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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN

HEPG2 HÜCRELERİNDE OLUŞTURULAN AKRİLAMİD TOKSİSİTESİNDE OTOFAJİNİN HÜCRE ÖLÜMÜNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Serap ŞARLI ŞEN

Referans no: 10307389

EDİRNE-2022

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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN

HEPG2 HÜCRELERİNDE OLUŞTURULAN AKRİLAMİD TOKSİSİTESİNDE OTOFAJİNİN HÜCRE ÖLÜMÜNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Serap ŞARLI ŞEN

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2019/178

EDİRNE-2022

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve bu tezin hazırlanması süresince bana gösterdikleri her türlü destek ve yardımdan dolayı danışman hocam Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN başta olmak üzere, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'a, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, Prof. Dr. İlker DIBIRDIK'a, Doç. Dr. Eray ÖZGÜN'e, emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a, ve tüm çalışma arkadaşlarıma, çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **AKRİLAMİD** 3
- **HEPG2 HÜCRE HATTI** 4
- **OTOFAJİ** 5
- **APOPTOZ** 6

GEREÇ VE YÖNTEMLER 8

BULGULAR 13

TARTIŞMA 21

SONUÇLAR 24

ÖZET 27

SUMMARY 29

KAYNAKLAR 31

ŞEKİLLER LİSTESİ 36

ÖZGEÇMİŞ 37

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

LC3B **:** Mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir

mTOR **:** Rapamisin memeli hedefi

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

3-MA **:** 3-metil adenin

GİRİŞ VE AMAÇ

Akrilamid, kimya endüstrisinde, tarımda ve laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmakta olan suda çözünür beyaz kristal bir kimyasaldır. Aynı zamanda karbonhidrat açısından zengin gıdaların yüksek sıcaklıklarda (120 °C'den yüksek) pişirilmesi sırasında Maillard reaksiyonu yoluyla oluşmaktadır (1). Akrilamidin nörotoksik, genotoksik ve kanserojenik etkileri olduğu bilinmektedir. Ayrıca akrilamide maruz kalmanın karaciğer üzerinde toksik etkileri olabileceği de bildirilmiştir (2).

Akrilamid vücutta primer olarak karaciğerde metabolize edilmektedir (3). HepG2 hücre hattı hepatositlerin temel özelliklerini göstermektedir. Bu nedenle toksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (4). HepG2 hücreleri ile yapılan çalışmalarda akrilamidin oksidatif stresi indükleyerek reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırdığı, ayrıca akrilamid ve metaboliti olan glisidamitin DNA hasarına sebep olarak apoptozu arttırdığı bildirilmiştir (5).

Otofaji, sitoplazmik materyalleri içeren otofagozomlar olarak adlandırılan çift membranlı veziküllerin oluşması ile karakterizedir. Otofagozomların lizozomlarla füzyonu, tek membranlı otolizozomların oluşumuyla sonuçlanır. Dahil edilen materyal lizozomal hidrolazlarla amino asitlere, şekerlere, yağ asitlerine ve nükleotitlere parçalanır (6). Mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3B (LC3B) otofagozom oluşumunda yer alan bir proteindir. Otofajinin indüklenmesiyle LC3B-I ve LC3B-II formları oluşur. LC3B-II otofagozomların hem iç hem dış yüzeyinde bulunur. Bu sebeple LC3B otofaji belirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır (7). Otofaji, enerji dengesinde rol oynadığı gibi yanlış katlanmış proteinleri, hasar görmüş organelleri ve lipid damlacıklarını uzaklaştırarak reaktif oksijen türlerinin azalmasını sağlayarak karaciğer homeostazına katkıda bulunmaktadır (1,8).

Hücre büyümesini ve hayatta kalmasını düzenleyen rapamisinin memeli hedefi (mTOR), otofajinin düzenlenmesinin merkezi modülatörüdür. mTOR, besin açısından zengin koşullar altında aktif olarak otofajiyi ve protein bozulmasını engeller. Buna karşılık, besin açısından zayıf koşullar altında inaktiftir (9). Streptomyces hygroscopius'tan türetilen lipofilik bir antibiyotik olan rapamisin, mTOR'un inhibisyonu yoluyla etki gösteren bir spesifik otofaji indükleyicisidir (10).

Otofaji üzerine yapılan araştırmalar, sınıf III fosfoinositid-3 kinaz -Beclin-1 yolunun, otofajiyi düzenleyen birincil sinyal yollarından biri olduğunu netleştirmiştir (11). 3-Metil adenin (3-MA) sınıf III fosfoinositid-3 kinaz üzerindeki inhibitör etkisinden dolayı yaygın olarak kullanılan bir otofaji inhibitörüdür (12).

Apoptoz, hücrelerin karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleriyle bağlantılı programlanmış bir tür hücre ölümüdür (13). Apoptoz, hücrelerin gelişim ve yaşlanma süreçlerinde dokuların hücre populasyonunu korumak için hemostatik bir mekanizma olarak görev yapar. Ayrıca bağışıklık reaksiyonları, zararlı ajanlar gibi sebeplerle hücrelerin hasar gördüğü patolojik durumlarda apoptoz savunma mekanizması olarak da ortaya çıkar (14). Aktif kaspaz-3 bir sistein proteazdır ve prokaspaz-3'ün aktif kaspaz-3'e dönüşümü, apoptozun önemli bir göstergesidir (15).

Bu çalışmada, akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde 3-MA ve rapamisinin hücre canlılığına, LC3B-II ve aktif kaspaz-3 düzeylerine etkisini araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

AKRİLAMİD

Akrilamid (CH_2=CH-CO-NH_2), 71,08 g moleküler ağırlığa sahip, karbon (%50.69), hidrojen (%7.09), azot (%19.71) ve oksijenden (%22.51) oluşan organik bir bileşiktir. Polar olan bu bileşik suda, metanolde ve etanolde iyi çözünür. 1950'den beri endüstriyel amaçlarla sentezlenmekte olan akrilamid, çeşitli endüstrilerde ve tarımda kullanılmaktadır (16). Bununla birlikte akrilamid, günümüzde yalnızca endüstriyel olarak kullanılmakta olan sentetik bir malzeme olarak değil, aynı zamanda gıdalarda ısısal işlem sırasında oluşan kanserojen, sitotoksik ve genotoksik bir bileşik olarak da bilinmektedir (17). Akrilamid Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından olası bir kanserojen olarak da sınıflandırılmaktadır (18).

Akrilamidin karbonhidrat bakımından zengin gıdaların yüksek sıcaklıkta işlenmesi sırasında serbest asparagin ve indirgeyici şekerler arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonu aracılığı ile oluştuğu gösterilmiştir (19). Maillard reaksiyonu, ilk olarak 1912 yılında Louis Camille Maillard tarafından, gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında meydana gelen, indirgen şeker moleküllerinin karbonil grubu ile amino asitlerin amino grubu arasındaki enzimatik olmayan kimyasal bir reaksiyon olarak tanımlanmıştır (20). Maillard reaksiyonu üç ana aşamada gerçekleşir. İlk adım, akrolein oluşturmak için serbest amino gruplarının indirgeyici şekerlerle yoğunlaştırılmasını içerir. Bu aşamada, glikozun bir karbonil grubu veya indirgenmiş şekerler, bir Schiff bazı oluşturmak üzere bir amino asidin bir amino grubu ile reaksiyona girer ve Amadori bileşiği oluşur. İkinci adım, yüksek sıcaklık ve basınç altında amino asitlerin aldehitlere ve amonyağa bozunmasıyla sonuçlanan Strecker bozunmasını içerir. Bu fazda Amadori bileşiğinden çeşitli türlerde karbonil bileşikleri, özellikle 1-

deoksiglukozon, 3-deoksiglukozon ve metilglioksal gibi dikarbonil bileşikleri oluşur. Bu dikarbonil bileşikleri, bir başlangıç materyalinden veya bir indirgeyici şekerden daha reaktiftir. Bu reaksiyonun son aşaması, kahverengi renkli azotlu bileşikler ve akrilik asidin kombinasyonu ile akrilamid oluşumuyla sonuçlanır. Reaktif dikarboniller, renk veya aroma oluşturmak için birbirleriyle ve amino asitlerin ve proteinlerin amino gruplarıyla reaksiyona girer. Maillard reaksiyon ürünleri genellikle iştahı uyarır (21,22).

Akrilamid, hayvan ve insan vücudunda ağız, akciğerler veya deri teması yoluyla alınabilir. Tüm organlarda hızla dağılabilir ve başta karaciğer, beyin, timus, böbrek ve kalp olmak üzere vücudun çeşitli yerlerinde ve dokularında bulunabilir (3). Akrilamidin yaklaşık %90 kadarı metabolize edilirken az bir miktarı da idrarla atılmaktadır (23). Karaciğerde başta sitokrom P450 olmak üzere detoksifikasyon enzimleri tarafından oksitlenerek metabolize edilir. Biyotransformasyon sonucu akrilamidden daha toksik bir genotoksik ajan olan, reaktif epoksit formu glisidamid (2,3-epoksipropan amid) oluşur (3,24). Akrilamid ve glisidamid, glutatyon-S-transferaz enzimleri aktivitesiyle glutatyonla konjuge olur ve merkaptürik asit türevlerine dönüşerek çoğu idrar yoluyla 24 saatte atılır (25).

Yapılan çalışmalarda akrilamidin genotoksisite, nörotoksisite, karsinojenite ve üreme sistemi toksisitesi gibi zararlı etkilerinin olduğu gösterilmiştir (26). Akrilamidin zararlı etkilerine, genotoksik metabolitlerin oluşumu, oksidatif stres, nöral sinyallerin etkilenmiş yayılımı ve merkezi sinir sisteminde histolojik bozukluklar aracılık eder (24). Akrilamid, hayvanlarda DNA eklentileri, gen mutasyonları ve kromozom anormallikleri sebep olmaktadır (27).

HEPG2 HÜCRE HATTI

HepG2, farmako-toksikolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan insan hepatoma hücre dizisidir. Bu hücre dizisi, farklılaşmış hepatosellüler karsinomu olan on beş yaşındaki bir erkeğin karaciğer biyopsilerinden elde edilmiştir (28). HepG2 hücreleri hepatositlerin temel özelliklerini sergiler (4). HepG2 hücreleri, kanser çalışmalarının yanı sıra, toksisite, lipid ve lipoprotein metabolizması, safra tuzu metabolizması, ilaç metabolizması, safra atılımı, insülin direnci ve enfeksiyon çalışmaları için bir in-vitro karaciğer modeli olarak sıklıkla kullanılmaktadır (29).

Karaciğer akrilamid ile ilk karşılaşan organlardan olması nedeniyle akrilamid toksisitesinde önemlidir (25). Literatürde yüksek dozlarda akrilamidin HepG2 hücrelerinde sitotoksisite oluşturduğu bildirilmektedir (30).

OTOFAJİ

Otofaji, lizozoma taşınmak üzere hücresel proteinleri ve organelleri içine alan, otofagozom adı verilen çift zarlı veziküllerin oluşumunu içeren, evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş katabolik bir süreçtir (31). Bu süreçte otofajik substratlar, otofagozom olarak adlandırılan çift zarlı keseciklerin içine alınır. Sonrasında otofagazomlar lizozomlarla birleşerek substratların geri dönüştürüldüğü otolizozomları oluşturur (32). Otofaji yoluyla hücreler, hayati süreçler için gereken enerji ve yapı taşlarını koordine ederler (33).

Otofaji, açlık adaptasyonu, hücre içi proteinlerin ve organellerin kalite kontrolü, gelişme, tümör baskılanması, nörodejenerasyonun önlenmesi ve bağışıklık dahil olmak üzere birçok fizyolojik ve hastalık sürecinde önemli roller oynar (34).

Makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç ana otofaji türü tanımlanmıştır (33). Makrootofaji, substratların otofagozom adı verilen sitozolik çift membranlı kesecikler içine alındığı bir otofaji türüdür. Makrootofaji substratları genellikle işlevini kaybetmiş organeller, sitozolik proteinler veya istilacı mikroplardan oluşmaktadır. Substratların bozunmasından sonra, koşulların olumsuz olduğu durumlarda hücre canlılığını sürdürmek için enerji üretmek ve çeşitli stres koşullarında hücreyi korumak için yıkım ürünleri sitozole geri salınır (35). Mikrootofaji, sitoplazmik bileşenlerin lizozomal membranın invajinasyonu yoluyla doğrudan lizozoma alınarak parçalanması sürecidir (36). Şaperon aracılı otofaji ise, KFERQ (K=lizin; F=fenilalanin; E=glutamik asit; R=arginin ve Q=glutamin) benzeri bir pentapeptid dizisine sahip hücresel proteinlerin moleküler bir şaperon olan ısı şok proteini 70 tarafından tanınarak lizozomlar tarafından seçici olarak parçalanmasıdır (37).

Besin veya büyüme faktörü yokluğu, hipoksi, reaktif oksijen türleri, DNA hasarı, protein kümeleri, hasarlı organeller veya hücre içi patojenler gibi hücresel stresler otofajiyi uyarabilir (38). Fizyolojik koşullar altında, temel otofaji seviyeleri, esasen hücre içi kalite kontrol sistemi olarak çalışan önemli bir homeostatik fonksiyona aracılık eder (39).

Otofajinin esas olarak otofagozomların oluşumunu başlatan otofaji ile ilişkili gen ailesi tarafından düzenlendiği bilinmektedir. (40). Otofajinin ana adımlarına katkıda bulunan anahtar bir protein olan LC3B, otofagozom gelişimi ve olgunlaşması ile ilişkilidir (41). LC3B öncü bir form olarak sentezlenir ve sırasıyla, sitoplazmik LC3B-I ve otofaji indüksiyonuyla fosfatidiletanolamin ile konjugasyon sonucu LC3B-II oluşur. LC3B-II, otofagozom zarına bağlanır ve otolizozomlardaki bozunmaya kadar ona bağlı kalır. Bu sebeple LC3B-II, otofaji belirteci olarak kullanılmaktadır (42).

3-Metil Adenin

Sınıf III fosfoinositid-3 kinaz inhibitörü olan 3-MA, otofajiyi seçici olarak bloke etmek için yaygın olarak kullanılmakta olan bir birleşiktir (43). Fosfatidil inositol 3-fosfat üretilmesi olgun bir kesecik oluşturmak üzere kapanan otofagozomların çekirdeklenmesi ve uzaması için çok önemli bir adım olup; 3-MA otofagozom oluşumunu bloke ederek otofajiyi inhibe etmektedir (44).

Rapamisin

Rapamisin, ilk olarak 1970'lerde Paskalya Adası'ndan toprakta keşfedilmiştir. Bir serin/treonin protein kinaz olan mTOR, otofaji ile ilgili proteinleri ve lizozom biyosentezini düzenleyerek otofajiyi inhibe etmekte ve mTOR inhibitörü olması nedeniyle rapamisin otofaji indükleyicisi olarak kullanılmaktadır (45,46).

APOPTOZ

Apoptoz, yüksek seviyede düzenlenmiş bir hücre ölümü sürecidir. Apoptoz belirli hücreleri feda ederek organizmaya daha büyük yararlar sağlamak için verilen rasyonel ve aktif bir karardır. Sağlıklı çok hücreli organizmalarda rutin olarak gerçekleşmekte olan fizyolojik bir süreçtir (47). Apoptoz hem fizyolojik hem patolojik çeşitli uyaranlar tarafından başlatılabilir. Gelişim ve yaşlanma süreçlerinde dokulardaki hücre popülasyonunun korunmasını sağlar. Ayrıca bağışıklık reaksiyonları, zararlı ajanlar gibi sebeplerle hücrelerin hasar gördüğü patolojik durumlarda apoptoz savunma mekanizması görevi görür (14).

Apoptozun ilk görünür değişiklikleri, hücrenin büzülmesi ve piknoz adı verilen çekirdek ve kromatinin yoğunlaşmasıdır. Bunu, karyoreksis adı verilen çekirdek ve kromatinin parçalanması, hücre zarı kabarması ve son olarak hücrenin apoptotik cisimler adı verilen bir dizi zara bağlı yapıya tomurcuklanması izler. Apoptotik cisimlerin küçük boyutu, malzemelerin geri dönüşüm için fagolizozomlarda daha da parçalandığı fagositoz yoluyla yakındaki makrofajlar ve diğer hücreler tarafından yutulmalarını kolaylaştırır (48).

Apoptozda kaspazlar olarak adlandırılan sistein-aspartik proteazınların aktivasyonu rol oynar (49). Kaspazlar, apoptoz mekanizmasında hem başlatıcı hem de uygulayıcı olarak yer alırlar. Kaspazlar iki farklı yol ile aktive edilebilir. Dışsal ölüm reseptörü yolu, ölüm ligandlarının bir ölüm reseptörüne bağlanmasıyla başlar. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi gibi iç uyaranlar, içsel mitokondriyal yolu başlatır (50).

Her iki apoptotik yol da, sırasıyla dışsal yol ve iç yol için kaspaz ailesi üyelerinin, kaspaz-8 ve kaspaz-9'un aktivasyonunu gerektirir. Nihayetinde, prokaspaz-3 yarılarak aktif

kaspaz-3'e dönüşür, bu da hücresel substratların yarılması ve nihai apoptoz ile sonuçlanır (51). Aktif kaspaz-3, 200'den fazla proteini parçalayan ve nihayetinde apoptotik hücre ölümüne yol açan bir sistein proteazdır. Prokaspaz-3'ün aktif kaspaz-3'e dönüştürülmesi, apoptozun önemli bir düğümüdür ve genellikle bir hücre için "geri dönüşü olmayan bir nokta" olarak kabul edilir (15). Prokaspaz-3'ün aktif kaspaz-3'e dönüşümü hücre ölümü için spesifik bir işaret olarak kabul edildiği için apoptozun tespitinde de güvenilir bir belirteç olarak kullanılmaktadır (52).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (TÜTF-BAEK 2020/363, onay tarihi:14.09.2020) (Ek-1). Deneysel çalışmalar, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yapıldı ve ayrıca western blot membranlarının görüntülenmesi için Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet satın alındı.

DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Akrilamid (Merck)

Amonyum persülfat (Sigma Aldrich)

Antibiyotik-Antimikotik (Thermo)

Apoptoz antikor kokteyli (Abcam)

Bakır (II) sülfat pentahidrat (Sigma)

Bromofenol mavisi (Sigma Aldrich)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma)

Eagle'ın minimum esansiyel medyumu-fenol red içeren (Wisent)

Eagle'ın minimum esansiyel medyumu-fenol red içermeyen (Wisent)

Etilendiamin tetra asetik asit (Sigma)

Fetal Sığır Serumu (Thermo)

Folin reaktifi (Merck)

Gliserol (Sigma) Glisin (Sigma)

Hidroklorik asit (%37) (Merck)

Hidrojen peroksit (Merck)

İsopropanol (Honeywell)

Kemilüminesans substrat (Thermo)

LC3B antikoru (Cell Signaling)

Metanol (Merck)

N,N-Metilen bis-akrilamid (Merck)

N,N,N,N-tetrametiletilendiamin (TEMED) (Sigma Aldrich)

Poliviniliden diflorid membran (Roche)

Pre-stained protein ladder (Thermo)

Rapamisin (Santa Cruz)

Sekonder antikorlar (Abcam)

Sığır serum albumini (Sigma)

Sodyum dodesil sülfat (Sigma)

Sodyum hidroksit (Merck)

Sodyum karbonat (Merck)

Sodyum klorür (Sigma)

Sodyum potasyum tartarat (Merck)

Trizma baz (Sigma)

Tuzlu fosfat tamponu (PBS) tablet (Thermo)

Tübülin antikoru (Santa Cruz)

Tween-20 (Santa Cruz)

Yağsız süt tozu (Sigma)

2-Merkaptoetanol (Sigma)

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

3-Metil adenin (Santa Cruz)

% 0.25 Tripsin-EDTA (Thermo)

ANALİZLERDE KULLANILAN CİHAZLAR VE DİĞER MALZEMELER

Biyogüvenlik Kabini (Thermo)

Çalkalayıcı (Cleaver Scientific)

Dikey Elektroforez sistemi (Cleaver Scientific)

Distile su cihazı (Nüve)

Elektronik tartı (Sartorius)

Faz Kontrast İnvert Mikroskop (Olympus)

Güç kaynağı (Cleaver Scientific)

Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Daihan)

Karbondioksitli İnkübatör (Thermo)

Kemilüminesans Görüntüleme Sistemi (Bio-rad)

Mikrobiyolojik inkübatör (Thermo)

Mikroplaka okuyucu (Biotek)

Otomatik pipetler (Eppendorf ve Capp)

pH metre (İnolab)

Santrifüj (Heraeus)

Sıvı Azot Tankı (Air Liquide)

Su banyosu (GFL)

Vortex (Velp)

Western blotting sistemi (Cleaver Scientific)

-80°C Derin Dondurucu (Heraeus)

Balon joje (Isolab)

Beher (Isolab)

Flask 75 cm^2 (Nest)

Hücre kazıyıcı (Biosorfa)

Mezür (Isolab)

Mikroplaka (96 kuyucuklu) (SPL)

Petri Kabı (90*16 mm) (SPL)

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

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

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

Steril şırınga filtre (Biosorfa)

TEMEL HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI

Hücre kültürü çalışmaları Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirildi. Deneylerde 11-16. pasajlar arasındaki HepG2 hücreleri kullanıldı. Hücreler %1 antibiyotik-antimikotik ve %10 fetal sığır serumu içeren medyum ile yaşatıldı. Hücrelerin besiyeri değişimi 3 gün arayla yapıldı. Pasajlama 1:4 oranında yapıldı. Hücreler için gerekli olan ortam koşulları, 37°C sıcaklığa sahip ve %5 oranında CO_2 içeren inkübatör ile sağlandı. Hücrelere tüm uygulamalar biyogüvenlik kabini içerisinde aseptik koşullarda yapıldı.

HÜCRELERE UYGULANAN MADDELER

Hücrelere öncelikle 1, 2.5, 5 ve 10 mM 3-MA ve 25, 50, 100 ve 250 nM rapamisin 24 saat süresince HepG2 hücrelerine uygulanarak hücre canlılığı testi yapıldı. Bu deneylerin sonuçlarına göre toksik olmayan konsantrasyonlar olan 1 mM 3-MA ve 50 nM rapamisin seçildi. Akrilamid konsantrasyonu literatürde HepG2 hücrelerinde otofajiyi indüklediği gösterilen **(**53**)** 10 mM olarak seçildi. 1 mM 3-MA ve 50 nM rapamisin, 10 mM akrilamid ile birlikte 24 saat uygulanarak bu maddelerin akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde, hücre canlılığına, LC3B-II, prokaspaz-3 ve aktif kaspaz-3 düzeylerine etkisi gösterildi. Rapamisin DMSO'da çözüldü ve rapamisin uygulaması olan tüm deneylerde tüm grupların medyumunda DMSO içeriği %0.2 idi.

HÜCRE CANLILIĞI TESTİ

Çalışmamızda 96 kuyucuklu mikroplakalara 10.000 adet hücre ekildi. Hücre canlılığı, 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür hücre canlılığı testi ile gösterildi (54). Deneysel prosedürler gerçekleştirildikten sonra kuyucuklar boşaltıldı ve her bir kuyucuğa PBS'de çözünmüş 5 mg/mL konsantrasyonunda 10 µL MTT ve 100 µL renksiz medyum konularak CO_2'li inkübatörde 4 saat süreyle inkübe edildi. Sonrasında MTT çözeltisi kuyucuklardan boşaltıldı ve oluşan formazan 200 µL DMSO ve 25 µL Sorenson tamponu (0.1 M glisin, 0.1 M sodyum klorür, pH=10.5) ile çözündü ve oluşan renk mikroplaka okuyucuda spektrofotometrik olarak 570/630 nm'de ölçüldü (55). Ölçülen absorbanslar kontrol grubunun ortalamasına bölündü ve elde edilen sonuçlar aynı plakadaki kontrol grubunun yüzdesi olarak verildi.

WESTERN BLOT YÖNTEMİ

Western blot yöntemi kullanılarak LC3B-II, prokaspaz-3 ve aktif kaspaz-3 düzeyleri ölçüldü. Deneysel prosedür sonrası hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandı ve 10 mM Tris (pH=8), 50 mM EDTA ve %1 SDS içeren 90°C sıcaklıktaki tampon ile homojenize edildi. Homojenatlar 2000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Protein düzeyleri Lowry ve ark.'nın (56) metoduna göre yapıldı. 15 µg protein, Laemmli ve ark. (57) metoduna göre hazırlanan %4-12'lik jel kullanılarak SDS-PAGE ile ayrıldı. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra proteinler jelden yarı-ıslak western blot sistemi kullanılarak PVDF membrana aktarıldı. Aktarım sonrası membranlar, %5 yağsız süt tozu ile bloklandı. Ardından membranlar primer antikorlar (LC3II için 1:1000 dilüsyon, pro-kaspaz 3, aktif kaspaz 3, aktin için 1:500 dilüsyon ve α-tübülin için 1:10000 dilüsyon) ile gece boyunca +4 °C'de ve devamında sekonder

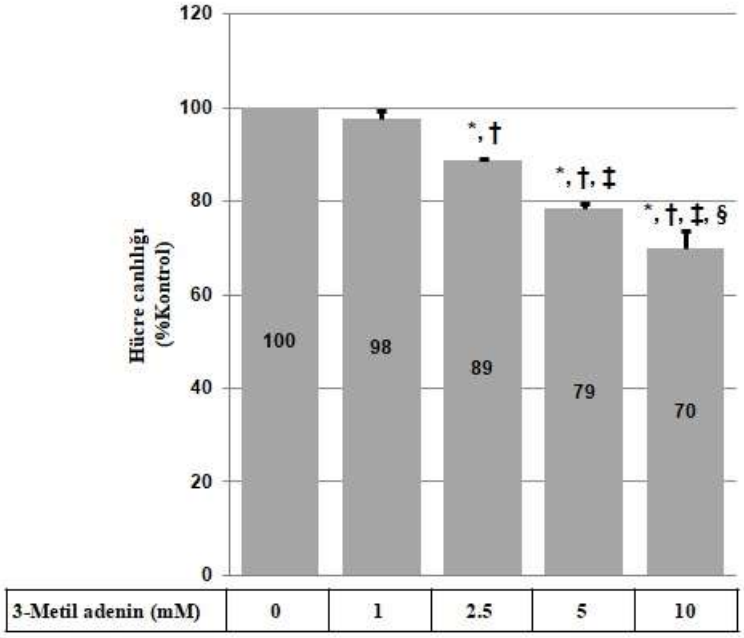
antikorlar ile (1:10000 dilüsyon) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Protein bandları kemilüminesans substrat kullanılarak görüntüledi ve band yoğunlukları Image-J programı kullanılarak hesaplandı (58). Her bir proteine ait sonuç aynı numunenin yükleme kontrolü olarak kullanılan α-tübülin veya aktin sonucuna oranlandı. Herbir grup için sonuçlar aynı deneydeki ve membrandaki kontrol grubuna oranlanarak kontrol grubunun katı olarak verildi.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

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

BULGULAR

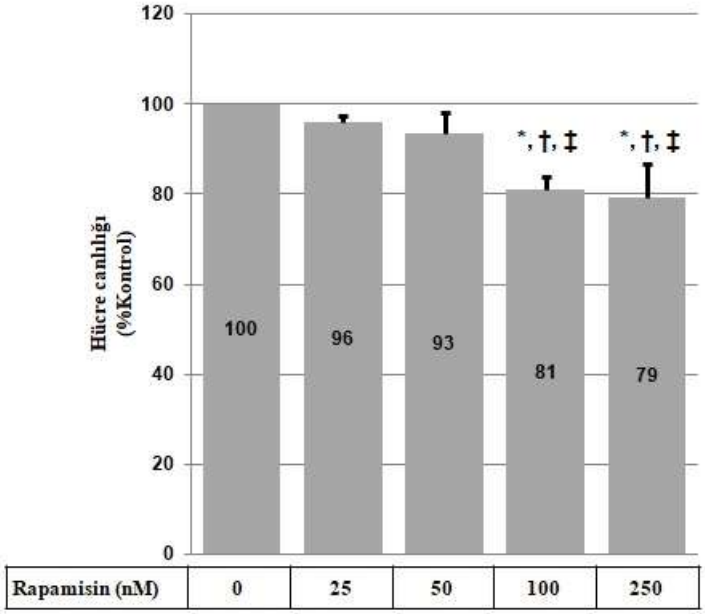
3-Metil adeninin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi Şekil 1'de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası kontrole göre hücre canlılıkları 1 mM 3-MA uygulanan hücrelerde %98±2, 2.5 mM 3-MA uygulanan hücrelerde %89±0, 5 mM 3-MA uygulanan hücrelerde %79±1, 10mM 3-MA uygulanan hücrelerde %70±4 bulundu. 2.5 mM 3-MA uygulaması hücre canlılığını kontrole ve 1 mM 3-MA uygulamasına göre anlamlı olarak azalttı (her ikisi için $p<0.05$). 5 mM 3-MA uygulaması hücre canlılığını kontrole, 1 ve 2.5 mM 3-MA uygulamalarına göre anlamlı olarak azalttı (tümü için $p<0.05$). 10 mM 3-MA uygulaması hücre canlılığını kontrole, 1, 2.5 ve 5 mM 3-MA uygulamalarına göre anlamlı olarak azalttı (tümü için $p<0.05$) (Şekil 1).



Sonuçlar 3 bağımsız tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
***: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.**
†: 1 mM 3-Metil adenin ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
‡: 2.5 mM 3-Metil adenin ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
§: 5 mM 3-Metil adenin ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

Şekil 1. 3-Metil adeninin hücre canlılığına etkisi

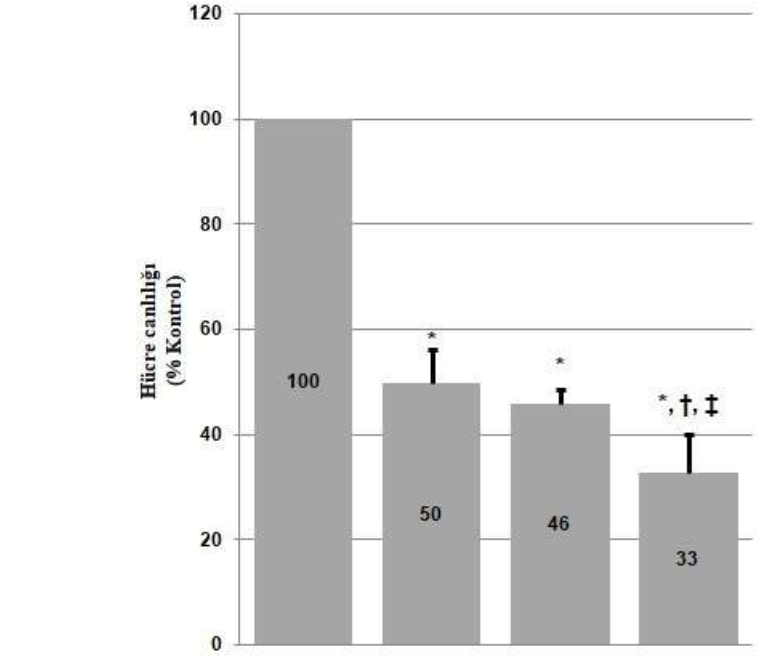
Rapamisinin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi Şekil 2'de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası kontrole göre hücre canlılıkları 25 nM rapamisin uygulanan hücrelerde %96±1, 50 nM rapamisin uygulanan hücrelerde %93±5, 100 nM rapamisin uygulanan hücrelerde %81±3, 250 nM rapamisin uygulanan hücrelerde %79±7 bulundu. 100 ve 250 nM rapamisin uygulamaları hücre canlılığını kontrole, 25 ve 50 nM rapamisin uygulamalarına göre anlamlı olarak azalttı (tümü için $p<0.05$) (Şekil 2).



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

Şekil 2. Rapamisinin hücre canlılığına etkisi

Akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde 3-metil adenin ve rapamisinin hücre canlılığına etkisi Şekil 3'de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası kontrole göre hücre canlılıkları 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde %50±6, 10 mM akrilamid+1 mM 3-MA uygulanan hücrelerde %46±3, 10 mM akrilamid+50 nM rapamisin uygulanan hücrelerde %33±7 bulundu. 10 mM akrilamid uygulaması tüm hücrelerde hücre canlılığı kontrole göre anlamlı olarak azalttı (tümü için $p<0.05$). 1 mM 3-MA uygulaması, 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmedi ($p>0.05$). 10 mM akrilamid+50 nM rapamisin uygulanan hücrelerin canlılığı 10 mM akrilamid ve 10 mM akrilamid+1 mM 3-MA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü (her ikisi için $p<0.05$) (Şekil 3).

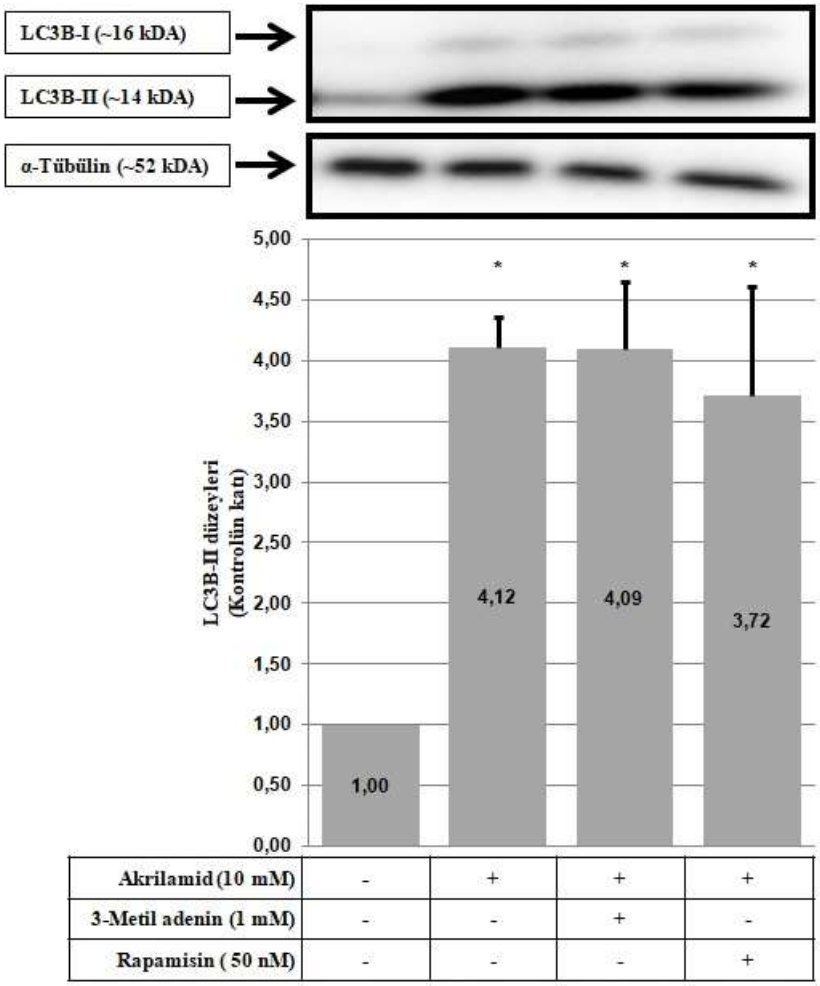


Akrilamid (10 mM)	-	+	+	+
3-Metil adenin (1 mM)	-	-	+	-
Rapamisin (50 nM)	-	-	-	+

Sonuçlar 3 bağımsız tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
†: 10 mM akrilamid ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
‡: 10 mM akrilamid + 1 mM 3-metil adenin ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

Şekil 3. Akrilamid uygulanan hücrelerde 3-metil adenin ve rapamisinin hücre canlılığına etkisi

Akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde 3-metil adenin ve rapamisinin LC3B-II düzeyine etkisi Şekil 4'de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası LC3B-II düzeyleri 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 4.12±0.24 katı, 10 mM akrilamid+1 mM 3-MA uygulanan hücrelerde 4.09±0.57 katı, 10 mM akrilamid+50 nM rapamisin uygulanan hücrelerde 3.72±0.89 katı olarak bulundu. 10 mM akrilamid uygulaması tüm hücrelerde LC3B-II düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı (tümü için $p<0.05$). 1 mM 3-MA veya 50 nM rapamisin uygulamaları, 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde LC3B-II düzeylerini anlamlı olarak değiştirmedi (her ikisi $p>0.05$) (Şekil 4).



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

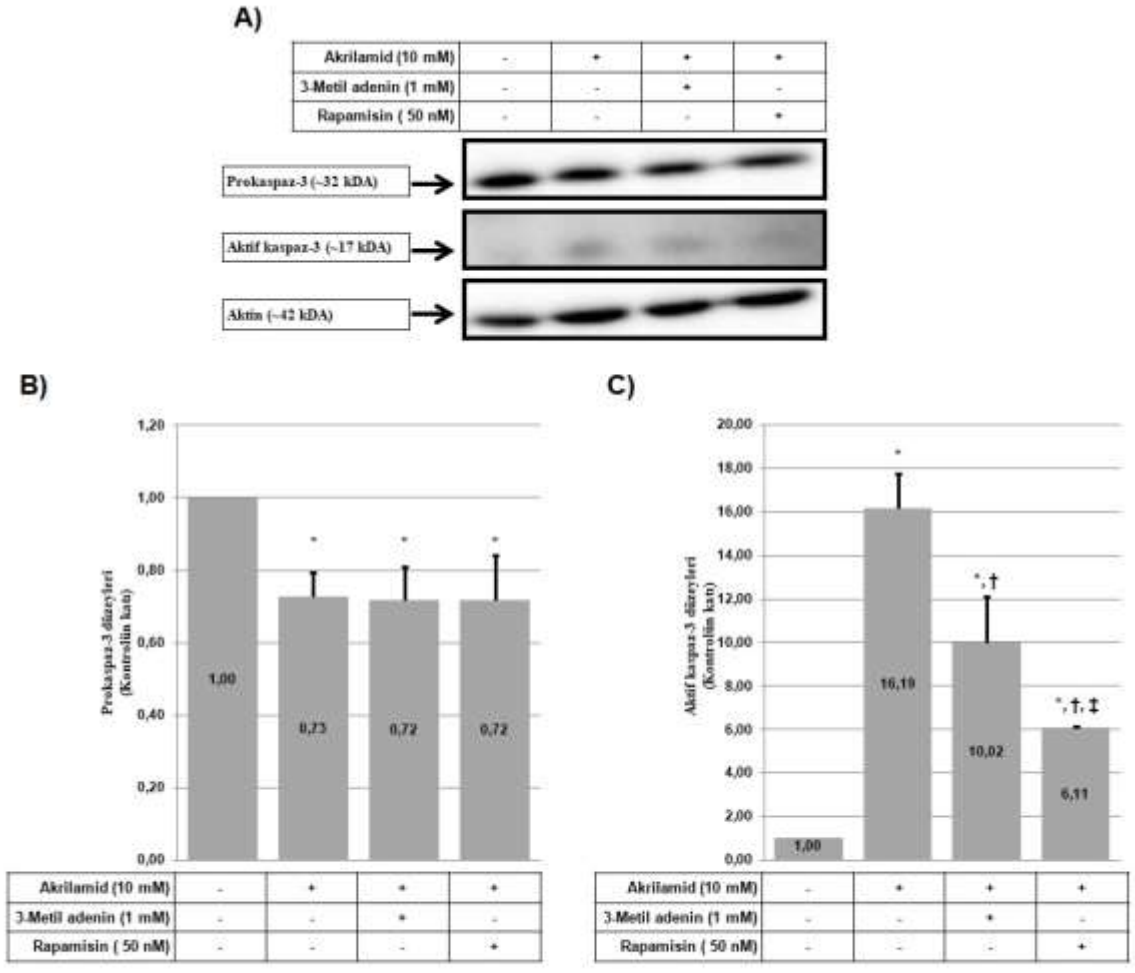
Şekil 4. Akrilamid uygulanan hücrelerde 3-metil adenin ve rapamisinin mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3-II düzeylerine etkisi

LC3B: mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir.

Akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde 3-metil adenin ve rapamisinin prokaspaz-3 ve aktif kaspaz-3 düzeylerine etkisi Şekil 5'de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası prokaspaz-3 düzeyleri 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 0.73±0.07 katı, 10 mM akrilamid+1 mM 3-MA uygulanan hücrelerde 0.72±0.09 katı, 10 mM akrilamid+50 nM rapamisin uygulanan hücrelerde 0.72±0.12 katı olarak bulundu. 10 mM akrilamid uygulaması tüm hücrelerde prokaspaz-3 düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak azalttı (tümü için $p<0.05$). 1 mM 3-MA veya 50 nM rapamisin uygulamaları, 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde prokaspaz-3 düzeylerini anlamlı olarak değiştirmedi (her ikisi $p>0.05$) (Şekil 5B).

HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası aktif kaspaz-3 düzeyleri 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 16.19±1.57 katı, 10 mM akrilamid+1 mM 3-MA uygulanan hücrelerde 10.02±2.10 katı, 10 mM akrilamid+50 nM rapamisin uygulanan hücrelerde 6.11±0.06 katı olarak bulundu. 10 mM akrilamid uygulaması tüm hücrelerde aktif kaspaz-3 düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı (tümü için $p<0.05$). 1 mM 3-MA uygulaması, 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde aktif kaspaz-3 düzeylerini anlamlı olarak azalttı ($p<0.05$). 10 mM akrilamid+50 nM rapamisin uygulanan hücrelerin aktif kaspaz-3 düzeyleri 10 mM akrilamid ve 10 mM akrilamid+1 mM 3-MA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü (her ikisi $p>0.05$) (Şekil 5C).

Çalışmaya ait tüm sonuçlar Tablo-1'de verilmiştir.



A) Western blot görüntüleri, B) Prokaspaz-3 düzeyleri ve C) Aktif kaspaz-3 düzeyleri gösterildi.
Sonuçlar 3 bağımsız tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
†: 10 mM akrilamid ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
‡: 10 mM akrilamid + 1 mM 3-Metil adenin ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

Şekil 5. Akrilamid uygulanan hücrelerde 3-metil adenin ve rapamisinin prokaspaz-3 ve aktif kaspaz-3 düzeylerine etkisi

Tablo 1. Çalışmaya ait tüm sonuçlar

3-MA'nın hücre canlılığına etkisi (% kontrol)					
	Kontrol	1 mM 3-MA	2.5 mM 3-MA	5 mM 3-MA	10 mM 3-MA
1. tekrar	100.00	99.34	88.32	77.76	73.73
2. tekrar	100.00	97.72	89.19	79.70	69.47
3. tekrar	100.00	95.47	88.46	78.25	66.27
RAPA'nın hücre canlılığına etkisi (% kontrol)					
	Kontrol	25 nM RAPA	50 nM RAPA	100 nM RAPA	250 nM RAPA
1. tekrar	100.00	94.74	88.73	81.81	72.68
2. tekrar	100.00	96.32	93.84	78.15	77.96
3. tekrar	100.00	97.17	97.78	83.47	87.34
AA uygulanan hücrelerde 3-MA ve RAPA'nın hücre canlılığına etkisi (% kontrol)					
	Kontrol	10 mM AA	10 mM AA+1 mM 3-MA	10 mM AA+50 nM RAPA	
1. tekrar	100.00	45.13	45.28	26.27	
2. tekrar	100.00	56.97	43.85	40.82	
3. tekrar	100.00	47.48	48.72	30.71	
AA uygulanan hücrelerde 3-MA ve RAPA'nın LC3B-II düzeyine etkisi (kontrolün katı)					
	Kontrol	10 mM AA	10 mM AA+1 mM 3-MA	10 mM AA+50 nM RAPA	
1. tekrar	1.00	4.39	3.99	3.34	
2. tekrar	1.00	3.93	4.70	4.74	
3. tekrar	1.00	4.03	3.58	3.08	
AA uygulanan hücrelerde 3-MA ve RAPA'nın prokaspaz-3 düzeyine etkisi (kontrolün katı)					
	Kontrol	10 mM AA	10 mM AA+1 mM 3-MA	10 mM AA+50 nM RAPA	
1. tekrar	1.00	0.78	0.80	0.83	
2. tekrar	1.00	0.75	0.74	0.74	
3. tekrar	1.00	0.66	0.62	0.59	
AA uygulanan hücrelerde 3-MA ve RAPA'nın aktif kaspaz-3 düzeyine etkisi (kontrolün katı)					
	Kontrol	10 mM AA	10 mM AA+1 mM 3-MA	10 mM AA+50 nM RAPA	
1. tekrar	1.00	15.38	7.67	6.09	
2. tekrar	1.00	18.01	10.68	6.17	
3. tekrar	1.00	15.20	11.71	6.06	

3-MA: 3-Metil adenin; **AA:** Akrilamid; **LC3B:** Mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B hafif zincir 3B; **RAPA:** Rapamisin.

TARTIŞMA

Suda çözünür bir vinil monomer olan akrilamid, dünya çapında kimya endüstrisinde poliakrilamid sentezinde bir ara madde olarak ve araştırma laboratuvarlarında elektroforez jellerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır (59). Akrilamidin karbonhidrat bakımından zengin gıdaların yüksek sıcaklıkta işlenmesi sırasında oluştuğu da bilinmektedir (19). Gıdalar ile vücuda alınan akrilamid karaciğer tarafından metabolize edilir (24). Yüksek konsantrasyonda akrilamid maruziyetinin nörotoksisite, hepatotoksisite, genotoksisite ve karsinojenisite gibi çeşitli toksikolojik aktivitelerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (60).

Otofaji, sitoplazmik organellerin veya sitozolik bileşenlerin lizozomal bozulmasını içeren sıkı bir şekilde düzenlenmiş bir yoldur (38). Otofaji, organizmada hem fizyolojik süreçlerde hem de sitotoksik ajanlar, besin yetersizliği, hipoksi gibi patolojik durumlarda uyarılabilir (32).

Bu çalışmanın amacı, akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde 3-MA ve rapamisinin hücre canlılığına, LC3B-II ve aktif kaspaz-3 düzeylerine etkisini araştırmaktı. Bu amaçla çalışmamızda, öncelikle HepG2 hücrelerine otofaji inhibitörü olarak kullanılacak olan 3-MA (43) ve otofaji aktivatörü olarak kullanılacak olan (46) rapamisin uygulanarak bu maddelerin kendi başına uygulandıklarında toksik olmayan dozları belirlendi ve ardından bu belirlenen konsantrasyonlardaki 3-MA ve rapamisin HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle akrilamid ile birlikte uygulanarak hücre canlılığına, LC3B-II, prokaspaz-3 ve aktif kaspaz-3 düzeylerine etkisi araştırıldı.

Literatürde otofajiyi inhibe etmek için farklı dozlarda 3-MA, otofaji aktive etmek için ise farklı dozlarda rapamisin kullanılmaktadır (61,62). Çalışmamızda HepG2 hücreleri 24 saat süreyle 1, 2.5, 5 ve 10 mM dozlarda 3-MA ile inkübe edildi ve 1 mM 3-MA uygulanan

hücrelerde hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik olmazken, 2.5 mM ve üzeri 3-MA konsantrasyonları hücre canlığını anlamlı oranda azalttı. Literatürde çalışmamızla benzer şekilde 5 ve 10 mM 3-MA'nın HepG2 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir (63,64). Çalışmamızda HepG2 hücreleri 24 saat süreyle farklı rapamisin konsantrasyonları ile inkübe edildiğinde, 25 ve 50 nM dozlarda rapamisin hücre canlılığını kontrole göre anlamlı oranda değiştirmezken 100 nM ve üzeri dozlarda hücre canlılığında anlamlı oranda azalma oldu. Literatürde rapamisinin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi ile ilgili farklı sonuçlar yer almaktadır. Hu ve ark. (62) çalışmamızla uyumlu olarak 100 nM rapamisinin 24 saat süreyle uygulandığında HepG2 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığını bildirmiştir. Da Silva ve ark. (65) HepG2 hücrelerinde 72 saat süreyle uygulanan rapamisinin 10, 20 ve 30 nM konsantrasyonlarda hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmezken, 40 ve 50 nM konsantrasyonlarda ise hücre canlılığını anlamlı olarak azaltığını bildirmişlerdir. Diğer yandan Rastegar ve ark. (66) ise HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 5 nM rapamisinin bile hücre canlılığını anlamlı oranda azaltığını bildirmişlerdir. Hücre canlılığı testi sonuçlarımıza göre HepG2 hücrelerine toksik olmayan 1 mM 3-MA ve 50 nM rapamisin seçilerek sonraki deneylerde kullanıldı.

Çalışmamızda 10 mM akrilamid HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulandığında hücre canlılığını kontrole göre anlamlı oranda azalttı. Aynı zamanda 10 mM akrilamid otofajiyi izlemek için en yaygın kullanılan belirteçlerden biri olan LC3B-II düzeyini (67) ve pro-kaspaz-3'ün yarılması ile oluşan ve apoptozun önemli bir göstergesi olan aktif kaspaz-3 düzeyini (15) arttırdı. Literatürde de çalışmamızla uyumlu olarak HepG2 hücrelerinde 10 mM akrilamidin sitotoksik olduğu, otofajiyi ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (30,53).

Otofaji inhibitörü olarak 10 mM akrilamid ile birlikte uyguladığımız 1 mM 3-MA, HepG2 hücrelerinde hücre canlılığında, LC3B-II ve prokaspaz-3 düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmazken, aktif kaspaz-3 düzeylerinde ise azalmaya yol açtı. 3-MA uygulaması ile elde ettiğimiz sonuçlar, 1 mM 3-MA'nın 10 mM akrilamid uygulaması ile oluşan otofajiyi ve hücre ölümünü inhibe etmede yetersiz kaldığını göstermekte olup bununla birlikte apoptozu azaltığını göstermektedir. 10 mM akrilamid ile birlikte uygulanan 50 nM rapamisin ise HepG2 hücrelerinde hücre canlılığını ve aktif kaspaz-3 düzeylerini anlamlı olarak azaltırken, LC3B-II ve prokaspaz-3 düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadı. Rapamisin uygulaması ile elde ettiğimiz sonuçlar, 50 nM rapamisinin HepG2 hücrelerinde tek başına uygulandığında toksik olmamasına rağmen, 10 mM akrilamid ile birlikte uygulandığında otofajiyi anlamlı olarak değiştirmemesine rağmen hücre ölümünü arttırken apoptozu azalttığını göstermektedir. Rapamisin esas olarak mTOR inhibisyonu üzerinden etki

göstermektedir. Al-Hajm ve ark. (53) yaptığı çalışmada 10 mM akrilamidin, mTOR fosforilasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Rapamisinin, akrilamid ile birlikte uygulandığında hücre ölümünü arttırması, akrilamide bağlı ölümde mTOR inhibisyonunun rolünün olabileceğini göstermektedir. Literatürde Deng ve ark (68), U87-MG glioblastoma hücrelerinde akrilamidin LC3B-II düzeylerinde ve otofagozom oluşumunda artışa yol açmasına rağmen otofajik akışı bloklayarak koruyucu otofajiyi inhibe ettiğini bildirmiştir. Aynı zamanda Al-Hajm ve ark. (53), akrilamid toksisitesinde N-asetil sisteinin hücre canlılığını ve ubikitin-proteazom sistemi üzerine koruyucu etkisi olmasına rağmen otofajiyi değiştirmediğini bildirmiştir. Çalışmamızda Hem 3-MA'nın hem de rapamisinin 10 mM akrilamide göre LC3B-II düzeylerini değiştirmemiş olması literatürü destekler nitelikte olup, akrilamidin LC3B-II dönüşümünü ve otofajiyi arttırmasına rağmen bu hücresel savunma yolağının belirli bir aşamadan sonra ilerleyemiyor olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda akrilamid uygulaması sonrası rapamisinin 24 saat sonunda sağ kalan hücrelerde otofajiyi değiştirmemesine rağmen apoptozu azaltması da, otofajideki esas düzenleyici olan mTOR yolağının inhibitörü olan rapamisinin akrilamid uygulanan hücrelerdeki hücre ölümünü arttırma yolunun apoptoza kıyasla daha çok otofajik hücre ölümü üzerinden olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak çalışmamız, akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde 1 mM 3-MA'nın hücre canlılığında ve LC3B-II düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmazken, aktif kaspaz-3 düzeylerinde azalmaya yol açtığını; 50 nM rapamisinin ise hücre canlılığını ve aktif kaspaz-3 düzeylerini anlamlı olarak azaltırken, LC3B-II düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığını gösterdi.

Çalışmamız sonucunda görülen HepG2 hücrelerinde akrilamid uygulamasına bağlı olarak artan otofajinin, otofaji inhibitörü 3-MA veya otofaji aktivatörü rapamisin ile değişmemesi ve rapamisinin hücre ölümünü artırırken apoptozu azaltması, literatürdeki çalışmalar ile birlikte değerlendirildiğinde akrilamid toksisitesinde artan otofajinin akrilamid toksisitesinden kurtarıcı olarak işleyen bir hücre korunma mekanizması olmak yerine, geri dönüşümsüz, sağlıklı ilerlemeyen ve otofajik hücre ölümü ile ilişkili olabilecek bir durum olabileceğini düşündürmektedir.

SONUÇLAR

Bu çalışmanın amacı, akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde 3-MA ve rapamisinin hücre canlılığına, LC3B-II ve aktif kaspaz-3 düzeylerine etkisini araştırmaktı. Hücre canlılığı ölçümleri MTT testi ile; LC3B-II, aktif kaspaz-3 ve aktif kaspaz-3 düzeyleri western blot yöntemi ile ölçüldü. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulandığında:

1. 1 mM 3-MA hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak değiştirmedi.
2. 2.5 mM 3-MA hücre canlılığını kontrol ve 1 mM 3-MA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
3. 5 mM 3-MA hücre canlılığını kontrole, 1 mM ve 2.5 mM 3-MA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
4. 10 mM 3-MA hücre canlılığını kontrole, 1 mM, 2.5 mM ve 5 mM 3-MA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
5. 25 nM rapamisin hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak değiştirmedi.
6. 50 nM rapamisin hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak değiştirmedi.
7. 100 nM rapamisin hücre canlılığını, kontrole, 25 nM ve 50 nM rapamisin uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
8. 250 nM rapamisin hücre canlılığını, kontrole, 25 nM ve 50 nM rapamisin uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
9. 10 mM akrilamid hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak azalttı.
10. 10 mM akrilamid ile birlikte 1 mM 3-MA hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak azalttı.

11. 10 mM akrilamid ile birlikte 50 nM rapamisin hücre canlılığını kontrole, 10 mM akrilamid ve 10mM akrilamid ile birlikte 1 mM 3-MA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
12. 10 mM akrilamid LC3B-II düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
13. 10 mM akrilamid ile birlikte 1 mM 3-MA LC3B-II düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
14. 10 mM akrilamid ile birlikte 50 nM rapamisin LC3B-II düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
15. 10 mM akrilamid ile birlikte 1 mM 3-MA LC3B-II düzeylerini 10 mM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak değiştirmedi.
16. 10 mM akrilamid ile birlikte 50 nM rapamisin LC3B-II düzeylerini 10 mM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak değiştirmedi.
17. 10 mM akrilamid prokaspaz-3 düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak azalttı.
18. 10 mM akrilamid ile birlikte 1 mM 3-MA prokaspaz-3 düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak azalttı.
19. 10 mM akrilamid ile birlikte 50 nM rapamisin prokaspaz-3 düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak azalttı.
20. 10 mM akrilamid ile birlikte 1 mM 3-MA, prokaspaz-3 düzeylerini 10 mM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak değiştirmedi.
21. 10 mM akrilamid ile birlikte 50 nM rapamisin prokaspaz-3 düzeylerini 10 mM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak değiştirmedi.
22. 10 mM akrilamid aktif kaspaz-3 düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
23. 10 mM akrilamid ile birlikte 1 mM 3-MA aktif kaspaz-3 düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
24. 10 mM akrilamid ile birlikte 50 nM rapamisin aktif kaspaz-3 düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
25. 10 mM akrilamid ile birlikte 1 mM 3-MA, aktif kaspaz-3 düzeylerini 10 mM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
26. 10 mM akrilamid ile birlikte uygulanan 50 nM rapamisin prokaspaz-3 düzeylerini 10 mM akrilamid ve 10 mM akrilamid ile birlikte 1 mM 3-MA uygulanan hücrelere göre anlamlı azalttı.

Sonuç olarak çalışmamız, akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde 1 mM 3-MA'nın hücre canlılığında ve LC3B-II düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmazken, aktif

kaspaz-3 düzeylerinde ise azalmaya yol açtığını; 50 nM rapamisinin ise hücre canlılığını ve aktif kaspaz-3 düzeylerini anlamlı olarak azaltırken, LC3B-II düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığını gösterdi.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde 3-metil adenin ve rapamisinin hücre canlılığına, mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3-II ve aktif kaspaz-3 düzeylerine etkisini araştırmaktır.

HepG2 hücrelerine tek başına uygulanan akrilamid, 3-metil adenin, rapamisin ve akrilamid ile birlikte uygulanan 3-metil adenin ve rapamisinin; hücre canlılığına etkisi 3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür testi ile, mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3-II, prokaspaz-3 ve aktif kaspaz-3 protein düzeyleri western blot yöntemiyle ölçüldü.

HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 2.5 mM, 5 mM ve 10 mM 3-metil adenin ve 100 nM ve 250 nM rapamisin hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı. 10 mM akrilamid ve 10 mM akrilamid ile birlikte uygulanan 1 mM 3-metil adenin ve 50 nM rapamisin hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı. 10 mM akrilamid ile birlikte uygulanan 50 nM rapamisin hücre canlılığını 10 mM akrilamid ve 10 mM akrilamid ile birlikte 3-metil adenin uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı. 10 mM akrilamid mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3-II ve aktif kaspaz-3 düzeylerini anlamlı olarak arttırırken prokaspaz-3 düzeylerini anlamlı olarak azalttı. 1 mM 3-metil adenin ve 50 nM rapamisin 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3-II ve prokaspaz-3 düzeylerini anlamlı olarak değiştirmezken aktif kaspaz-3 düzeylerini anlamı olarak azalttı.

Sonuç olarak çalışmamız, akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde 1 mM 3-metil adeninin hücre canlılığında ve mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3-II düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmazken, aktif kaspaz-3 düzeylerinde ise azalmaya yol açtığını;

50 nM rapamisinin ise hücre canlılığını ve aktif kaspaz-3 düzeylerini anlamlı olarak azaltırken, mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3-II düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığını gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, HepG2, otofaji, apoptoz

THE EFFECT OF AUTOPHAGY ON CELL DEATH IN ACRYLAMIDE TOXICITY IN HEPG2 CELLS

SUMMARY

This study aims to investigate the effect of 3-methyl adenine and rapamycin on cell death, microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-II, and active caspase-3 protein levels in acrylamide toxicity in acrylamide-treated HepG2 cells.

The effects of 3-methyl adenine and rapamycin alone or together with acrylamide on cell viability were measured by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide test, and microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-II, active caspase-3 and procaspase -3 protein levels were measured by western blot method.

2.5 mM, 5 mM, and 10 mM 3-methyl adenine and 100 nM and 250 nM rapamycin applied to HepG2 cells for 24 hours significantly reduced cell viability. 1 mM 3-methyl adenine and 50 nM rapamycin co-administered with 10 mM acrylamide and 10 mM acrylamide significantly reduced cell viability. 50 nM rapamycin co-administered with 10 mM acrylamide significantly decreased cell viability compared to cells treated with 10 mM acrylamide and 10 mM acrylamide with 3-methyl adenine. 10 mM acrylamide significantly increased the levels of microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-II and active caspase-3, while it significantly decreased the levels of procaspase-3. While 1 mM 3-methyl adenine and 50 nM rapamycin did not significantly change the levels of microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-II and procaspase-3 in cells treated with 10 mM acrylamide, it significantly decreased the levels of active caspase-3.

Our study showed that while 1 mM 3-methyl adenine did not cause a significant change in cell viability and microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-II levels in acrylamide-treated HepG2 cells, it caused a decrease in active caspase-3 levels; 50 nM rapamycin significantly decreased cell viability and active caspase-3 levels, while it did not cause a significant change in microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-II levels.

Keywords: Acrylamide, HepG2, autophagy, apoptosis

KAYNAKLAR

1. Song D, Xu C, Holck AL, Liu R. Acrylamide inhibits autophagy, induces apoptosis and alters cellular metabolic profiles. Ecotoxicol Environ Saf 2021;208:111543.

2. Liu Y, Wang R, Zheng K, Xin Y, Jia S, Zhao X. Metabonomics analysis of liver in rats administered with chronic low-dose acrylamide. Xenobiotica 2020;50(8):894-905.

3. Mollakhalili-Meybodi N, Khorshidian N, Nematollahi A, Arab M. Acrylamide in bread: a review on formation, health risk assessment, and determination by analytical techniques. Environ Sci Pollut Res Int 2021;28(13):15627-45.

4. Arzumanian VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. Int J Mol Sci 2021;22(23):13135.

5. Wang A, Chen X, Wang L, Jia W, Wan X, Jiao J et al. Catechins protect against acrylamide- and glycidamide-induced cellular toxicity via rescuing cellular apoptosis and DNA damage. Food Chem Toxicol 2022;167:113253.

6. Grootaert MOJ, Roth L, Schrijvers DM, De Meyer GRY, Martinet W. Defective Autophagy in Atherosclerosis: To Die or to Senesce? Oxid Med Cell Longev 2018;2018:7687083.

7. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. J Pathol 2010;221(1):3-12.

8. Allaire M, Rautou PE, Codogno P, Lotersztajn S. Autophagy in liver diseases: Time for translation?. J Hepatol 2019;70(5):985-98.

9. Li YJ, Lei YH, Yao N, Wang CR, Hu N, Ye WC et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer. Chin J Cancer 2017;36(1):52.

10. Singh AK, Kashyap MP, Tripathi VK, Singh S, Garg G, Rizvi SI. Neuroprotection through rapamycin-ınduced activation of autophagy and PI3K/Akt1/mTOR/CREB signaling

against amyloid-β-ınduced oxidative stress, synaptic/neurotransmission dysfunction, and neurodegeneration in adult rats. Mol Neurobiol 2017;54(8):5815-28.

11. Liu Y, Song A, Wu H, Sun Y, Dai M. Paeonol inhibits apoptosis of vascular smooth muscle cells via up-regulation of autophagy by activating class III PI3K/Beclin-1 signaling pathway. Life Sci 2021;264:118714.

12. Dai S, Wang B, Li W, Wang L, Song X, Guo C et al. Systemic application of 3-methyladenine markedly inhibited atherosclerotic lesion in ApoE-/- mice by modulating autophagy, foam cell formation and immune-negative molecules. Cell Death Dis 2016;7(12):e2498.

13. Majtnerová P, Roušar T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. Mol Biol Rep 2018;45(5):1469-78.

14. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 2007;35(4):495-516.

15. Boudreau MW, Peh J, Hergenrother PJ. Procaspase-3 Overexpression in Cancer: A Paradoxical Observation with Therapeutic Potential. ACS Chem Biol 2019;14(11):2335-48.

16. Michalak J, Czarnowska-Kujawska M, Klepacka J, Gujska E. Effect of Microwave Heating on the Acrylamide Formation in Foods. Molecules 2020;25(18):4140.

17. Koszucka A, Nowak A, Nowak I, Motyl I. Acrylamide in human diet, its metabolism, toxicity, inactivation and the associated European Union legal regulations in food industry. Crit Rev Food Sci Nutr 2020;60(10):1677-92.

18. Zhivagui M, Ng AWT, Ardin M, Churchwell MI, Pandey M, Renard C et al. Experimental and pan-cancer genome analyses reveal widespread contribution of acrylamide exposure to carcinogenesis in humans. Genome Res 2019;29(4):521-31.

19. Kowalska M, Żbikowska A, Onacik-Gür S, Kowalska D. Acrylamide in food products - eating habits and consumer awareness among Medical School students. Ann Agric Environ Med 2017;24(4):570-4.

20. ALjahdali N, Carbonero F. Impact of Maillard reaction products on nutrition and health: Current knowledge and need to understand their fate in the human digestive system. Crit Rev Food Sci Nutr 2019;59(3):474-87.

21. Murata M. Browning and pigmentation in food through the Maillard reaction. Glycoconj J 2021;38(3):283-92.

22. Baskar G, Aiswarya R. Overview on mitigation of acrylamide in starchy fried and baked foods. J Sci Food Agric 2018;98(12):4385-94.

23. Kopanska M, Muchacka R, Czech J, Batoryna M, Formicki G. Acrylamide toxicity and cholinergic nervous system. J Physiol Pharmacol 2018;69(6):10.26402

24. Semla M, Goc Z, Martiniaková M, Omelka R, Formicki G. Acrylamide: a common food toxin related to physiological functions and health. Physiol Res 2017;66(2):205-17.

25. Kaçar S. , Şahintürk V. Bir Çoklu Organ Toksini: Akrilamit. Osmangazi Tıp Dergisi 2018;40(1): 94-100.

26. Wu B, Chai X, He A, Huang Z, Chen S, Rao P et al. Inhibition of acrylamide toxicity in vivo by arginine-glucose maillard reaction products. Food Chem Toxicol 2021;154:112315.

27. Das AB, Srivastav PP. Acrylamide in snack foods. Toxicol Mech Methods 2012;22(3):163-9.

28. Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. Methods Mol Biol 2015;1250:77-93.

29. Tsuji T, Morita SY, Nakamura Y, Ikeda Y, Kambe T, Terada T. Alterations in cellular and organellar phospholipid compositions of HepG2 cells during cell growth. Sci Rep 2021;11(1):2731.

30. Chu Q, Zhao Y, Shi X, Han W, Zhang Y, Zheng X et al. In vivo-like 3-D model for sodium nitrite- and acrylamide-induced hepatotoxicity tests utilizing HepG2 cells entrapped in micro-hollow fibers. Sci Rep 2017;7(1):14837.

31. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. Nat Rev Cancer 2017;17(9):528-42.

32. Antunes F, Erustes AG, Costa AJ, Nascimento AC, Bincoletto C, Ureshino RP et al. Autophagy and intermittent fasting: the connection for cancer therapy?. Clinics (Sao Paulo) 2018;73(suppl 1):e814s.

33. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. Cell Death Differ 2015;22(3):377-88.

34. Kuma A, Komatsu M, Mizushima N. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. Autophagy 2017;13(10):1619-28.

35. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. Cell Res. 2014;24(1):24-41.

36. Nakamura S, Izumi M. Chlorophagy is ATG gene-dependent microautophagy process. Plant Signal Behav 2019;14(1):1554469.

37. Robert G, Jacquel A, Auberger P. Chaperone-Mediated Autophagy and Its Emerging Role in Hematological Malignancies. Cells. 2019;8(10):1260.

38. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. Mol Cell 2010;40(2):280-93.

39. Huang T, Song X, Yang Y, Wan X, Alvarez AA, Sastry N et al. Autophagy and Hallmarks of Cancer. Crit Rev Oncog 2018;23(5-6):247-67.

40. Yin H, Wu H, Chen Y, Zhang J, Zheng M, Chen G et al. The Therapeutic and Pathogenic Role of Autophagy in Autoimmune Diseases. Front Immunol 2018;9:1512.

41. Schaaf MB, Keulers TG, Vooijs MA, Rouschop KM. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. FASEB J 2016;30(12):3961-78.

42. Shim MS, Nettesheim A, Hirt J, Liton PB. The autophagic protein LC3 translocates to the nucleus and localizes in the nucleolus associated to NUFIP1 in response to cyclic mechanical stress. Autophagy 2020;16(7):1248-61.

43. Heckmann BL, Yang X, Zhang X, Liu J. The autophagic inhibitor 3-methyladenine potently stimulates PKA-dependent lipolysis in adipocytes. Br J Pharmacol 2013;168(1):163-71.

44. Kosic M, Paunovic V, Ristic B, Mircic A, Bosnjak M, Stevanovic D et al. 3-Methyladenine prevents energy stress-induced necrotic death of melanoma cells through autophagy-independent mechanisms. J Pharmacol Sci 2021;147(1):156-67.

45. Wang H, Liu Y, Wang D, Xu Y, Dong R, Yang Y et al. The Upstream Pathway of mTOR-Mediated Autophagy in Liver Diseases. Cells 2019;8(12):1597.

46. Ko JH, Yoon SO, Lee HJ, Oh JY. Rapamycin regulates macrophage activation by inhibiting NLRP3 inflammasome-p38 MAPK-NFκB pathways in autophagy- and p62-dependent manners. Oncotarget 2017;8(25):40817-31.

47. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. Biosci Rep 2019;39(1):BSR20180992.

48. Tower J. Programmed cell death in aging. Ageing Res Rev 2015;23(Pt A):90-100.

49. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biol Int 2019;43(6):582-92.

50. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J Exp Clin Cancer Res 2011;30(1):87.

51. Yang F, He Y, Zhai Z, Sun E. Programmed Cell Death Pathways in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. J Immunol Res 2019;2019:3638562.

52. Beroske L, Van den Wyngaert T, Stroobants S, Van der Veken P, Elvas F. Molecular Imaging of Apoptosis: The Case of Caspase-3 Radiotracers. Int J Mol Sci 2021;22(8):3948.

53. Al-Hajm AYS, Ozgun E. Effects of acrylamide on protein degradation pathways in human liver-derived cells and the efficacy of N-acetylcysteine and curcumin. Drug Chem Toxicol 2022;45(4):1536-43.

54. 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.

55. Ahmadian S, Barar J, Saei AA, Fakhree MA, Omidi Y. Cellular toxicity of nanogenomedicine in MCF-7 cell line: MTT assay. J Vis Exp 2009;26:1191.

56. Lowry O, Rosebrough H, Farr NJ, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193(1):265-75.

57. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227(5259):680-5.

58. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH image to imageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 2012;9(7):671-5.

59. Zong C, Hasegawa R, Urushitani M, Zhang L, Nagashima D, Sakurai T et al. Role of microglial activation and neuroinflammation in neurotoxicity of acrylamide in vivo and in vitro. Arch Toxicol 2019;93(7):2007-19.

60. Zhao T, Guo Y, Ji H, Mao G, Feng W, Chen Y et al. Short-term exposure to acrylamide exacerbated metabolic disorders and increased metabolic toxicity susceptibility on adult male mice with diabetes. Toxicol Lett 2022;356:41-53.

61. Wu D, Cederbaum AI. Inhibition of autophagy promotes CYP2E1-dependent toxicity in HepG2 cells via elevated oxidative stress, mitochondria dysfunction and activation of p38 and JNK MAPK. Redox Biol 2013;1(1):552-65.

62. Hu P, Cheng B, He Y, Wei Z, Wu D, Meng Z. Autophagy suppresses proliferation of HepG2 cells via inhibiting glypican-3/wnt/β-catenin signaling. Onco Targets Ther 2018;11:193-200.

63. Ma T, Li YY, Zhu J, Fan LL, Du WD, Wu CH et al. Enhanced autophagic flux by endoplasmic reticulum stress in human hepatocellular carcinoma cells contributes to the maintenance of cell viability. Oncol Rep 2013;30(1):433-40.

64. Zhang Q, Yang M, Qu Z, Zhou J, Jiang Q. Autophagy prevention sensitizes AKTi-1/2-induced anti-hepatocellular carcinoma cell activity in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun 2016;480(3):334-40

65. da Silva EF, Krause GC, Lima KG, Haute VG, Pedrazza L, Mesquita FC et al. Rapamycin and fructose-1,6-bisphosphate reduce the HEPG2 cell proliferation via increase of free radicals and apoptosis. Oncol Rep 2016;36(5):2647-52.

66. Rastegar M, Marjani HA, Yazdani Y, Shahbazi M, Golalipour M, Farazmandfar T. Investigating Effect of Rapamycin and Metformin on Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma Cell Line. Adv Pharm Bull 2018;8(1):63-8.

67. Schläfli AM, Berezowska S, Adams O, Langer R, Tschan MP. Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in formalin fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry. Eur J Histochem 2015;59(2):2481.

68. Deng L, Zhao M, Cui Y, Xia Q, Jiang L, Yin H et al. Acrylamide induces intrinsic apoptosis and inhibits protective autophagy via the ROS mediated mitochondrial dysfunction pathway in U87-MG cells [published online ahead of print, 2021 Sep 22]. Drug Chem Toxicol 2021;1-12.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller **Sayfa no**

Şekil 1. 3-Metil adeninin hücre canlılığına etkisi 14
Şekil 2. Rapamisinin hücre canlılığına etkisi 15
Şekil 3. Akrilamid uygulanan hücrelerde 3-metil adenin ve rapamisinin hücre canlılığına etkisi 16
Şekil 4. Akrilamid uygulanan hücrelerde 3-metil adenin ve rapamisinin mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3-II düzeylerine etkisi 17
Şekil 5. Akrilamid uygulanan hücrelerde 3-metil adenin ve rapamisinin prokaspaz-3 ve aktif kaspaz-3 düzeylerine etkisi 19

ÖZGEÇMİŞ

Uzunköprü'de doğdum. İlk ve orta öğretimimi Uzunköprü'de tamamladım. İstanbul Üniversitesi Florence Nightingale Hemşirelik Yüksekokulu'ndan mezun oldum. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde, Prof. Dr. Murat Dilmener Acil Durum Hastanesi'nde hemşire olarak görev yaptım. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya bölümünde yüksek lisans eğitimi almaktayım.

EKLER

Ek 1

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

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2020/363	
	PROTOKOL ADI	HepG2 Hücrelerinde Oluşturulan Akrilamid Toksisitesinde Otofajinin Hücre Ölümüne 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: 15/17**		**Tarih:14.09.2020**
	Fakültemiz Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Gülben SAYILAN ÖZGÜN'ün sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen) çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu Değerlendirme Formunda belirtilen eksikliklerin giderildikten sonra yeniden değerlendirilmesine 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
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gülsüm ÖNAL Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Başkan Yardımcısı	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. F. Neslin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Işık GÖRKER Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Çocuk ve Ergen Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	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	
Prof. Dr. Galip EKUKLU Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Filiz TÜTÜNCÜLER KÖKENLİ Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E H	E H	
Öğr. Gör. Dr. Sinan ATEŞ 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	
Prof. Dr. Serhat OĞUZ Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Avukat Emine NURLU Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E H	E H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKIN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a.
Dekan Yrd