol açarak ROS oluşumunu baskıladığı daha önce gösterilmiştir. Transmisyon elektron mikroskobu ve histopatoloji analizleri ayrıca naringinin hepatositlerde CCL₄ ile indüklenen nukleus ve mitokondri defektlerini etkili bir şekilde önlediğini göstermiştir. İlave olarak naringin, sitokrom c' nin mitokondriden sitozole salınımını belirgin biçimde azaltmış ve antiapoptotik proteinlerin (Bcl-2 ve Bcl-xL) ekspresyonunu arttırmıştır (14). Naringinin nükleer solunum faktörü 2 (Nrf2) aktivasyonunda olası rolü ile ilgili araştırmadan elde edilen bulgular, naringinin Nrf2-transdüksiyonu ve p38 inaktivasyonu yoluyla hücre koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir (30). Bu çalışmada naringinin hepatositlerde CCl₄ ile indüklenen ER stresini belirteçlerinde anlamlı bir düşüş sağladığı literatürde ilk kez gösterilmiştir. Gerek inflamatuvar yolların aktivasyonu gerekse hücrede antioksidan savunma sistemlerinin uyarılması yoluyla naringin hepatositlerde meydana gelen ER stresin üstesinden gelinmesinde etkili olmuştur.

CHOP' un ER stres aracılı apoptozun tetiklenmesinde rolü olduğu birçok çalışmada tespit edilmiştir (31, 32). CHOP, Bcl2 ifadelerini aşağı regüle etmekte ve BIM ifadesini yukarı regüle ederek proapoptotik proteinlerin ifadesinin artmasına neden olmaktadır (33). Bulgularımız CCl₄ aracılı ER stresin hepatositlerde antiapoptotik Bcl2 fosforilasyonunu azaltarak proteinin aktivasyonunu sınırladığını ve naringin tedavisinin inaktif Bcl2 oranında anlamlı bir düşüş sağladığını göstermiştir.

SONUÇ

Karaciğer vücutta yağ, protein ve karbonhidrat metabolizması gibi pek çok metabolizmayı düzenlerken aynı zamanda vücuda giren yabancı maddelerin detoksifikasyonunda önemli rol oynar. Katlanmamış protein cevabı, birçok akut ve kronik karaciğer hastalığında etkindir. Bu katlanma bozukluklarını ve bu bozukluklara neden olan hücresel mekanizmalardaki hasarları

(serbest radikal birikimi, inflamatuvar yolaklar gibi) gidermek tedavi açısından kritik görülmektedir. Araştırmadan elde edilen sonuçlar, yeni doğal etken maddelerin tedavide kullanılabilmesi ve ilerideki çalışmalara katkıda bulunması açısından önemlidir. Sonuç olarak çalışmamızda hepatositlerde meydana gelen toksisitenin

meydana getirdiği ER stresi naringin tarafından büyük miktarda hafifletilmiştir.

Açıklamalar

Çalışmaya ait proje bütçe desteği bulunmamaktadır.

Çıkar çatışması: Çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

1. Novo E, Cannito S, Paternostro C, Bocca C, Miglietta A, Parola M. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 548: 20-37.
2. Tuñón MJ, Miguel BS, Crespo I, Jorquera F, Santamaría E, Alvarez M, et al. Melatonin attenuates apoptotic liver damage in fulminant hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *J Pineal Res.* 2011; 50 (1): 38-45.
3. Auzinger G, Wendon J. Intensive care management of acute liver failure. *Current opinion in critical care.* 2008;14(2):179-88.
4. Yen F-L, Wu T-H, Lin L-T, Cham T-M, Lin C-C. Naringenin-loaded nanoparticles improve the physicochemical properties and the hepatoprotective effects of naringenin in orally-administered rats with CCl4-induced acute liver failure. *Pharm Res.* 2009; 26 (4): 893-902.
5. Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol.* 2011; 54 (4): 795-809.
6. Lin L, Que R, Shen Y, Chen Y, Yan N, Li Y. Saikosaponin-d alleviates carbon-tetrachloride induced acute hepatocellular injury by inhibiting oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation in the HL-7702 cell line. *Molecular medicine reports.* 2018; 17 (6): 7939-46.
7. San-Miguel B, Crespo I, Sánchez DI, González-Fernández B, Ortiz de Urbina JJ, Tuñón MJ, et al. Melatonin inhibits autophagy and endoplasmic reticulum stress in mice with carbon tetrachloride-induced fibrosis. *J Pineal Res.* 2015; 59 (2): 151-62.
8. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 2010; 140 (6): 900-17.
9. Chen Q, Wu H, Tao J, Liu C, Deng Z, Liu Y, et al. Effect of naringin on gp120-induced injury mediated by P2X7 receptors in rat primary cultured microglia. *PLoS One.* 2017; 12 (8): e0183688.
10. El-Desoky AH, Abdel-Rahman RF, Ahmed OK, El-Beltagi HS, Hattori M. Anti-inflammatory and antioxidant activities of naringin isolated from *Carissa carandas* L.: In vitro and in vivo evidence. *Phytomedicine.* 2018; 42: 126-34.
11. Shirani K, Yousefsani BS, Shirani M, Karimi G. Protective effects of naringin against drugs and chemical toxins induced hepatotoxicity: a review. *Phytotherapy Research.* 2020; 34 (8): 1734-44.
12. Liu Y, Wu H, Nie Y-c, Chen J-l, Su W-w, Li P-b. Naringin attenuates acute lung injury in LPS-treated mice by inhibiting NF-κB pathway. *International Immunopharmacology.* 2011; 11 (10): 1606-12.
13. Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. *Trends in pharmacological sciences.* 2013; 34 (6): 340-6.
14. Dong D, Xu L, Yin L, Qi Y, Peng J. Naringin prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Journal of Functional Foods.* 2015; 12: 179-91.
15. Lu Q, Yang L, Zhao H-Y, Jiang J-G, Xu X-L. Protective effect of compounds from the flowers of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl against carbon tetrachloride-induced hepatocyte injury. *Food and chemical toxicology.* 2013; 62: 432-5.
16. Kim H-J, Song JY, Park HJ, Park H-K, Yun DH, Chung J-H. Naringin protects against rotenone-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology.* 2009; 13 (4): 281-5.
17. Stanca CM, Babar J, Singal V, Ozdenerol E, Odin JA. Pathogenic role of environmental toxins in immune-mediated liver diseases. *J Immunotoxicol.* 2008; 5 (1): 59-68.
18. Adams L, Angulo P. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J.* 2006; 82 (967): 315-22.

19. Ustuner D, Kolac UK, Ustuner MC, Tanrikut C, Ozdemir Koroglu Z, Burukoglu Donmez D, et al. Naringenin Ameliorate Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Damage Through Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Rats. *J Med Food*. 2020; 23 (11): 1192-200.
20. Kim H-R, Lee G-H, Cho EY, Chae S-W, Ahn T, Chae H-J. Bax inhibitor 1 regulates ER-stress-induced ROS accumulation through the regulation of cytochrome P450 2E1. *J Cell Sci*. 2009; 122 (8): 1126-33.
21. Wong FW-Y, Chan W-Y, Lee SS-T. Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998; 153 (1): 109-18.
22. Lee G-H, Bhandary B, Lee E-M, Park J-K, Jeong K-S, Kim I-K, et al. The roles of ER stress and P450 2E1 in CCl4-induced steatosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011; 43 (10): 1469-82.
23. Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2007; 22: S73-S8.
24. Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41 (8-9): 1639-42.
25. Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *International review of cell and molecular biology*. 301: Elsevier; 2013. p. 215-90.
26. Marumoto Y, Terai S, Urata Y, Matsumoto T, Mizunaga Y, Yamamoto N, et al. Continuous high expression of XBP1 and GRP78 is important for the survival of bone marrow cells in CCl4-treated cirrhotic liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 367 (3): 546-52.
27. Üstüner M, Tanrikut C, Üstüner D, Kolaç U, Köroğlu ZÖ, Burukoğlu D, et al. The effect of baicalein on endoplasmic reticulum stress and autophagy on liver damage. *Human & Experimental Toxicology*. 2021; 40 (10): 1624-33.
28. Mukherjee PK. *Quality control of herbal drugs: an approach to evaluation of botanicals*: Business Horizons; 2002.
29. Meng X, Tang G-Y, Liu P-H, Zhao C-J, Liu Q, Li H-B. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of 10 medicinal herbs on CCl4-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol*. 2020; 26 (37): 5629.
30. Chen L, Teng H, Zhang KY, Skalicka-Woźniak K, Georgiev MI, Xiao J. Agrimonolide and desmethylagrimonolide induced HO-1 expression in HepG2 cells through Nrf2-transduction and p38 inactivation. *Frontiers in Pharmacology*. 2017; 7: 513.
31. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Frontiers in immunology*. 2019; 9: 3083.
32. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012; 13 (2): 89-102.
33. Iurlaro R, Muñoz-Pinedo C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *The FEBS journal*. 2016; 283 (14): 2640-52.