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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Eray ÖZGÜN

AKRİLAMİD UYGULANAN HEPG2 HÜCRELERİNDE ÖJENOLÜN HÜCRE CANLILIĞINA, OKSİDATİF STRESE VE ISI ŞOK PROTEİN YANITINA ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Özge POSTA

Referans no: 10322967

EDİRNE - 2021

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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Eray ÖZGÜN

AKRİLAMİD UYGULANAN HEPG2 HÜCRELERİNDE ÖJENOLÜN HÜCRE CANLILIĞINA, OKSİDATİF STRESE VE ISI ŞOK PROTEİN YANITINA ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Özge POSTA

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2019/163

Tez no:

EDİRNE - 2021

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. Eray ÖZGÜN başta olmak üzere, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. İlker DIBIRDIK'a, Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'a, emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a ve Doç. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN'e, teşekkür ederim. Deneylerim sırasında yardımlarından dolayı Arş. Gör. Dr. Tuğçe KARABAŞ'a, tüm çalışma arkadaşlarıma ve çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **AKRİLAMİD** 3
- **HEPG2 HÜCRE HATTI** 4
- **OKSİDATİF STRES VE PROTEİN OKSİDASYONU** 4
- **HEM OKSİJENAZ-1** 5
- **ISI ŞOK PROTEİNİ 70** 6
- **ÖJENOL** 7

GEREÇ VE YÖNTEMLER 9

BULGULAR 15

TARTIŞMA 25

SONUÇLAR 28

ÖZET 31

SUMMARY 32

KAYNAKLAR 34

ŞEKİLLER LİSTESİ 40

ÖZGEÇMİŞ 41

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

CYP **:** Sitokrom P450

HO-1 **:** Hem oksijenaz 1

HSP70 **:** Isı şok proteini 70

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

NRF2 **:** Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2

GİRİŞ VE AMAÇ

Akrilamid, endüstride poliakrilamid sentezinde, atık su arıtımı, kağıt, plastik ve kozmetik endüstrilerinde ve ayrıca laboratuvarlarda kullanılan bir kimyasaldır (1). Aynı zamanda akrilamid Maillard reaksiyonu ile 120 °C üzerindeki sıcaklıklarda gıdalarda çoğunlukla serbest asparajin ile karbonhidratlardaki indirgen şekerler arasındaki reaksiyon sonucu da oluşur (2). Akrilamidin sitotoksik, genotoksik ve kanserojen etkileri olduğu bildirilmiştir. Vücuda alınan akrilamidin büyük bir kısımı karaciğerde glutatyon ile konjuge edilerek sitokrom P450 (CYP) ile metabolize olur (3). Akrilamid metabolize edilirken hücresel glutatyon depolarının tükenmesine ve reaktif oksijen türlerinin artışına neden olur (4).

Oksidatif stres, oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması sonucu oluşur (5). Oksidatif stres sonucunda oluşan serbest radikaller makromoleküllerde modifikasyonlara sebep olarak, yapı ve fonksiyonlarında bozukluklara yol açar. Bu modifikasyonlardan protein karbonilasyonu geri dönüşümsüz ve non-enzimatik olarak oluşan bir protein oksidasyonu ve oksidatif stres belirtecidir (6). Hem oksijenaz 1 (HO-1) Hem molekülünün karbonmonoksit, biliverdin ve demire indirgenmesinde rol oynayan, indüklenebilir, antioksidan bir enzimdir. Artan HO-1 aktivitesinin karaciğer hasarında hepatositleri serbest radikallerden koruyabileceği gösterilmiştir (7). Oksidatif stres gibi hücresel streslere yanıt olarak hücrede ısı şok proteini 70 (HSP70) gibi ısı şok proteinlerinin ekspresyonu artabilir. HSP70, aynı zamanda hücre içi protein homeostazının sağlanmasında da önemli rol oynar (8).

Karanfil yağında bulunan öjenolün, antibakteriyel, antifungal, antioksidan, analjezik, ve antipiretik etkileri olduğu bilinmektedir (9). Öjenolün hepatotoksisite üzerine de faydalı etkilerinin olduğu gösterilmiştir (10). HepG2 hücreleri insan kaynaklı hepatoma hücreleridir. Sınırsız ömürleri ve karaciğer parankim hücrelerinin özel işlevlerini koruduğu için karaciğer metabolizması, ilaç toksisitesi, çevresel ve diyete bağlı sitotoksik, genotoksik ve sitoprotektif ajanların tespitinde sıklıkla tercih edilen bir hücre hattıdır (11). HepG2 hücreleri karaciğerde akrilamid toksisitesinin hücresel düzeyde araştırıldığı çalışmalarda sıklıkla kullanılmıştır (4,12-14). Literatürde öjenolün akrilamid toksisitesi üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Bu çalışmanın amacı, akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde öjenolün hücre canlılığına, oksidatif strese ve ısı şok protein yanıtına etkisini araştırmaktır. Bu çalışma ile akrilamide bağlı karaciğer hasarında öjenolün etkisi ilk kez, HepG2 hücrelerinde oluşturulan akrilamid toksisitesi modeli kullanılarak gösterilmiştir.

GENEL BİLGİLER

AKRİLAMİD

Akrilamid (akrilik asit amid; 2-propenamid) kristal yapılı, beyaz, kokusuz bir bileşik olup su, etanol, eter ve kloroform gibi çözücülerle çözünebilir (15). Akrilamid ve polimerleri atık su arıtımı, kağıt ve tekstil endüstrileri ve laboratuvarda elektroforezde destek ortamının oluşturulması gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır (1). Endüstri dışında çoğunlukla ısı kaynaklı işlem sırasında Maillard reaksiyonuyla da akrilamid oluşabilir (16). Maillard reaksiyonu, karamelizasyon gibi non-enzimatik bir esmerleşme reaksiyonudur. Bu reaksiyonda gıdaların 120°C üzerindeki sıcaklıklara maruziyeti ile indirgen şekerlerin karbonil grubu ile özellikle asparajin olmak üzere aminoasitlerin amino grubu arasındaki kondenzasyon ile akrilamid oluşmaktadır (17). Gıdaların kızartma, kavurma ve fırınlama sırasında düşük nem ve yüksek sıcaklık koşullarında Maillard reaksiyonu oluşabilmektedir. Gıdalarda oluşan akrilamid oranını temel olarak asparajin başta olmak üzere serbest aminoasitler içeriği, indirgen şeker içeriği, pişirme ısısı, pişirme süresi ve ortamdaki nem belirlemektedir (18).

Vücuda alınan akrilamid, CYP enzimi ile esas olarak karaciğerde metabolize edilmektedir. Akrilamidin büyük bir kısmı direkt olarak glutatyon ile konjuge olmakta, bir miktar akrilamid ise CYP oksidaz sisteminin alt üyelerinden biri olan CYP 2E1 ile toksik bir metabolit olan glisidamide dönüşmekte ve ardından glutatyon ile konjuge olmaktadır. Akrilamid metabolizmasının son ürünleri idrarla vücuttan uzaklaştırılmaktadır (3). Akrilamid, hücre içinde glutatyonun tükenmesine ve reaktif oksijen türlerinin artışına yol açar. Oksidatif stresin artması ile hücrede DNA'nın, proteinlerin ve lipitlerin oksidasyonu yoluyla sitotoksik

etkilere ve bunların sonucunda akrilamide bağlı hücre ölümü veya kanserleşmesi olabileceği bildirilmektedir (19). Akrilamide uzun süreli maruz kalma sonucunda artan oksidatif stresin nörodejenerasyona, nefrotoksisiteye, reprodükif sistem hücrelerinde toksisiteye ve immünotoksisiteye neden olduğu gösterilmiştir (20-22).

Literatürde akrilamidin karaciğerde metabolize olurken glutatyonla konjuge olarak hücre içi redoks dengesini değiştirdiği ve karaciğerde toksisiteye neden olduğu gösterilmiştir (23,24). Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise 28 gün süreyle 15 mg/ kg dozunda akrilamid verildiğinde karaciğer dokusunda hücre dejenerasyonu ve kupffer hücre çoğalması görüldüğü bildirilmiştir (25). Aynı zamanda insanlarda akrilamid zehirlenmesinin karaciğeri etkilediği bildirilmiştir (26).

HEPG2 HÜCRE HATTI

HepG2 hücre hattı, hepatosellüler karsinomu olan 15 yaşındaki bir erkeğin karaciğer biyopsisinden izole edilmiştir. Hücreler epitelyal morfolojiye sahiptir ve albümin, transferrin, plazminojen gibi çeşitli ana plazma proteinlerini salgılamaktadır (27). Sınırsız ömürleri ve karaciğer parankim hücrelerinin özel işlevlerini koruması nedeniyle için karaciğer metabolizması, ilaç toksisitesi, çevresel ve diyete bağlı sitotoksik, genotoksik ve sitoprotektif ajanların tespitinde sıklıkla tercih edilen bir hücre hattıdır (11).

Literatürde karaciğerde akrilamid toksisitesinin hücresel düzeyde araştırıldığı çalışmalarda da sıklıkla HepG2 hücreleri kullanılmıştır (4,12-14). 10 mM akrilamidin HepG2 hücrelerinde sitotoksiteye ve protein yıkım yollarında bozulmaya (13), DNA hasarına (4), reaktif oksijen türlerinde artış ve glutatyon düzeylerinde azalma ile ilişkili genotoksisiteye (14) yol açtığı gösterilmiştir.

OKSİDATİF STRES VE PROTEİN OKSİDASYONU

Oksidatif stres, oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulmasıdır. Normal fizyolojik koşullar altında hücreler, oksidatif stres seviyesini kontrol eden oksidan ve antioksidan ajanlar arasındaki dengeyi koruyan özel moleküler stratejilerle donatılmıştır (28).

Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri dahil olmak üzere serbest radikaller hücrelerdeki çeşitli oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarının ortak metabolik ürünleridir. Hücrelerde, aşırı serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresi hafifletmek için çeşitli savunma mekanizmaları kullanılır. Enzimatik savunma sistemi, süperoksit dismutaz, katalaz,

glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz gibi çeşitli antioksidan enzimleri içerir. Enzimatik olmayan diğer savunmalar hücreleri oksidatif strese karşı koruyan antioksidan bileşiklerdir ve C vitamini, E vitamini, glutatyon, çeşitli karotenoidler ve flavonoidler gibi moleküller enzimatik olmayan antioksidanlara örnektir (29,30). Oksidatif stres; diyabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve karaciğerin enflamatuar, metabolik ve proliferatif hastalıkları gibi çeşitli hastalıkların ortaya çıkması ve gelişmesi ile yakından ilişkilidir (31).

Hücre içinde reaktif oksijen türlerinin artması proteinler de dahil olmak üzere makromoleküler hasar, hücresel apoptoz ve nekroz ile sonuçlanabilir. Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent olarak modifikasyonu sonucunda meydana gelmektedir (32). Protein karbonilasyonu, direkt olarak oksidatif stres veya indirekt olarak oksidatif strese bağlı oluşan ürünler aracılığıyla olabilir. Reaktif oksijen türlerinin direkt etkisi veya özellikle arginin, prolin, lizin ve treonin aminoasitlerin metal katalizli oksidasyonu, esas protein karbonilasyonu oluşum mekanizmalarıdır. Karbonhidrat ve lipidlerin oksidasyonu ile oluşan ürünler proteinlerdeki lizin, sistein ve histidin kalıntılarını modifiye ederek dolaylı olarak karbonilasyona neden olabilir (33). Proteinlerin karbonillenmesi non-enzimatik geri dönüşümsüz bir hasardır ve sıklıkla protein fonksiyon kaybına yol açar ve bu durum ciddi oksidatif hasarın ve hastalık kaynaklı protein fonksiyon bozukluğunun yaygın bir göstergesi olarak kabul edilir (34).

HEM OKSİJENAZ-1

Hem oksijenaz enzim sistemi hemen hemen tüm ökaryotlarda bulunmaktadır. Hem oksijenaz, hem molekülünün karbon monoksit, serbest demir ve biliverdine yıkılımını kataliz eden, hem metabolizmasında hız sınırlayıcı mikrozomal bir enzimdir (35). Memelilerde HO-1, hem oksijenaz 2 ve hem oksijenaz 3 olmak üzere üç hem oksijenaz izoformu tanımlanmıştır. Bunlar dokuya özgü gen ekspresyonu için farklı kalıplara sahiptir. Karaciğerde HO-1 ve hem oksijenaz 2 ekspresyonu gerçekleşmektedir. HO-1 normalde memeli dokusunda çok düşük seviyelerde bulunan formdur, indüklenebilir ve dalak ve karaciğerde yüksek oranda eksprese edilir (36). Substrat hem molekülüne ek olarak, geniş bir uyaran spektrumu HO-1 ekspresyonunu indükleyebilir. Bu tür ajanlar arasında nitrik oksit, sitokinler, ağır metaller, hormonlar, büyüme faktörleri, tiyol-reaktif maddeler, oksidanlar, aşırı oksijen ortamları, iskemi/reperfüzyon hasarı ve ultraviyole-A radyasyonu bulunur. Bu indükleme koşullarının birçoğu pro-oksidanlar tarafından uyarılması ile ilişkili olduğundan HO-1, oksidatif hücresel strese karşı indüklenebilir bir savunma mekanizması olarak kabul

edilir (37). HO-1 enziminin en önemli transkripsiyonel düzenleyicisi nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 (NRF2)'dir. NRF2 normal şartlar altında sitoplazmada Kelch-benzeri ECH-ilişkili protein 1 tarafından tutulmaktadır (38). Kelch-benzeri ECH-ilişkili protein 1, NRF2 geninin ubikitinasyonundan ve proteozomal yıkımından sorumludur. NRF2, hücrede reaktif oksijen türleri tarafından uyarılarak Kelch-benzeri ECH-ilişkili protein 1 proteininden ayrılır ve çekirdeğe transloke olur. NRF2 daha sonra küçük Maf proteini ile heterodimer oluşturur. NRF2-küçük Maf dimeri hücre savunma mekanizmasında görev alan birçok genin promotor bölgesinde bulunan antioksidan yanıt elementine bağlanarak aktive olur (39). NRF2 aktivasyonu birçok antioksidan ve hücre koruyucu enzimin ekspresyonunu indükler. Bunlardan biri olan HO-1; iltihaplanma, apoptozun düzenlenmesi ve hücresel homeostazın restorasyonunda yer alan birçok biyolojik koruyucu özelliğe sahip olan reaksiyon ürünleri (biliverdin, CO, demir) aracılığıyla antioksidan aktivitesini gerçekleştirmektedir (40). Yapılan çalışmalar, sitokinlerle indüklenmiş HO-1 enziminin katalizlediği son reaksiyon ürünleri olan CO ve biliverdinin apoptoz, karaciğer yetmezliği, karaciğerin iskemi ve reperfüzyon hasarı gibi birçok patolojiye karşı karaciğer dokusu üzerinde koruyucu ve terapötik etkilerinin varlığını göstermiştir (41-43).

ISI ŞOK PROTEİNİ 70

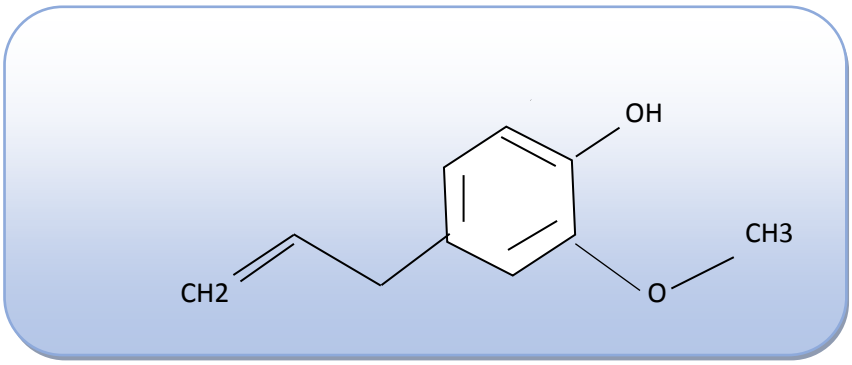
Isı şok proteinleri, moleküler şaperonlar olarak tanımlanan yüksek oranda korunmuş bir protein ailesidir. Protein katlanması ve bozulmasının düzenlenmesi yoluyla hücresel fonksiyonun korunmasında da kritik bir rol oynarlar. Isı şok proteinleri, ısı şok proteini 27, ısı şok proteini 40, ısı şok proteini 60, Hsp70, ısı şok proteini 90, ısı şok proteini 110 şeklinde moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılır (44). Isı şok proteinleri, bulundukları tüm dokularda aşırı zorlama ve diğer birçok stresin neden olduğu potansiyel hasara karşı doğal endojen savunma sisteminin bir kısmından sorumludur. Oksidatif stres, iskemi ve reperfüzyon, ozmotik stres, hipoksi, glikoz tükenmesi ve bunun gibi fizyolojik değişiklikler sonrasında kısa bir süre içinde spesifik dokularda eksprese edilirler (45). Isı şok proteini genlerindeki artış, ısı şoku transkripsiyon faktörü 1 tarafından transkripsiyonel seviyede aktive edilmektedir (46). Çalışmalar ısı şok proteini ailelerinin hücre içinde mitokondri, sitoplazma, endoplazmik retikulum ve çekirdek gibi çeşitli bölgelerde bulunduğunu göstermektedir (47).

Isı şok proteini 70 ailesi en çok korunan ve en iyi incelenen ısı şok proteini sınıflarından biridir. Endoplazmik retikulumda lokalize olan stresle indüklenebilir HSP70,

yapısal olarak eksprese edilen HSP70, mitokondriyal ısı şok proteini 75 ve glukoz ile düzenlenen protein 78, HSP70 ailesinin üyelerindendir. Normal koşullar altında, HSP70 yeni sentezlenen polipeptitlerin katlanmasına, multiprotein komplekslerinin birleştirilmesine ve proteinlerin hücresel zarlar boyunca taşınmasına yardımcı olarak adenozin trifosfata bağımlı moleküler şaperonlar olarak işlev görür (48). Ateroskleroz, konjestif kalp yetmezliği, ateş, enfeksiyon, yaşlanma, Alzheimer hastalığı, malign hastalıklar ve otoimmün bozukluklar gibi çeşitli bozukluklarda özellikle HSP70 miktarında artış görülmüştür (49). HSP70 stres altında proteinleri korumaktadır. Katlanmamış proteinlerin kümeleşmesini önleyerek polipeptitleri birbirine bağlar. Katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinler arasındaki dengeyi sağlar. Normal koşullarda hücrelerde çok düşük miktarlardayken stres altında yüksek miktarlarda indüklenmesi nedeniyle HSP70, sıklıkla araştırılan ısı şok proteinlerinden biridir (50). HSP70, hücreleri proteotoksik stresten korur, hücresel yaşlanmayı baskılar, sitotoksik ilaçlar ve radyasyon dahil hücresel stres ajanlarına karşı koruyucu etki göstererek apoptoza direnç kazandırır (51).

ÖJENOL

Öjenol (4-allil-2-metoksifenol), fenilpropanoid sınıfından ve karanfilin ana bileşeninde bulunan fenolik bir bileşiktir (Şekil 1) (52). Farmakolojik etkileri arasında antibakteriyel, antifungal, antiinflamatuvar, analjezik ve antioksidan etkileri yer almaktadır (53). Öjenolün radikal temizleyici ve iltihap önleyici işlevlerinin in-vitro ve in-vivo kronik hastalıkları modüle ettiği gösterilmiştir (54). Metabolik aktif HepG2 hücreleri üzerinde düşük konsantrasyonlarda dahi antioksidan aktivite gösteren öjenolün DNA'ya karşı zararlı, gonotoksik bir etki göstermediği belirtilmiştir (55).



Şekil 1. Öjenol molekül yapısı (52)

HepG2 hücre hattı ve yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçan primer hepatositleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada, öjenolün lipogenez ve lipolizle ilişkili proteinlerin gen ifadelerinin düzenlenmesi yoluyla lipit birikimini inhibe ettiği ve NAFLD üzerinde olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (56). Bu bağlamda öjenolün lipit peroksidasyonunu önleme yoluyla antioksidan etkilerinin varlığı ayrıca belirtilmiştir (57,58). Öjenolün karaciğer iskemi/reperfüzyon modelinde tümör nekroz faktör alfa ve nükleer faktör kappa B aktivasyonunu ve malondialdehit düzeyini azaltırken glutatyon düzeyini arttırdığı ve öjenolün hücre içi redoks durumunu düzenleyerek karaciğer hasarını azalttığı, karaciğer yapı ve fonksiyonunun korunmasında olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (59). Literatürde akrilamide bağlı karaciğer hasarında öjenolün etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlamadık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 21.12.2020 tarihinde TÜTF-BAEK 2020/456 protokol kodu ve 21/06 karar no ile onaylandı (Ek 1). Western blot yönteminde membranlarının kemilüminesans görüntülenmesi ve hücrelerin saklanması amacıyla kullanılan sıvı azot için Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet satın alındı. Diğer tüm deneysel çalışmalar, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yapıldı.

DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Akrilamid (Sigma)

Öjenol (Sigma)

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

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

Fetal sığır serumu (Thermo)

Antibiyotik-antimikotik (Thermo)

% 0.25 Tripsin-etilendiamin tetraasetik asit solüsyonu (Thermo)

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

Dimetil sülfoksit (Sigma)

Glisin (Sigma)

Sodyum klorür (Sigma)

Tuzlu fosfat tamponu tablet (Thermo)

Sodyum dodesil sülfat (Sigma)

Sodyum hidroksit (Merck)

N-etilmaleimid (Sigma)

İyodo asetamid (Sigma)

Etilendiamin tetraasetik asit (Sigma)

Sodyum florid (Merck)

Trizma baz (Sigma)

Bakır sülfat (Sigma)

Folin ayıracı (Merck)

Sodyum karbonat (Merck)

Potasyum sodyum tartarat (Sigma)

Trifloroasetik asit (Merck)

2,4 dinitrofenilhidrazin (Sigma**)**

Sığır serum albumini (Sigma)

N,N-Metilen bis-akrilamid (Merck)

N,N,N,N-tetrametiletilendiamin (Sigma)

2-merkaptoetanol (Sigma)

Amonyum persülfat (Sigma)

Bromofenol blue (Sigma)

Tween 20 (Santa Cruz)

Metanol (Merck)

Yağsız süt tozu (Sigma)

Pre-stained protein standardı (Thermo)

Poliviniliden diflorid membran (Merck)

α-Tübülin primer antikoru (Santa Cruz)

HO-1 primer antikoru (Santa Cruz)

HSP70 primer antikoru (Abcam)

Anti-dinitrofenol primer antikoru (Abcam)

Sekonder antikorlar (Abcam)

Kemilüminesans substrat (Thermo)

ANALİZLERDE KULLANILAN ALETLER VE DİĞER MALZEMELER

Sıvı azot tankı (Air Liquide GT21)

Santrifüj (Heraeus multifuge 3 S-R)

Mikrobiyolojik inkübatör (Thermo Scientific Heratherm IMC-18)

Biyogüvenlik kabini (Thermo Scientific Safe 2020)

Karbondioksitli inkübatör (Thermo Scientific Forma Steri-cycle 371)

Faz kontrast invert mikroskop (Olympus CKX 53)

Hassas terazi (Sartorius)

Vorteks (VELP), (Isolab)

pH metre (Inolab)

Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Daihan Scientific WiseStir)

Mikroplaka okuyucu (Biotek µQuant)

Dikey elektroforez sistemi (Cleaver Scientific Omnipage Mini Vertical System)

Western blotting sistemi (Cleaver Scientific Semi Dry Blotter)

Güç kaynağı (Cleaver Scientific)

Çalkalayıcı (Cleaver Scientific CW23)

-80 °C derin dondurucu (Heraeus HERAfreeze)

Kemilüminesans görüntüleme sistemi (Bio-rad ChemiDoc MP Imaging System)

Su banyosu (GFL 1083)

Otomatik pipetler (Eppendorf)

96 kuyucuklu plaka (SPL)

75 cm^2 flask (Isolab)

90 mm petri kabı (Isolab)

Steril şırınga filtre (GVS)

Hücre kazıyıcı (Isolab)

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

Steril ve non-steril otomatik pipet uçları (Jet Biofil), (Isolab), (Capp)

Steril ve non-steril santrifüj tüpü 15 ve 50 ml (Isolab)

Beher (Isolab)

Mezür (Isolab)

Balon joje (Isolab)

TEMEL HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI

Hücreler %10 fetal sığır serumu ve %1 antibiyotik-antimikotik içeren Eagle'ın minimum esansiyel medyumu ile %5 CO_2'li ortamda 37°C'de inkübatörde yaşatıldı.

Hücrelere tüm uygulamalar yatay hava akışlı biyogüvenlik kabini içerisinde steril malzemeler kullanılarak yapıldı. Deneylerde 12-20 arası hücre pasajları kullanıldı. Hücreler 75 cm^2 flasklarda çoğaltıldı. Hücrelerin haftada iki kez medyumu değiştirildi ve %80-90 hücre yoğunluğuna ulaşıldığında 1:4 veya 1:6 oranında pasajlandı.

HÜCRE CANLILIĞI ÖLÇÜMÜ

Hücre canlılığı ölçümü için MTT testi kullanıldı (60,61). 96 kuyucuklu plakalarda her bir kuyucuğa 10000 adet hücre ekildi. Öjenolün HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisinin araştırılması için hücreler 24 saat boyunca 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µM konsantrasyonlarda öjenol ile inkübe edildi. Öjenolün akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisinin araştırılması için hücreler 10 mM akrilamid ile aynı anda 10, 25, 50, 100, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarda öjenol ile 24 saat inkübe edildi. Öjenol dimetil sülfoksit ile çözüldü ve tüm deneylerde tüm grupların medyumunda %0.2 dimetil sülfoksit vardı. Akrilamid ise medyumda çözüldü. Deneysel prosedürler sonrası medyum alınarak yerine 10 µl MTT (5 mg/mL, tuzlu fosfat tamponunda çözüldü) ve 100 µl fenol red içermeyen Eagle'ın minimum esansiyel medyumu konuldu ve 4 saat inkübe edildi. 4 saat sonunda, MTT içeren medium alınarak oluşan formazan 200 µl dimetil sülfoksit 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 mikroplaka okuyucuda spektrofotometrik olarak 570/630 nm'de ölçüldü. Her bir deney için ölçülen absorbanslar kontrol grubunun ortalamasına bölünerek sonuçlar aynı plakadaki kontrol grubunun yüzdesi olarak verildi.

HEM OKSİJENAZ 1 ve ISI ŞOK PROTEİNİ 70 DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

Hem oksijenaz 1 ve HSP70 düzeyleri ölçümü için dikey elektroforez ve ardından western blot yöntemleri kullanıldı. Öjenolün HepG2 hücrelerinde HO-1 ve HSP70 düzeylerine etkisinin araştırılması için hücreler 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda öjenol ile 24 saat boyunca inkübe edildi. Öjenolün akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde HO-1 ve HSP70 düzeylerine etkisinin araştırılması için hücreler 10 mM akrilamid ile aynı anda 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda öjenol ile 24 saat boyunca inkübe edildi. Öjenol dimetil sülfoksit ile çözüldü ve tüm deneylerde tüm grupların medyumunda %0.2 dimetil sülfoksit vardı. Akrilamid ise medyumda çözüldü.

Deneysel prosedürler sonrası hücreler soğuk tuzlu fosfat tamponu ile iki kez yıkandı. Hücreler %1 sodyum dodesil sülfat, 1 mM etilendiamin tetraasetik asit, 10 mM **N-**

etilmaleimid, 10 mM iyodo asetamid, 50 mM sodyum florid içeren 10 mM tris tamponu (pH:8.0) ile homojenize edildi. Protein düzeyleri Lowry yöntemi ile standart olarak sığır serum albumini kullanılarak ölçüldü (62). Tüm numuneler için 10 µg protein %4-12 bis-tris jel elektroforezinde yürütüldü (63). Elektroforez sonrası proteinler yarı-ıslak western blotting sistemi kullanılarak jelden poliviniliden diflorid membrana aktarıldı. %5 yağsız süt tozu ile bloklanan membranlar gece boyu +4 °C'de primer antikorlar (HO-1 için 1:200, HSP70 için 1:5000 ve α-tübulin için 1:1000 dilüsyon) ile inkübe edildi. Ardından primer antikor ile uyumlu sekonder antikorlar (tümü için; 1:10000 dilüsyon) ile inkübe edilen membranlardaki spesifik proteinler kemilüminesans substrat ile görüntülendi. Membranlarda stripping Sennepin ve ark. göre yapıldı (64). Elde edilen bantlara ait yoğunluklar Image-J programı kullanılarak hesaplandı (65) ve her bir proteine ait sonuç aynı numunenin α-tübulin sonucuna oranlandı. Her bir grup için sonuçlar aynı deneydeki ve membrandaki kontrol grubuna oranlanarak kontrol grubunun katı olarak verildi.

PROTEİN KARBONİL ÖLÇÜMÜ

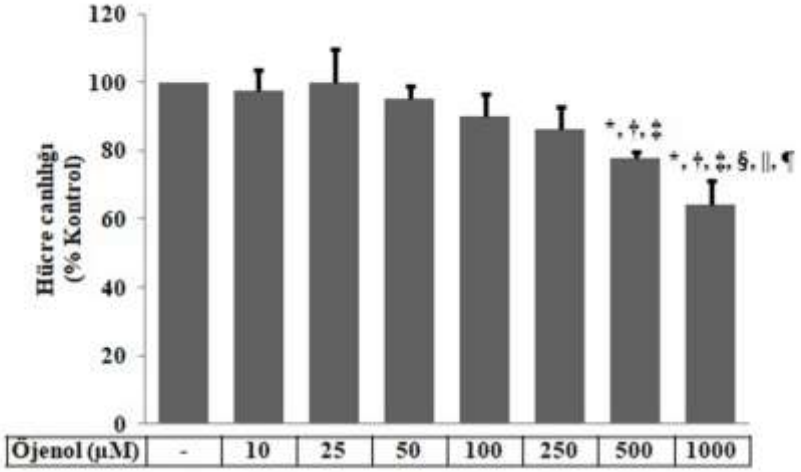
Protein karbonil ölçümü için de HO-1 ve HSP70 düzeyleri ölçümü için elde edilen numuneler kullanıldı. Protein karbonil ölçümü Levine ve ark. (66) metoduna göre yapıldı. Her bir numune için 5 µg protein, homojenizasyon için kullanılan tampon ile eşit hacime ayarlandı. Üzerine numune hacmi kadar %12 sodyum dodesil sülfat ve ardından numune hacminin iki katı kadar %10 trifloroasetik asit içinde çözünen 20 mM 2,4 dinitrofenilhidrazin eklendi. Karanlıkta 20 dakika inkübasyon sonrası karışıma, numune hacminin 1.5 katı kadar nötralizasyon çözeltisi (2M Tris/ 30% gliserol/ %19 2-merkaptoetanol) eklendi ve ardından yukarıda HO-1 ve HSP70 ölçümü bölümünde anlatıldığı şekilde dikey elektroforez ve western blot yöntemleri ile ve anti-dinitrofenol primer antikoru (1:5000 dilüsyon) kullanılarak gerçekleştirildi. Membranlarda stripping Sennepin ve ark. (2009) göre yapıldı (64). Elde edilen bantlara ait yoğunluklar Image-J programı kullanılarak hesaplandı (65) ve her bir proteine ait sonuç aynı numunenin α-tübulin sonucuna oranlandı. Her bir 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

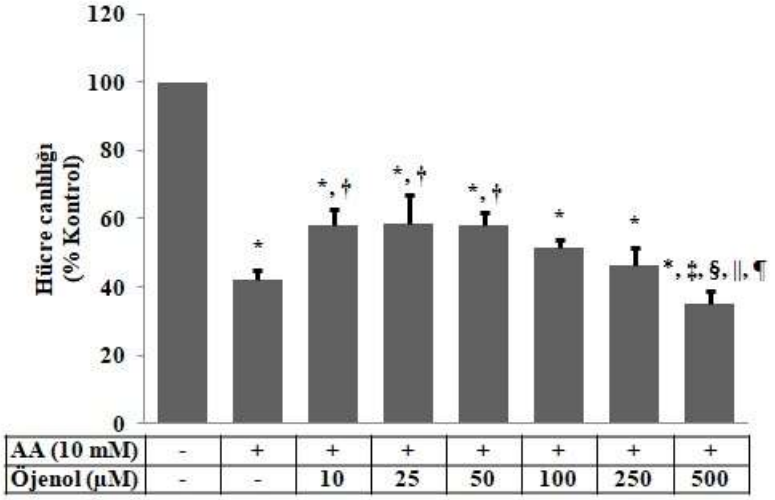
Öjenolün HepG2 hücrelerinde, hücre canlılığına etkisi Şekil 2'de verilmiştir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası kontrole göre hücre canlılıkları 10 µM öjenol uygulanan hücrelerde %97±6, 25 µM öjenol uygulanan hücrelerde %100±10, 50 µM öjenol uygulanan hücrelerde %95±4, 100 µM öjenol uygulanan hücrelerde %90±7, 250 µM öjenol uygulanan hücrelerde %86±7, 500 µM öjenol uygulanan hücrelerde %78±2 ve 1000 µM öjenol uygulanan hücrelerde %64±7 bulundu. 500 µM öjenol uygulanan hücrelerde hücre canlılığı kontrole, 10 µM öjenol ve 25 µM öjenol uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü (tümü için $p<0.05$). 1000 µM öjenol uygulanan hücrelerde hücre canlılığı kontrole, 10 µM öjenol, 25 µM öjenol, 50 µM öjenol, 100 µM öjenol ve 250 µM öjenol uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü (tümü için $p<0.05$).



Sonuçlar 3 bağımsız deneysel 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 µM öjenol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
‡: 25 µM öjenol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
§: 50 µM öjenol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
||: 100 µM öjenol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
¶: 250 µM öjenol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

Şekil 2. Öjenolün HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi

Öjenolün HepG2 hücrelerine 10 mM akrilamid ile birlikte uygulandığında hücre canlılığına etkisi Şekil 3'te verilmiştir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası kontrole göre hücre canlılıkları 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde %42±3; 10 mM akrilamid ile birlikte 10 µM öjenol uygulanan hücrelerde %58±5, 25 µM öjenol uygulanan hücrelerde %58±9, 50 µM öjenol uygulanan hücrelerde %58±3, 100 µM öjenol uygulanan hücrelerde %52±2, 250 µM öjenol uygulanan hücrelerde %46±5 ve 500 µM öjenol uygulanan hücrelerde %35±4 bulundu. Akrilamid uygulanan tüm hücrelerde hücre canlılığı kontrole göre anlamlı olarak düşüktü (tümü için $p<0.05$). 10 µM, 25 µM ve 50 µM öjenol 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdı (tümü için $p<0.05$). 10 mM akrilamid ile birlikte 500 µM öjenol uygulanan hücrelerde hücre canlılığı 10 mM akrilamid ile birlikte 10 µM, 25 µM, 50 µM ve 100 µM öjenol uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak düşüktü (tümü için $p<0.05$).



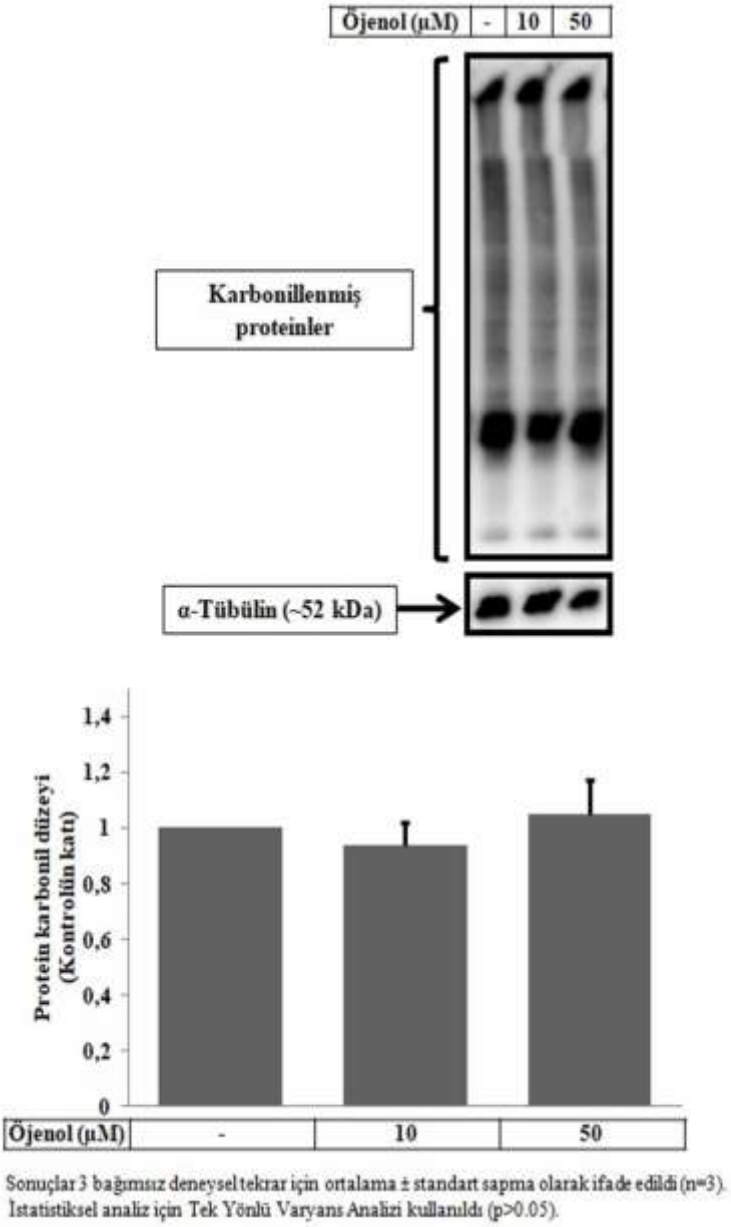
AA (10 mM)	-	+	+	+	+	+	+	+
Öjenol (µM)	-	-	10	25	50	100	250	500

Sonuçlar 3 bağımsız deneysel 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 AA ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
‡: 10 mM AA + 10 µM öjenol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
§: 10 mM AA + 25 µM öjenol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
||: 10 mM AA + 50 µM öjenol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
¶: 10 mM AA + 100 µM öjenol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

AA: Akrilamid.

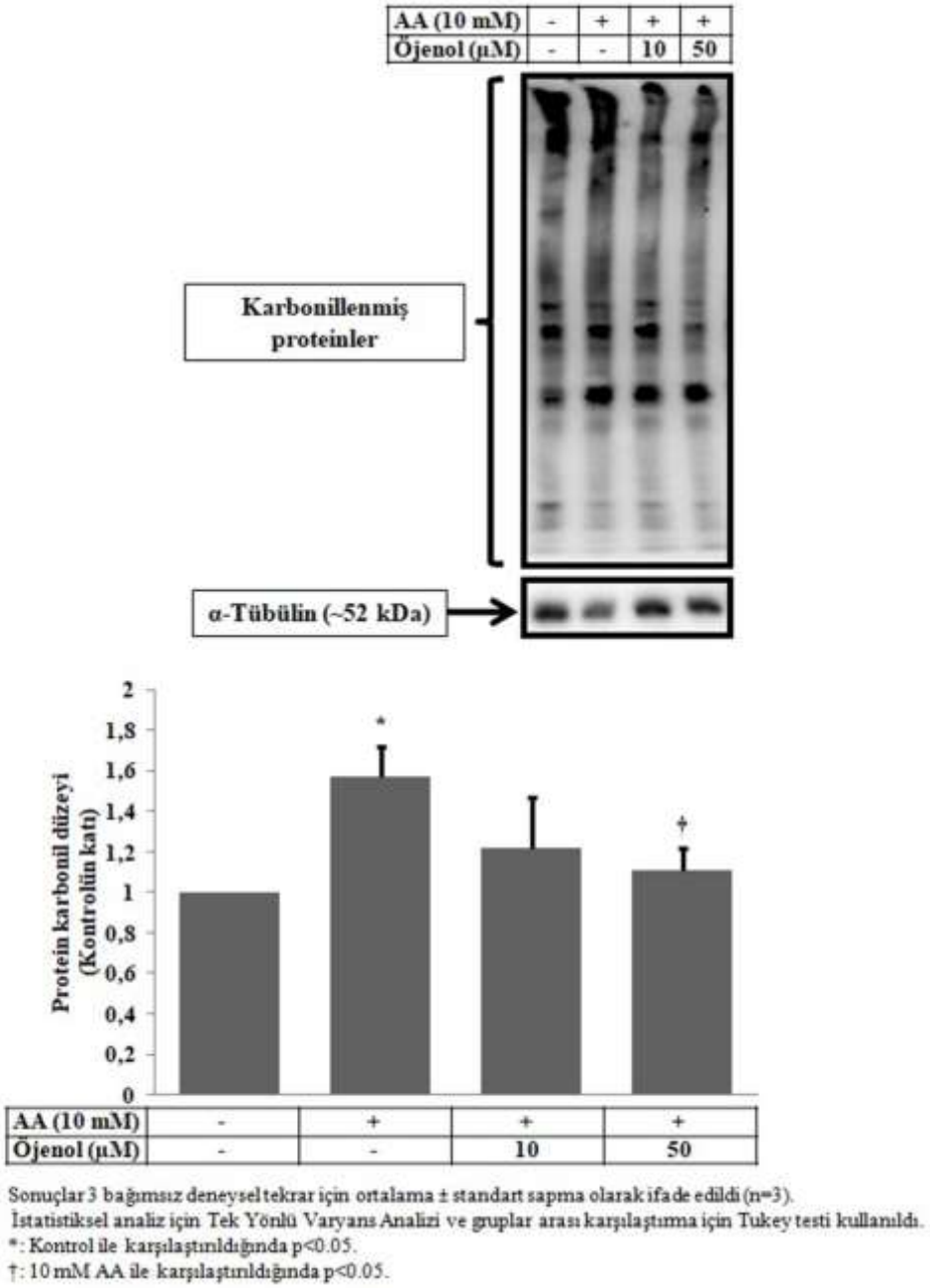
Şekil 3. Öjenolün akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi

Öjenolün HepG2 hücrelerinde, protein karbonil düzeylerine etkisi Şekil 4'de verilmiştir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası protein karbonil düzeyleri; 10 µM öjenol uygulanan hücrelerde kontrolün 0.94±0.08 katı, 50 µM öjenol uygulanan hücrelerde kontrolün 1.05±0.12 katı olarak bulundu. 10 µM ve 50 µM öjenol uygulaması HepG2 hücrelerinde protein karbonil düzeylerini anlamlı olarak değiştirmedi (her ikisi için $p>0.05$).



Şekil 4. Öjenolün HepG2 hücrelerinde protein karbonil düzeylerine etkisi

Öjenolün HepG2 hücrelerine 10 mM akrilamid ile birlikte uygulandığında protein karbonil düzeylerine etkisi Şekil 5'te verilmiştir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası kontrole göre protein karbonil düzeyleri 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 1.57±0.14 katı; 10 mM akrilamid ile birlikte 10 µM öjenol uygulanan hücrelerde kontrolün 1.22±0.25 katı, 50 µM öjenol uygulanan hücrelerde kontrolün 1.11±0.12 katı olarak bulundu. 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde protein karbonil düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$). 50 µM öjenol, 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde protein karbonil düzeylerini anlamlı olarak azalttı ($p<0.05$).



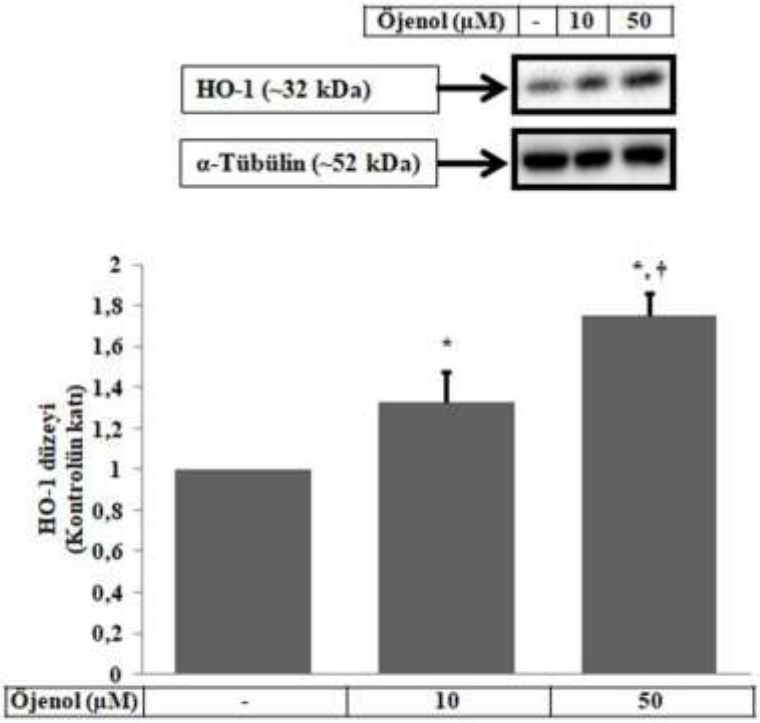
Sonuçlar 3 bağımsız deneysel tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
†: 10 mM AA ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

AA: Akrilamid.

Şekil 5. Öjenolün akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde protein karbonil düzeylerine etkisi

Öjenolün HepG2 hücrelerinde, HO-1 düzeylerine etkisi Şekil 6'da verilmiştir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası HO-1 düzeyleri; 10 µM öjenol uygulanan hücrelerde kontrolün 1.33±0.15 katı, 50 µM akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 1.75±0.11 katı olarak bulundu. 10 µM ve 50 µM öjenol uygulaması HepG2 hücrelerinde HO-

1 düzeylerini anlamlı olarak arttırdı (her ikisi için $p<0.05$). 50 µM öjenol uygulanan HepG2 hücrelerinde HO-1 düzeyleri, 10 µM öjenol uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$).

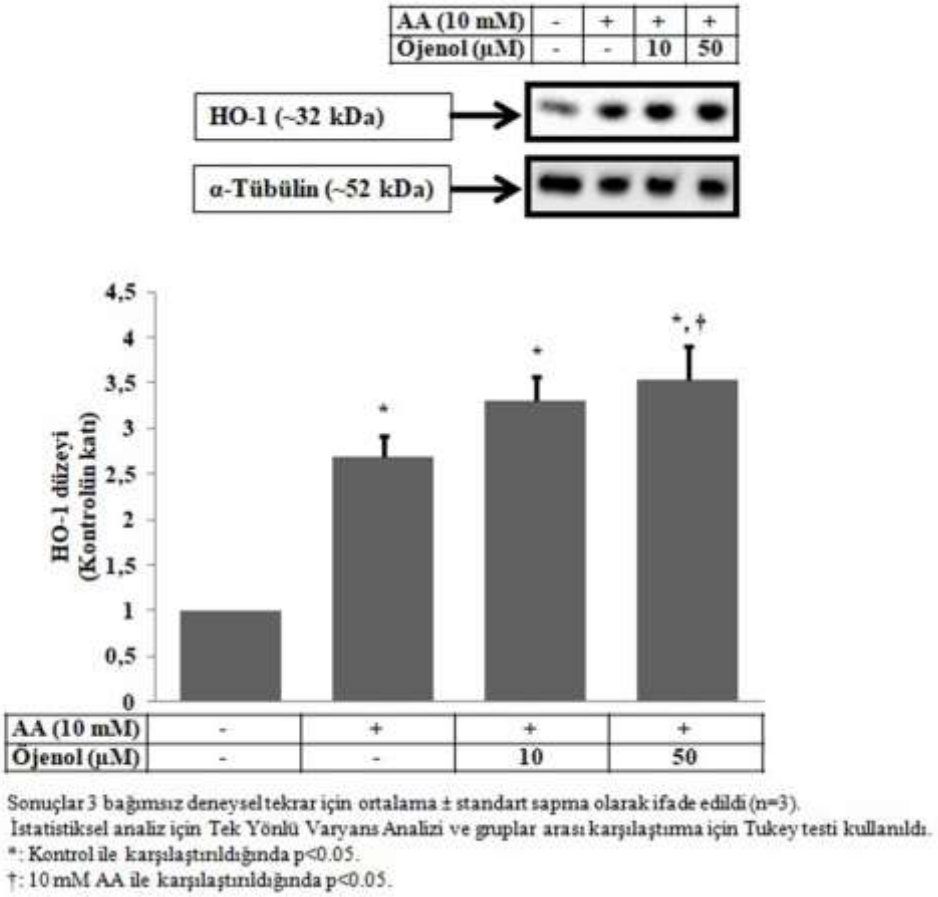


Sonuçlar 3 bağımsız deneysel tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
†: 10 µM öjenol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

HO-1: Hem oksijenaz 1

Şekil 6. Öjenolün HepG2 hücrelerinde hem oksijenaz 1 düzeylerine etkisi

Öjenolün HepG2 hücrelerine 10 mM akrilamid ile birlikte uygulandığında HO-1 düzeylerine etkisi Şekil 7'de verilmiştir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası kontrole göre HO-1 düzeyleri 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 2.68±0.23 katı; 10 mM akrilamid ile birlikte 10 µM öjenol uygulanan hücrelerde kontrolün 3.30±0.27 katı, 50 µM öjenol uygulanan hücrelerde kontrolün 3.53±0.36 katı olarak bulundu. 10 mM akrilamid uygulanan tüm hücrelerde HO-1 düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak yüksekti (tümü için $p<0.05$). 50 µM öjenol, 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde HO-1 düzeylerini anlamlı olarak arttırdı ($p<0.05$).

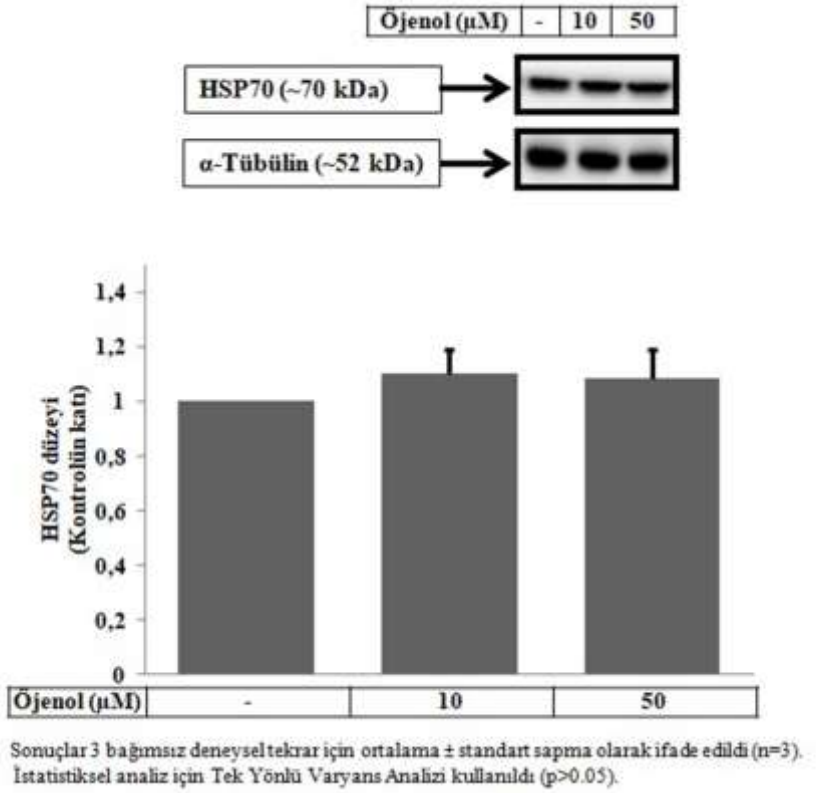


Sonuçlar 3 bağımsız deneysel tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
†: 10 mM AA ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

AA: Akrilamid; **HO-1:** Hem oksijenaz 1.

Şekil 7. Öjenolün akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde hem oksijenaz 1 düzeylerine etkisi

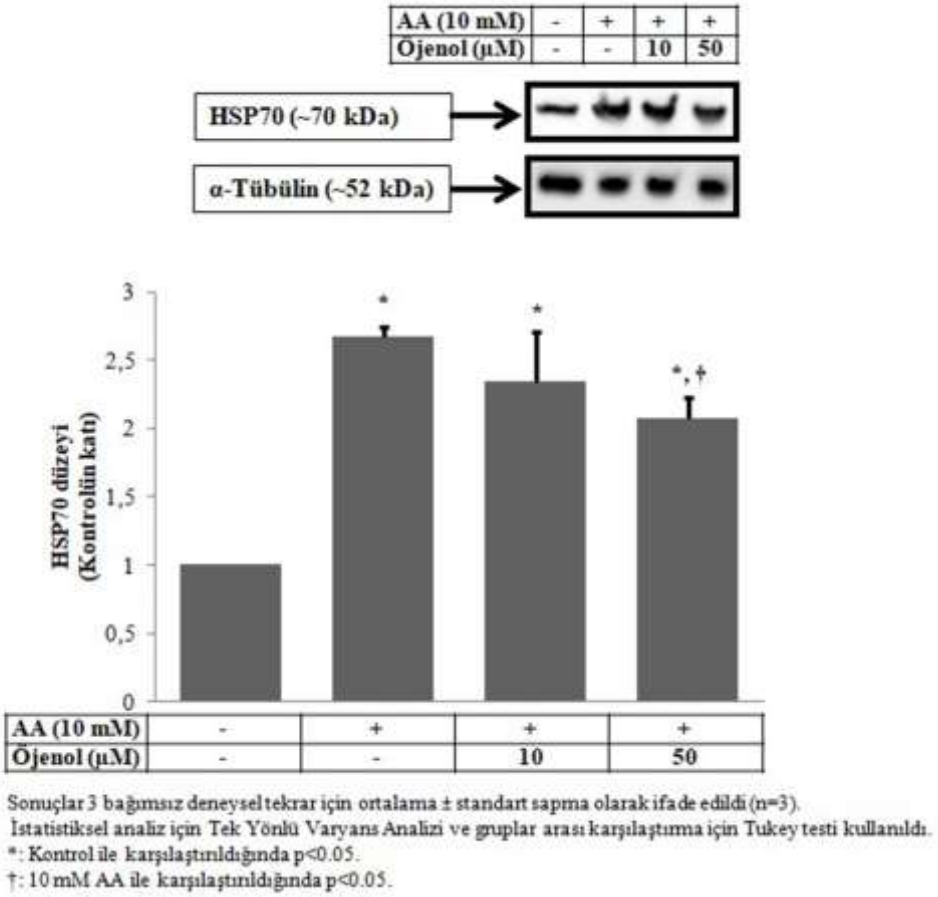
Öjenolün HepG2 hücrelerinde, HSP70 düzeylerine etkisi Şekil 8'de verilmiştir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası HSP70 düzeyleri; 10 µM öjenol uygulanan hücrelerde kontrolün 1.10±0.09 katı, 50 µM akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 1.08±0.11 katı olarak bulundu. 10 µM ve 50 µM öjenol uygulaması HepG2 hücrelerinde HSP70 düzeylerini anlamlı olarak değiştirmedi (her ikisi için $p>0.05$).



HSP70: Isı şok proteini 70.

Şekil 8. Öjenolün HepG2 hücrelerinde ısı şok proteini 70 düzeylerine etkisi

Öjenolün HepG2 hücrelerine 10 mM akrilamid ile birlikte uygulandığında HSP70 düzeylerine etkisi Şekil 10'da verilmiştir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası kontrole göre HSP70 düzeyleri 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 2.67±0.07 katı; 10 mM akrilamid ile birlikte 10 µM öjenol uygulanan hücrelerde kontrolün 2.35±0.36 katı, 50 µM öjenol uygulanan hücrelerde kontrolün 2.07±0.16 katı olarak bulundu. 10 mM akrilamid uygulanan tüm hücrelerde HSP70 düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak yüksekti (tümü için $p<0.05$). 50 µM öjenol, 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde HSP70 düzeylerini anlamlı olarak azalttı ($p<0.05$).



Sonuçlar 3 bağımsız deneysel 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 AA ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

AA: Akrilamid; **HSP70:** Isı şok proteini 70.

Şekil 9. Öjenolün Akrilamid Uygulanan HepG2 hücrelerinde ısı şok proteini 70 düzeylerine etkisi

Çalışmamızdaki hücre canlılığı, protein karbonil, HO-1 ve HSP70 düzeyleri ölçümlerine ait sonuçlar Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1. Çalışmaya ait tüm sonuçlar

HÜCRE CANLILIĞI (% Kontrol)	**Öjenolün hücre canlılığına etkisi**							
		Kontrol	10 µM öjenol	25 µM öjenol	50 µM öjenol	100 µM öjenol	250 µM öjenol	500 µM öjenol	1000 µM öjenol
	1. tekrar	100	95	100	97	94	87	79	56
	2. tekrar	100	104	110	97	94	92	78	70
	3. tekrar	100	92	90	91	82	79	76	66
	Öjenolün akrilamid ile birlikte uygulandığında hücre canlılığına etkisi							
		Kontrol	10 mM AA	10 mM AA+ 10 µM öjenol	10 mM AA+ 25 µM öjenol	10 mM AA+ 50 µM öjenol	10 mM AA+ 100 µM öjenol	10 mM AA+ 250 µM öjenol	10 mM AA+ 500 µM öjenol
	1. tekrar	100	40	54	50	55	49	41	32
	2. tekrar	100	40	63	67	62	53	47	36
	3. tekrar	100	45	57	58	57	53	51	39

PROTEİN KARBONİL (Kontrolün katı)	**Öjenolün protein karbonil düzeyine etkisi**				**Öjenolün akrilamid ile birlikte uygulandığında protein karbonil düzeyine etkisi**			
		Kontrol	10 µM öjenol	50 µM öjenol		Kontrol	10 mM AA	10 mM AA+ 10 µM öjenol	10 mM AA+ 50 µM öjenol
	1. tekrar	1,00	0,89	0,91	1. tekrar	1,00	1,59	1,48	1,14
	2. tekrar	1,00	0,89	1,08	2. tekrar	1,00	1,42	1,18	1,20
	3. tekrar	1,00	1,03	1,16	3. tekrar	1,00	1,71	1,00	0,98

HO-1 (Kontrolün katı)	**Öjenolün HO-1 düzeyine etkisi**				**Öjenolün akrilamid ile birlikte uygulandığında HO-1 düzeyine etkisi**			
		Kontrol	10 µM öjenol	50 µM öjenol		Kontrol	10 mM AA	10 mM AA+ 10 µM öjenol	10 mM AA+ 50 µM öjenol
	1. tekrar	1,00	1,30	1,82	1. tekrar	1,00	2,93	3,54	3,23
	2. tekrar	1,00	1,49	1,80	2. tekrar	1,00	2,62	3,36	3,43
	3. tekrar	1,00	1,20	1,63	3. tekrar	1,00	2,49	3,02	3,94

HSP70 (Kontrolün katı)	**Öjenolün HSP70 düzeyine etkisi**				**Öjenolün akrilamid ile birlikte uygulandığında HSP70 düzeyine etkisi**			
		Kontrol	10 µM öjenol	50 µM öjenol		Kontrol	10 mM AA	10 mM AA+ 10 µM öjenol	10 mM AA+ 50 µM öjenol
	1. tekrar	1,00	1,07	1,03	1. tekrar	1,00	2,60	2,58	1,98
	2. tekrar	1,00	1,20	1,01	2. tekrar	1,00	2,70	1,93	2,25
	3. tekrar	1,00	1,03	1,21	3. tekrar	1,00	2,72	2,53	1,99

AA: Akrilamid; **HO-1:** Hem oksijenaz-1; **HSP70:** Isı şok protein 70.

TARTIŞMA

Akrilamid çeşitli endüstrilerde ve laboratuvarlarda kullanılan ve gıda maddelerinin yüksek sıcaklığa maruz kalması ile de oluşabilen kanserojen, sitotoksik ve genotoksik bileşiktir (1). Gıda ile vücuda alınan akrilamid, glutatyon ile konjuge edilerek CYP enzimi ile karaciğerde metabolize edilmektedir. Buna bağlı olarak akrilamid metabolizması hücresel glutatyon depolarının tükenmesine ve dolayısıyla hücrenin redoks durumunun değişmesine yol açabilmektedir (3).

Artan oksidatif stres, doymamış yağlar, karbonhidratlar, nükleik asitler ve proteinler olmak üzere hücrelerin çeşitli makromoleküllerini oksitleyebilir, modifiye edebilir, işlevini değiştirebilir (31,67). Protein karbonilasyonu geri dönüşü olmayan bir oksidatif hasardır ve genellikle protein fonksiyon kaybına yol açar bu da şiddetli oksidatif hasarın ve hastalıktan kaynaklanan protein disfonksiyonunun göstergesidir (42,68). HO-1 oksidatif stresi azaltmada anahtar rol oynayan antioksidan, mikrozomal bir enzimdir ve hücreyi oksidatif hasara karşı korur (45). HSP70 protein hemostazında görevli moleküler şaperonlardan biridir ve hücresel stresler HSP70 düzeyini arttırır (69).

Öjenol karanfil yağında bulunan antioksidan, anti-inflamatuvar, analjezik, antifungal, antibakteriyel aktiviteler gösteren fenolik türev bileşiktir (70). Öjenolün hepatik steatoz, diyabet ve kardiovasküler hastalıklar gibi birçok metabolik bozuklukta olumlu etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur (71) ancak akrilamide bağlı karaciğer hasarında öjenolün etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmada akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde öjenolün hücre canlılığına, oksidatif strese ve ısı şok protein yanıtına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda HepG2 hücreleri 24 saat süreyle farklı öjenol konsantrasyonları ile inkübe edildiğinde, öjenolün 500 µM konsantrasyona kadar hücre canlılığı üzerinde bir değişiklik oluşturmadığını, 500 ve 1000 µM konsantrasyonda ise hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığını bulduk. Bulgularımız literatür ile uyumlu olup, Slameňová ve ark. (55) HepG2 hücrelerinde öjenolün 500 µM konsantrasyona kadar hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik göstermediğini, 1000 µM konsantrasyondan itibaren hücre canlılığında azalmaya neden olduğunu; Wiirziler ve ark. (72) ise 1000 µM konsantrasyonda öjenolün HepG2 hücrelerinin hücre canlılığında azalma oluşturduğunu bildirmektedirler.

Literatürde 10 mM akrilamidin HepG2 hücrelerinde sitotoksiteye yol açtığı bildirilmektedir (13). Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde hücre canlılığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Bununla birlikte öjenolün akrilamid ile oluşturulan sitotoksite üzerine etkisi bilinmemekte olup çalışmamızda HepG2 hücrelerine 10 mM akrilamidle birlikte uygulanan 10, 25 ve 50 µM öjenol, hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdı. Bu bulgumuz, öjenolün, özellikle 10-50 µM konsantrasyon aralığında, HepG2 hücrelerinde sitotoksiteyi önlemede etkili olduğunu göstermektedir. Bu bulgularımızdan yola çıkarak, çalışmamızda öjenolün akrilamid ile oluşturulan sitotoksite üzerine etkili olan 10 µM ve 50 µM'ı seçerek, bu konsantrasyonların hem tek başlarına hem de 10 mM akrilamid ile birlikte uygulandıklarında HepG2 hücrelerinde oksidatif strese ve ısı şok protein yanıtına etkisini inceledik.

Çalışmamızda 10 mM akrilamid protein karbonil, HO-1 ve HSP70 düzeylerini anlamlı olarak arttırdı. Akrilamidin 10 mM konsantrasyonda HepG2 hücrelerinde oksidatif stresi ve HSP70 düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir (13,28). Akrilamidin HO-1 düzeyine etkisi bilinmemekle birlikte, Ekuban ve ark. (73), akrilamid uygulanan farelerde HO-1 mRNA ekspresyonunun arttığını ve bunun NRF2 üzerinden olduğunu bildirmişlerdir. Bulgularımız literatürü destekler nitelikte olup, akrilamide bağlı olarak HepG2 hücrelerinde oksidatif stresin ve oksidatif stres ile indüklenebilen HO-1 ve HSP70 düzeylerinin arttığını göstermektedir.

Öjenol, HepG2 hücrelerine tek başına uygulandığında protein karbonil ve HSP70 düzeylerini anlamlı olarak değiştirmezken, hem 10 µM hem de 50 µM konsantrasyonda HO-1 düzeylerini anlamlı olarak arttırdı. Akrilamid ile birlikte uygulanan 10 µM öjenol bu parametrelerde anlamlı bir değişmeye yol açmazken, 50 µM öjenol ise protein karbonil ve HSP70 düzeylerini anlamlı olarak azaltıp HO-1 düzeylerini ise anlamlı olarak arttırdı. Öjenolün antioksidan etkileri bilinmektedir (53). Aynı zamanda literatürde, öjenolün tek

başına uygulandığında protein karbonil düzeylerini değiştirmediğini ancak tiyoasetamid ve kadmiyum gibi toksik moleküllerle karaciğerde artan protein karbonil düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (74,75). Bu çalışmalar, çalışmamızdaki HO-1 bulgularımızı desteklemektedir.

Hem oksijenaz-1, HSP32 olarak da bilinmektedir. HSP70 ile benzer şekilde ısı şoku, serbest radikaller, ağır metal tuzları gibi birçok hücresel stres ajanıyla indüklenmektedir. Ek olarak HO-1 indükleyicileri arasında fitokimyasallar; fitokimyasallar arasında ise fenolik bileşikler de yer almaktadır (76). Öjenol de fenolik bir bileşiktir ancak öjenolün HO-1 düzeyi üzerindeki etkilerini gösteren bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda öjenol hem tek başına hem de akrilamidle birlikte uygulandığında HO-1 düzeyini arttırmıştır. HO-1 indüksiyonunun hücrede oksidatif strese karşı bir savunma veya adaptasyon cevabı olduğunu bildirilmektedir (77). HO-1'in oksidatif strese karşı hücreyi koruduğu göz önünde bulundurulduğunda HepG2 hücrelerinde öjenol HO-1 düzeyini arttırarak antioksidan ve hepatoprotektif etki gösterebilir. Bunun yanında HO-1 enziminin gereğinden fazla indüklenmesi, substratı olan hem molekülünün yüksek miktarda yıkımıyla serbest demir düzeyi artışına neden olabilir. Serbest demirin son derece reaktif bir element olması nedeniyle oksidatif reaksiyonları tetikleyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır (78). Literatürde öjenolün karaciğerde HSP70 düzeylerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamakla birlikte bizim bulgularımız ile uyumlu olarak Prasad ve ark. (79) SHSY5Y nöroblastoma hücre hattında öjenolün hiperglisemi ile azalan glutatyon düzeyini arttırdığını ve artan HSP70 ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda öjenolün hücrelerdeki akrilamide bağlı oksidatif stres artışını azaltması, HSP70'in indüklenmesini azaltmış olabilir.

Sonuç olarak çalışmamız, akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde öjenolün, özellikle 50 μM konsantrasyonda, hücre canlılığını arttırırken, oksidatif stresi ve ısı şok protein yanıtını azalttığını gösterdi. Bu çalışma ile öjenolün akrilamid toksisitesi üzerine etkisi ilk kez araştırılmış olup bulgularımız, öjenolün akrilamid ile oluşan hepatotoksisitede sitotoksisiteyi, oksidatif stresi ve ısı şok protein yanıtını azaltması sebebiyle faydalı olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte öjenolün sitotoksisiteyi, oksidatif stresi ve ısı şok protein yanıtını hangi mekanizmalarla iyileştirdiği gelecekteki çalışmalar ile aydınlatılmalıdır.

SONUÇLAR

Bu çalışmanın amacı akrilamid uygulanan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde öjenolün hücre canlılığına, oksidatif strese ve ısı şok protein yanıtına etkisini araştırmaktır. Hücre canlılığı ölçümleri MTT testi ile; protein karbonil, HO-1 ve HSP70 protein düzeyleri western blotting yöntemi ile ölçüldü. Çalışmamıza ait sonuçlar şunlardır:

1. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10, 25, 50, 100 ve 250 µM öjenol hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak değiştirmedi.
2. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 500 µM öjenol hücre canlılığını kontrole, 10 µM ve 25 µM öjenol uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
3. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 1000 µM öjenol hücre canlılığını kontrole, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM ve 250 µM öjenol uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
4. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10 mM akrilamid hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak azalttı.
5. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle 10 mM akrilamidle birlikte 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM ve 500 µM öjenol uygulaması hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak azalttı.
6. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle, 10 mM akrilamidle birlikte uygulanan 10 µM, 25 µM ve 50 µM öjenol; 10 mM akrilamid uygulanan hücrelere göre hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdı.

7. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle, 10 mM akrilamidle birlikte uygulanan 100 µM, 250 µM öjenol ve 500 µM öjenol; 10 mM akrilamid uygulanan hücrelere göre hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmedi.
8. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle, 10 mM akrilamidle birlikte uygulanan 500 µM öjenol; 10 mM akrilamid ile birlikte 10 µM, 25 µM, 50 µM ve 100 µM öjenol uygulanan hücrelere göre hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı.
9. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10 µM ve 50 µM öjenol, protein karbonil düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak değiştirmedi.
10. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10 mM akrilamid protein karbonil düzeyini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
11. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle, 10 mM akrilamidle birlikte uygulanan 10 µM ve 50 µM öjenol, protein karbonil düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak değiştirmedi.
12. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle, 10 mM akrilamidle birlikte uygulanan 10 µM öjenol, protein karbonil düzeyini 10 mM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak değiştirmedi.
13. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle, 10 mM akrilamidle birlikte uygulanan 50 µM öjenol, protein karbonil düzeyini 10 mM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
14. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10 µM ve 50 µM öjenol, HO-1 düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
15. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 50 µM öjenol, HO-1 düzeylerini 10 µM öjenol uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak arttırdı.
16. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10 mM akrilamid HO-1 düzeyini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
17. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle, 10 mM akrilamidle birlikte uygulanan 10 µM ve 50 µM öjenol, HO-1 düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
18. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle, 10 mM akrilamidle birlikte uygulanan 10 µM öjenol, HO-1 düzeyini 10 mM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak değiştirmedi.
19. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle, 10 mM akrilamidle birlikte uygulanan 50 µM öjenol, HO-1 düzeyini 10 mM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak arttırdı.

20. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10 µM ve 50 µM öjenol, HSP70 düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak değiştirmedi.
21. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10 mM akrilamid HSP70 düzeyini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
22. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle, 10 mM akrilamidle birlikte uygulanan 10 µM ve 50 µM öjenol, HSP70 düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.
23. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle, 10 mM akrilamidle birlikte uygulanan 10 µM öjenol, HSP70 düzeyini 10 mM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak değiştirmedi.
24. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle, 10 mM akrilamidle birlikte uygulanan 50 µM öjenol, HSP70 düzeyini 10 mM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.

Sonuç olarak çalışmamız, akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde öjenolün, özellikle 50 µM konsantrasyonda, hücre canlılığını arttırırken, oksidatif stresi ve ısı şok protein yanıtını azalttığını gösterdi.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde öjenolün hücre canlılığına, oksidatif strese ve ısı şok protein yanıtına etkisini araştırmaktır.

HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle tek başına ve 10 mM akrilamid ile birlikte öjenol uygulandı. Hücre canlılığı 3-(4,5- dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür testi ile ölçüldü. Protein karbonil, hem oksijenaz 1 ve ısı şok proteini 70 düzeyleri western blot yöntemiyle ölçüldü.

Öjenol, HepG2 hücrelerinde 500 μM ve 1000 μM konsantrasyonlarda hücre canlılığını anlamlı olarak azalttırken daha düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmedi. 10 μM, 25 μM ve 50 μM öjenol HepG2 hücrelerinde 10 mM akrilamide bağlı sitotoksiteyi anlamlı olarak azalttı. Bundan sonraki deneylerde akrilamide bağlı sitotoksisite üzerine etkili olduğu gösterilen 10 μM ve 50 μM öjenol konsantrasyonları kullanıldı. 10 μM ve 50 μM öjenol, HepG2 hücrelerinde protein karbonil ve ısı şok proteini 70 düzeylerini anlamlı olarak değiştirmezken hem oksijenaz 1 düzeylerini anlamlı olarak arttırdı. 10 mM akrilamid protein karbonil, hem oksijenaz 1 ve ısı şok proteini 70 düzeylerini anlamlı olarak arttırdı. 50 μM öjenol, 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde, protein karbonil ve ısı şok proteini 70 düzeylerinde anlamlı bir azalmaya ve hem oksijenaz 1 düzeylerinde ise anlamlı bir artışa yol açtı. 10 μM öjenolün ise 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde protein karbonil, hem oksijenaz 1 ve ısı şok proteini 70 düzeyleri üzerine anlamlı bir etkisi yoktu.

Sonuç olarak çalışmamız, akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde öjenolün, özellikle 50 μM konsantrasyonda, hücre canlılığını arttırırken, oksidatif stresi ve ısı şok protein yanıtını azalttığını gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, öjenol, HepG2, protein karbonil, oksidatif stres, ısı şok proteini 7

EFFECT OF EUGENOL ON CELL VIABILITY, OXIDATIVE STRESS AND HEAT SHOCK PROTEIN RESPONSE IN ACRYLAMIDE-TREATED HEPG2 CELLS

SUMMARY

The aim of this study is to investigate the effect of eugenol on cell viability, oxidative stress and heat shock protein response in acrylamide-treated HepG2 cells.

HepG2 cells were treated with eugenol alone and in combination with 10 mM acrylamide for 24 hours. Cell viability was measured by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide test. Protein carbonyl, heme oxygenase 1 and heat shock protein 70 levels were measured by western blot method.

Eugenol significantly reduced cell viability in HepG2 cells at 500 μM and 1000 μM concentrations, but did not significantly alter cell viability at lower concentrations. 10 μM, 25 μM and 50 μM eugenol significantly reduced 10 mM acrylamide-induced cytotoxicity in HepG2 cells. In subsequent experiments, eugenol concentrations of 10 μM and 50 μM were used, which were shown to be effective on acrylamide-induced cytotoxicity. 10 μM and 50 μM eugenol did not significantly change protein carbonyl and heat shock protein 70 levels, but both increased oxygenase 1 levels significantly in HepG2 cells. 10 mM acrylamide significantly increased protein carbonyl, heme oxygenase 1 and heat shock protein 70 levels. 50 μM eugenol caused a significant decrease in protein carbonyl and heat shock protein 70 levels and a significant increase in heme oxygenase 1 levels in 10 mM acrylamide-treated

cells. On the other hand, 10 μM eugenol had no significant effect on protein carbonyl, heme oxygenase 1 and heat shock protein 70 levels in 10 mM acrylamide-treated cells.

In conclusion, our study showed that eugenol, especially at 50 μM concentration, increased cell viability while reducing oxidative stress and heat shock protein response in acrylamide-treated HepG2 cells.

Keywords: Acrylamide, eugenol, HepG2, protein carbonyl, oxidative stress, heat shock protein 70.

KAYNAKLAR

1. Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. J Agric Food Chem. 2003.30;51(16):4504-26.

2. Mojska H, Gielecińska I. Studies of acrylamide level in coffee and coffee substitutes: influence of raw material and manufacturing conditions. Rocz Panstw Zakl Hig 2013;64(3):173-81.

3. Semla M, Goc Z, Martiniaková M, Omelka R. Formicki G. Acrylamide: a common food toxin related to physiological fu nctions and health. Physiol Res 2017;4:66(2):205-17.

4. Jiang L, Cao J, An Y, Geng C, Qu S, Jiang L. Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. Toxicol In Vitro 2007;21(8):1486-92.

5. Sinha N, Dabla PK. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review. Curr Hypertens Rev2015;11(2):132-42.

6. Hawkins CL, Davies MJ. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. J Biol Chem 2019;20:294(51):19683–708.

7. Du J, Ren W, Zhang Q, Fu N, Han F, Cui Po , Li W. Heme Oxygenase-1 Suppresses Wnt Signaling Pathway in Nonalcoholic Steatohepatitis-Related Liver Fibrosis. Biomed Res Int. 2020;2020:4910601.

8. Fernandez-Fernandez MR, Valpuesta JM.. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. F1000Res.2018. 19;7:F1000 Faculty Rev-1497.

9. Fernandes MJG, Pereira RB, Pereira DM Fortes AG,Castanheira EMS , Gonçalves MST. New Eugenol Derivatives with Enhanced Insecticidal Activity. Int J Mol Sci 2020;4:21(23):9257.

10. Binu P PhD, Priya N MPHIL, Abhilash S PhD, Nair H PhD. Protective Effects of Eugenol against Hepatotoxicity Induced by Arsenic Trioxide: An Antileukemic Drug. Iran J Med Sci. 2018;43(3):305–12.

11. Sundermann VM, Knasmüller S, Wu XJ, Darroudi F, Kassie F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. Toxicology 2004;20:198(1-3):329-40.

12. Bo N, Yilin H, Chaoyue Y, Lu L, Yuan Y. Acrylamide induces NLRP3 inflammasome activation via oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-mediated MAPK pathway in HepG2 cells. Food Chem Toxicol. 2020;145:111679.

13. Al-Hajm Abdullah Yahya Salih , Ozgun Eray. Effects of acrylamide on protein degradation pathways in human liver-derived cells and the efficacy of *N*-acetylcysteine and curcumin. Drug Chem Toxicol. 2020;16:1-8.

14. Zhang X, Jiang L, Geng C, Yoshimura H, Zhong L. Inhibition of acrylamide genotoxicity in human liver-derived HepG2 cells by the antioxidant hydroxytyrosol. Chem Biol Interact. 2008;176(2-3):173-8.

15. Kahkeshani N, Saeidnia S, Abdollahi M . Role of antioxidants and phytochemicals on acrylamide mitigation from food and reducing its toxicity. J Food Sci Technol 2015;52(6):3169-86.

16. 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.

17. Bongers ML , Hogervorst JG, Schouten LJ, Goldbohm RA, Schouten HC. Dietary acrylamide intake and the risk of lymphatic malignancies: the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. PLoS One 2012;7(6):e38016.

18. Ubaoji KI, Valentine Ugochukwu Orji. A Review on acrylamide in foods: sources implications to health. Mgbakoigba, J African Studies 2016;6(1):1-17.

19. Çelik F. Akrilamidin hek293 hücre hattında genotoksik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması. Chemistry Publıshed 2015.

20. Kopanska M, Muchacka R , Czech J, Batoryna M, Formicki G. Acrylamide toxicity and cholinergic nervous system. J Physiol Pharmacol 2018;69(6): doi: 10.26402/jpp.2018.6.03

21. Katen AL, Roman SD. The genetic consequences of paternal acrylamide exposure and potential for amelioration. Mutat Res. 2015;777:91-100.

22. Rifai L , Saleh FA. A Review on Acrylamide in Food: Occurrence, Toxicity, and Mitigation Strategies. Int J Toxicol 2020;39(2):93-102.

23. Al-Qahtani FA , Arafah M, Sharma B, Siddiqi NJ. Effects of alpha lipoic acid on acrylamide-induced hepatotoxicity in rats.Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2017;63(6):1-6.

24. Chen D, Liu H, Wang E, Yan H, Ye H, Yuan Y. Toxicogenomic evaluation of liver responses induced by acrylamide and glycidamide in male mouse liver. Gen Physiol Biophys. 2018;37(2):175-84.

25. Rawi SM, Marie S, Fahmy SR, El-Abied SA. Hazardous effects of acrylamide on immature male and female rats. Afr J Pharm Pharmacol 2012;6(18):1367-86.

26. Mohammadi AB, Noshad H, Ostadi A, Ghaffari AR, Nahandi MZ, Mohammadi AB. Successful Treatment of Acute Lethal Dose of Acrylamide Poisoning. Iranian Journal of Toxicology 2015;9(28):1284-6.

27. Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science. 1980;209(4455):497-9.

28. Zhanpeng Wang , Zhuonan Li , Yanshuo Ye, Lijuan Xie , Wei Li. Oxidative Stress and Liver Cancer: Etiology and Therapeutic Targets. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:7891574.

29. Wang Z, Li Z, Ye Y, Xie L, Li W. Oxidative Stress and Liver Cancer: Etiology and Therapeutic Targets. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:7891574.

30. Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. Ann Hepatol. 2004;3(3):86-92.

31. Bhatti JS , Bhatti GK , Reddy HP. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders- A step towards mitochondria based therapeutic strategies. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 2017;1863(5):1066-77.

32. Sadi G, Sadi Ö. Diyabetik Sıçan Karaciğer Dokularında Oksidatif Hasar Parametrelerinin ve Antioksidan Enzimlerin Değişimleri. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi 2011;4(3):14-19.

33. Rodríguez-García A, García-Vicente R, Morales ML, Ortiz-Ruiz A, Martínez-López J, Linares M. Protein Carbonylation and Lipid Peroxidation in Hematological Malignancies. Antioxidants 2020;1;9(12):1212.

34. Donne ID, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. J Cell Mol Med 2006;10(2):389-406.

35. Malaguarnera L, Madeddu R, Palio E, Arena Nicalo, Malaguarnera M. Heme oxygenase-1 levels and oxidative stress-related parameters in non-alcoholic fatty liver disease patients. J Hepatol 2005;42(4):585-91.

36. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1997;37:517-54.

37. Zou C, Zhang H, Li Q, Xiao H, Yu L, Ke S et al. Heme oxygenase-1: a molecular brake on hepatocellular carcinoma cell migration. Carcinogenesis 2011;32(12):1840-8.

38. Kim J, Cha YN, Surh YJ. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. Mutat Res. 2010;690(1-2):12-23.

39. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2007;47:89-116.

40. Raffaele M, Carota G, Sferrazzo G, Licari M, Barbagallo I, Sorrenti V. Inhibition of Heme Oxygenase Antioxidant Activity Exacerbates Hepatic Steatosis and Fibrosis In Vitro. Antioxidants. 2019;5;8(8):277.

41. Zuckerbraun BS, Billiar TR, Otterbein SL, Kim PK, Liu F, Choi AM, et al. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1. J Exp Med 2003;198(11):1707-16.

42. Li S, Fujino M, Takahara T, Li XK. Protective role of heme oxygenase-1 in fatty liver ischemia-reperfusion injury. Med Mol Morphol 2019;52(2):61-72.

43. Fondevila C, Shen XD , Tsuchiyashi S, Yamashita K,, Csizmadia E, Lassman C, Busuttil RW. Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. Hepatology 2004;40(6):1333-41.

44. Archer AE, Von Schulze AT, Geiger PC. Exercise, heat shock proteins and insulin resistance. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2018;19:373(1738).

45. Lollo PCB, Moura CS, Morato PN, Amaya-Farfan J. Differential response of heat shock proteins to uphill and downhill exercise in heart, skeletal muscle, lung and kidney tissues. J Sports Sci Med 2013;1;12(3):461-6.

46. Yu J, Li Y, Wang T, Zhong X. Modification of N6-methyladenosine RNA methylation on heat shock protein expression. PLoS One 2018;14;13(6):e0198604

47. Jee H. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. J Exerc Rehabil 2016;31:12(4):255-9.

48. Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. J Leukoc Biol 2007;81(1):15-2.

49. Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. J Vasc Surg 1999;29(4):748-51.

50. Karaca Ö, Pekmez H, Kuş H, Akpolat N, Ögetürk M, Kuş İ. Deneysel karbon tetraklorür toksisitesi sonucu karaciğerdeki IŞP70 immunoreaksiyon artışı üzerine melatonin hormonunun etkisi. F. Ü.Sağ. Bil Tıp Derg 2011:25(2):73–6.

51. Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? Cell Stress Chaperones 2016. 21(3):379-404

52. Melles D, Vielhaber Torster, Baumann A, Zazzeroni R. In chemico evaluation of skin metabolism: Investigation of eugenol and isoeugenol by electrochemistry coupled to liquid chromatography and mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2013;913-914:106-12.

53. Nejad MS, Özgüneş H, Başaran N. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. Turk J Pharm Sci 2017;14(2):201-206.

54. Fujisawa S, Murakami Y. Eugenol and Its Role in Chronic Diseases. Adv Exp Med Biol 2016;929:45-66.

55. Slameňová D, Horváthová E, Wsólová L, Sramkova M, Navarova J. Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. Mutat Res. 2009;677(1-2):46-52.

56. Jo HK, Kim GW, Jeong KJ, Kim DY, Chung SH. Eugenol ameliorates hepatic steatosis and fibrosis by down-regulating SREBP1 gene expression via AMPK-mTOR-p70S6K signaling pathway. Biol Pharm Bull 2014;37(8):1341-51

57. Ogata M, Hoshi M, Urano S, Endo T. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. Chem Pharm Bull 2000;48(10):1467-9.

58. Abd El Motteleb DM, Selim SA, Mohamed AM. Differential effects of eugenol against hepatic inflammation and overall damage induced by ischemia/re-perfusion injury. J Immunotoxicol. 2014;11(3):238-45.

59. Barboza JN, Filho CDSMB, Medeiros JVR and Sousa DP. An Overview on the Anti-inflammatory Potential and Antioxidant Profile of Eugenol. Oxid Med Cell Longev. 2018; 3957262. Published online, 2018.

60. 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.

61. 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)pii:1191.

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

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

64. Sennepin Alexis D, Charpentier Stephane, Normand Thierry, Sarre Cedric, Legrand Alain. Multiple reprobing of Western blots after inactivation of peroxidase activity by its substrate, hydrogen peroxide. Anal Biochem 2009 Oct 1;393(1):129-31.

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

66. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 1994;233:346-57

67. Paradies G, Paradies V, Francesca R , Giuseppe P, Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2014;20(39):14205-18.

68. Butterfield DA , Dalle-Donne I. Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and disease. Mass Spectrom Rev. 2014;33(1):1-6.

69. Evans CG, Chang L, Gestwicki JE . Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. J Med Chem 2010;53(12):4585-4602.

70. Harb AA, Bustanji YK, Almasri IM, Abdalla SS. Eugenol Reduces LDL Cholesterol and Hepatic Steatosis in Hypercholesterolemic Rats by Modulating TRPV1 Receptor. Sci Rep 2019;30;9(1):14003.

71. Fujisawa S, Murakami Y. Eugenol and Its Role in Chronic Diseases. Adv Exp Med Biol. 2016;929:45-66.

72. Wiirzler LAM, de Aguiar RA, Martinez CA, Cuman RK.. Anticancer activity of eugenol is not related to regulation of the oncogenic transcription factor Forkhead Box M1. Health Sciences 2016;38(2):159-63.

73. Ekuban F. A., Zong, C., Takikawa, M., Morikawa, K., Sakurai, T., Ichihara, S.& Ichihara, G. Genetic ablation of Nrf2 exacerbates neurotoxic effects of acrylamide in mice. Toxicology 2021;456:152785

74. Kumar A, Siddiqi NJ., Alrashood, ST., Khan, H A., Dubey A., & Sharma, B. Protective effect of eugenol on hepatic inflammation and oxidative stress induced by cadmium in male rats. Biomedicine & Pharmacotherap 2021;139:111588.

75. Yogalakshmi B, Viswanathan P, Anuradha CV. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. Toxicology. 2010;268(3):204-12.

76. Fernandez ML, Devesa I. Inducers of heme oxygenase-1. Curr Pharm Des 2008;14(5):473-86.

77. Yao P, Li K , Song F, Zhou S, Sun XF, Zhang X ve ark. Heme oxygenase-1 upregulated by Ginkgo biloba extract: Potential protection against ethanol-induced oxidative liver damage. Food Chem Toxicol 2007;45(8):1333-42.

78. Bresgen N, Ecki. M.P. Oxidative stress and the homeodynamics of iron metabolism. Biomolecules 2015;5:808-47.

79. Prasad SN, Bharath MM, Muralidhara. Neurorestorative effects of eugenol, a spice bioactive: Evidence in cell model and its efficacy as an intervention molecule to abrogate brain oxidative dys functions in the streptozotocin diabetic rat. Neurochem Int 2016;95:24-36.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller **Sayfa no**

Şekil 1. Öjenol molekül yapısı 7
Şekil 2. Öjenolün HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi 16
Şekil 3. Öjenolün akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi 17
Şekil 4. Öjenolün HepG2 hücrelerinde protein karbonil düzeylerine etkisi 18
Şekil 5. Öjenolün akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde protein karbonil düzeylerine etkisi 19
Şekil 6. Öjenolün HepG2 hücrelerinde hem oksijenaz 1 düzeylerine etkisi 20
Şekil 7. Öjenolün akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde hem oksijenaz 1 düzeylerine etkisi 21
Şekil 8. Öjenolün HepG2 hücrelerinde ısı şok proteini 70 düzeylerine etkisi 22
Şekil 9. Öjenolün akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde ısı şok proteini 70 düzeylerine etkisi 23

ÖZGEÇMİŞ

..... tarihinde ..... doğdum. İlk ve ortaöğrenimimi Şehit Asım İlköğretim Okulu'nda tamamladım. Lise öğrenimimi Uzunköprü Hüseyin Çorum Sağlık Meslek Lisesi, Laboratuvar teknisyenliği bölümünde tamamladım. Trakya Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar önlisans programını bitirdim ve ardından Kırklareli Üniversitesi Hemşirelik bölümü ile Lisans eğitimimi tamamladım. 2013 yılından bu yana Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi, Merkez Laboratuvar Biyokimya biriminde Sağlık Teknikeri olarak görev yapmaktayım. 2019 yılından beri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya bölümünde yüksek lisans eğitimi almaktayım.

EKLER

Ek 1

Yerel Etik Kurul Onayı

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

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2020/456	
	PROTOKOL ADI	Akrilamid Uygulanan HepG2 Hücrelerinde Ojenolün Hücre Canlılığına, Oksidatif Strese ve Isı Şok Protein Yanıtına Etkisi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Dr. Öğr. Üyesi Eray ÖZGÜN	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:21/06** **Tarih:21.12.2020**
	Fakültemiz Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Eray ÖZGÜN'ün sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Özge POSTA'nın 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 ödetilmediği 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
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. Nesrin 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 SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan V.