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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN

AKRİLAMİD İLE OLUŞTURULAN HÜCRESEL HEPATOTOKSİSİTEDE D-CARVONE'UN ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Tzansel KARA KECHAGIA

Referans no: 10498497

EDİRNE-2024

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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN

AKRİLAMİD İLE OLUŞTURULAN HÜCRESEL HEPATOTOKSİSİTEDE D-CARVONE'UN ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Tzansel KARA KECHAGIA

Destekleyen Kurum:TÜBAP 2023/42

EDİRNE-2024

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI ..... **İ**
ETİK BEYAN ..... **İİ**
TEŞEKKÜR ..... **İİİ**
SİMGE VE KISALTMALAR ..... **İV**
ÖZET ..... **V**
ABSTRACT ..... **Vİ**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **2**
2.1. Akrilamid **2**
2.2. AML12 Hücre Hattı **3**
2.3. Isı Şok Proteini 70 ..... **3**
2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi **4**
2.5. Apoptoz **5**
2.6. Otofaji **6**
2.7. D-Carvone **6**
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER **8**
3.1. Hücre Kültürü **11**
3.1.1. Hücre Canlılığı Ölçümü **11**
3.2. Western Blot **12**
3.3. İstatistiksel Analiz **13**
4. BULGULAR **14**
5. TARTIŞMA **23**
KAYNAKLAR **25**
ÖZGEÇMİŞ ..... **I**
BENZERLİK RAPORU ..... **II**

ONAY SAYFASI

ETİK BEYAN

"Akrilamid ile oluşturulan hücresel hepatotoksisitede D-Carvone'un etkisi" adlı bana ait olan tez çalışmamın bütün aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, bütün verileri ve bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, verilerde ve sonuçlarda herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezimin yazımında yapay zeka yazılımları kullanmadığımı, diğer kaynaklardan elde ettiğim bilgi ve yorumlara tezimde uygun şekilde kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar bölümünde yer verdiğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici herhangi bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tzansel Kara Kechagia

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi ve tezin hazırlanması süresince bana gösterdikleri her türlü destek ve yardımlarından dolayı danışman hocam Doç. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN başta olmak üzere, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Eray ÖZGÜN'e, Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'a ve Prof. Dr. İlker DIBIRDIK'a teşekkür ederim. Deneylerim sırasında yardımlarından dolayı Arş. Gör. Dr. Tuğçe KARABAŞ'a, Arş. Gör. Dr. Büşra DİLER ZENGİNER'e, ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma ve çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne teşekkür ederim.

SİMGE VE KISALTMALAR

AA: Akrilamid

ATF4: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4

BAX: BCL-2-ilişkili X proteini

BCL-2: B hücreli lenfoma 2

HSP70: Isı şok proteini 70

LC3B: Mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3B

ÖZET

"Akrilamid ile oluşturulan hücresel hepatotoksisitede D-Carvone'un etkisi", Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, 2024.

Giriş ve Amaç: Bu çalışmanın amacı, akrilamid uygulanan AML-12 hücrelerinde D-carvone'un sitotoksisite, apoptoz, otofaji ve hücresel stresler üzerine etkisini araştırmaktır. Literatürde D-carvone'un akrilamide bağlı hepatotoksisite üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık.

Gereç ve Yöntemler: AML12 hücrelerinde D-carvone'un tek başına ve 10 mM akrilamid ile birlikte uygulandığında hücre canlılığına etkisi MTT testi ile değerlendirildi. Ardından 10 ve 25 µM D-carvone 10 mM akrilamid ile birlikte AML12 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanarak prokaspaz 3, aktif kaspaz 3, BAX, LC3B-II, ATF4 ve HSP70 düzeylerine etkisi western blot yöntemi ile gösterildi.

Bulgular: D-carvone tek başına uygulandığında 250 µM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı. 10, 25 ve 50 µM D-carvone 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdı ve hücre canlılığındaki azalmayı D-carvone'un en fazla engelleyen konsantrasyonları olan 10 ve 25 µM seçilerek sonraki deneylerde kullanıldı. 10 mM akrilamid uygulaması prokaspaz 3, BAX, LC3B-II, ATF4 ve HSP70 düzeylerini anlamlı olarak arttırdı ve aktif kaspaz 3 oluşumuna yol açtı. 10 mM akrilamid uygulanan hücrelerde 25 µM D-carvone aktif kaspaz 3, BAX, LC3B-II, ATF4 ve HSP70 düzeylerini ve 10 µM D-carvone aktif kaspaz 3 ve ATF4 düzeylerini anlamlı olarak azalttı.

Sonuç: Çalışmamız, D-carvone'un akrilamid uygulanan AML-12 hücrelerinde sitotoksisiteyi, apoptozu, otofajiyi ve hücresel stresleri azalttığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Akrilamid, D-carvone, AML12, apoptoz, otofaji, hücresel stres

Destekleyen Kurum: Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2023/42

ABSTRACT

"Effect of D-Carvone on acrylamide-induced cellular hepatotoxicity", Trakya University, Institute of Health Science, Medical Biochemistry Department, Master Thesis, Edirne, 2024.

Background and Aim: This study aimed to investigate the effects of D-carvone on cytotoxicity, apoptosis, autophagy and cellular stress in AML-12 cells treated with acrylamide. We could not find any study in the literature investigating the effect of D-carvone on acrylamide-induced hepatotoxicity.

Material and Methods: The effect of D-carvone alone and with 10 mM acrylamide on cell viability in AML12 cells was evaluated by MTT test. Then, 10 and 25 μM D-carvone together with 10 mM acrylamide was applied to AML12 cells for 24 hours, and its effects on procaspase 3, active caspase 3, BAX, LC3B-II, ATF4 and HSP70 levels were shown by western blot method.

Results: : D-carvone significantly decreased cell viability at 250 μM and above when applied alone. 10, 25 and 50 μM D-carvone significantly increased cell viability in cells treated with 10 mM acrylamide, and the concentrations of D-carvone that most prevented the decrease in cell viability, 10 and 25 μM, were selected and used in subsequent experiments. 10 mM acrylamide application significantly increased the levels of procaspase 3, BAX, LC3B-II, ATF4 and HSP70 and led to the formation of active caspase 3 formed. In cells treated with 10 mM acrylamide, 25 μM D-carvone significantly decreased the levels of active caspase 3, BAX, LC3B-II, ATF4 and HSP70, and 10 μM D-carvone significantly decreased the levels of active caspase 3 and ATF4.

Conclusion: Our study shows that D-carvone reduces cytotoxicity, apoptosis, autophagy and cellular stress in acrylamide-treated AML-12 cells.

Keywords: Acrylamide, D-carvone, AML12, apoptosis, autophagy, cellular stress

Financial Support: The present study was supported by the Research Fund of Trakya University. Project No: 2023/42

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akrilamid (AA) hem endüstriyel olarak hem de laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan poliakrilamidin sentezinde öncül madde olan renksiz ve suda çözünür bir kimyasaldır. AA aynı zamanda gıdalarda pişirme esnasında Maillard reaksiyonu ile de oluşabilmektedir (1). AA'nın vücutta birçok sistem üzerine zararlı etkilerinin yanında karaciğer üzerine zararlı etkileri olduğu da gösterilmiştir (2,3). AML12 hücreleri, ticari olarak satılmakta olan fare kaynaklı ölümsüz hepatositlerdir ve hepatositler üzerine yapılan toksisite çalışmalarında da kullanılmaktadırlar (4).

Isı şok proteini (HSP) 70; oksidatif stres, hipertermi, ultraviyole radyasyon ve etanol gibi çeşitli stres faktörlerine cevap olarak sentezi artan HSP protein ailesinde yer alır (5). Endoplazmik retikulum (ER) fonksiyonlarında bozulma meydana gelirse ER stresi oluşur (6). ER stresi belirteçlerinden biri olan aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (ATF4), amino asit metabolizması ve taşınması, protein homeostazı ve oksidatif stresten koruma ile ilgili genleri kontrol etmektedir ve aynı zamanda gerektiğinde ATF4 hücre döngüsünün durmasını, yaşlanmayı ve apoptozu indükleyebilir (7-9).

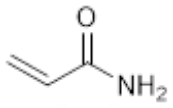
Hücre ölüm yollarından biri olan apoptoz programlanmış hücre ölümü olarak bilinmektedir (10). B hücreli lenfoma 2 (BCL-2) ilişkili X proteini (BAX) apoptoz sinyaline bağlı olarak aktifleşerek sitoplazmadan mitokondriye geçer ve mitokondrial dış membranında porlar oluşmasına neden olur (11). Apoptozdaki hem intrensek hem de ekstrensek yolların kaspaz-3 aktivasyonuna yol açmasından dolayı kaspaz-3'ün ana efektör kaspaz olduğu kabul edilmiştir ve yarılarak aktifleşir (12). Otofaji genel anlamda hücrenin hayatta kalmasına katkı sağlayan bir mekanizma olsa da aynı zamanda hücrenin yok olmasına da neden olabilen bir hücre ölüm yollarından biridir (13). Otofagozomun temel bileşeni olan LC3 (Mikrotübül-ilişkili protein hafif zincir 3), otofagazom oluşumu esnasında modifiye olarak LC3-II formuna dönüşür (14,15).

D-Carvone, dereotu ve kimyon tohum yağlarında bulunur ve antioksidan, anti-inflamatuar, anti-kanser, anti-artritik ve anti-nosiseptif etkiler gösterdiği bildirilmektedir (16, 17). Literatürde D-carvone'un akrilamid toksisitesi üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, AA uygulanan AML-12 hücrelerinde D-carvone'un sitotoksisite, apoptoz, otofaji ve hücresel stresler üzerine etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akrilamid

Akrilamid (AA) (akrilik amid, 2-propenamid, C_3H_5NO) 71.08 g/mol molar kütleye sahip hidrofilik bir moleküldür. Akrilamidin üzerinde iki farklı fonksiyonel grup bulunmaktadır. Bunlar yüksek reaktivite oluşumuna neden olan α ve β karbon atomlarının çift bağları ve bir amid grubudur. AA bir karbonil türevidir (18,19).



Şekil 2.1. Akrilamidin kimyasal yapısı (ChemDraw programı kullanılarak çizildi)

Akrilamid çok geniş kullanıma sahip olan poliakrilamidin üretiminde kullanılmaktadır. Poliakrilamid topaklaştırıcı olarak, içme ve atık suların arıtılmasında, inşaat, tekstil, kozmetik, gıda ambalajı, sigara üretimi, laboratuvarlarda jel kromatografisi ve poliakrilamid jel elektroforez yöntemleri için de kullanılmaktadır (20-23). Bununla birlikte poliakrilamidin termal, kimyasal, mekanik, fotolitik ve biyolojik bozunmaya maruz kalması sonucu akrilamide depolimerizasyonu da olasıdır (20). AA'nın endüstriyel atıklar ve sigara dumanında varlığı kanıtlanmıştır (24). AA'nın nörotoksik etkileri mevcuttur (25). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı 1994 yılında AA'yı grup 2A kanserojen madde sınıfına eklemiştir (26). AA aynı zamanda gastrointestinal, genitoüriner, üreme, hepatobiliyer, bağışıklık sistemi ve sinir sistemleri üzerinde de toksik etki göstermektedir (23). Yapılan çalışmalarda AA'nın memelilerdeki toksik etkilerinde yüksek derecede kanserojen ve mutajenik aktiviteye sahip metaboliti olan glisidamid de önemli rol oynamaktadır. AA'nın proteinler gibi bazı biyolojik makromoleküllerle etkileşime girerek antioksidan enzim sistemini bozmasından dolayı reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine neden olur. Aşırı derecede ROS birikimi sitotoksik olayları meydana getirir böylece oksidatif stres ve DNA hasarı oluşmasına neden olur (27).

Patates kızartmaları, patates cipsleri, gevrek ekmekler, tahıllar ve kahve gibi gıdalarda AA saptanmaktadır (28,29). Gıdalarda AA, Maillard reaksiyonu ile oluşabilmektedir. Gıdanın ısıl işlemi sırasında oluşan bu reaksiyonlar indirgeyici şekerler ve asparajin arasında

gerçekleşmektedir (30). Gıdalarda akrilamidin oluşumunda her ne kadar ana yol olarak asparajin gösterilse de bazı alternatif yollar da vardır. Örneğin, AA oluşumu için çok önemli olarak görülen akrolein (1-propenal) akrilik asit oluşum yoluyla AA eldesi için kullanılan bir α veya β doymamış aldehittir. Lipidlerce zengin gıdalarda karbonil grubu kaynağı olarak görev alan akrolein belirli koşullar altında asparajin ile reaksiyona girerek yüksek miktarda akrilamid oluşturur (23).

2.2. AML12 Hücre Hattı

AML12, fare karaciğerinden izole edilen ve ticari olarak satılmakta olan hepatositlerdir (31). AML12 hücreleri klasik bir poligonal epitelyal fenotipe sahiptir (32). AML12 hücreleri hepatositlerdeki etkinin araştırılması amacıyla ilaç araştırması ve toksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (33).

2.3. Isı Şok Proteini 70

Akut ve kronik stres hücresel homeostazı bozar, bu sebeple organizmalar hücresel homeostazın bozulmasını engellemek ve hasarı azaltmak için çeşitli stres yanıtları geliştirmiştir. Birçok stres etkeni mevcuttur, bu etkenlerin hedefinde bulunan bazı spesifik genlerin aktivasyonu ile stres tepki yollarını indükleme olasılığı yüksektir (34,35). Prokaryot ve ökaryot hücrelerinde bulunan ve evrimsel olarak kendini korumuş olan ısı şok proteini (HSP) ailesi de oksidatif stres, hipertermi, UV radyasyon ve etanol gibi çeşitli stres faktörlerine cevap olarak sentezi artan proteinlerden oluşmaktadır. HSP proteinleri genelde moleküler ağırlıkları ile ilişkili olarak HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 şeklinde adlandırılmaktadır (36-38).

İnsanlar hücresel lokalizasyon, aktivite ve ekspresyon bakımından farklı olan 13 HSP70 gen ürünü eksprese eder. HSP70 proteinlerinin yapısında yaklaşık 44 kDA'lık bir N-terminal ATPaz alanı, yaklaşık 28 kDA'lık bir substrat bağlama alanı ve lösinden zengin bir C-terminal bölgesi bulunur (39). HSP70 proteinleri hidrofobik yüzeylere bağlanırlar böylece proteinler kısmen açılarak proteinin yeniden katlanmasına olanak tanır. Bitkilerde, bakterilerde ve insanlarda HSP70 ailesi yüksek homolojiye sahiptir. HSP70 proteinleri ayrıca stres koşulu altındaki rolleri dışında membranlar boyunca translokasyon, translasyon, agregatların veya makromoleküler komplekslerin çözülmesi ve birleştirilmesi, apoptoz ve gen indüksiyonunda rol oynar (40). Hsp70 üzerine olan çalışmaların çoğu hücrelerde Hsp70

izoformlarının ekspresyonu, ko-şaperon işlevi, ATP bağlanması ve hidrolizi gibi düzenleyicilere odaklanmış olsa da, son zamanlarda, HSP70'in asetilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon, oksidasyon gibi düzenleyici post-translasyonel modifikasyonları da tanımlanmıştır (39).

2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER) önemli bir hücresel organeldir. ER'nin proteinlerin sentezi, modifikasyonu, katlanması ve taşınması, steroidlerin ve fosfolipitlerin sentez ve dağılımı, lümen içine kalsiyum iyonlarını depolanması ve sitoplazmaya düzenli bir şekilde salınması gibi yaşamsal görevleri bulunmaktadır. ER'nin fonksiyonlarında bozulma meydana gelirse oluşan ER stresine karşı öncelikle katlanmamış protein cevabı (UPR) etkinleşerek ER'yi normal fizyolojisine döndürmeye çalışır. ER fonksiyonunun bozulması sadece ER ile sınırlı kalmayıp hücreye de yayılır (6).

Normal koşullarda ER şaperonu olan glukozla düzenlenen protein 78, ER lümeninde yer alan ve ER stres sinyalinde görev alan protein kinaz R benzeri ER kinaz, inositol gerektiren enzim 1 ve aktive edici transkripsiyon faktör (ATF) 6 proteinlerine bağlanarak onları inaktif halde tutar. Yanlış bir şekilde katlanmış proteinlerin sayısı belli bir eşiği geçtiğinde glukozla düzenlenen protein 78 bu ER stres sinyalinde görev alan proteinlerden ayrılarak yanlış katlanmış proteinlere bağlanır ve böylece serbest kalan proteinler aktive olarak ER stres sinyalinin iletilmesinde rol oynarak UPR yanıtını başlatır (41,42). UPR öncelikle yanlış katlanmış proteinleri düzeltmek veya ortadan kaldırmak ile ER homeostazını sağlamaya çalışır, eğer ER homeostazı sağlanamaz ise hücresel apoptozu tetikler (43,44).

ER stres sinyallerinden biri olarak aktifleşen protein kinaz R benzeri ER kinaz, ökaryotik translasyon başlama faktör 2α'nın fosforillenerek aktifleşmesini sağlar ve bu yolla ATF4 uyarılır. ATF4 bu sebeple ER stresi belirteçlerinden biridir (7). ATF4, amino asit metabolizması ve taşınması, protein homeostazı ve oksidatif stresten koruma ile ilgili genleri kontrol etmektedir ve aynı zamanda gerektiğinde ATF4 hücre döngüsünün durmasını, yaşlanmayı ve apoptozu indükleyebilir (7-9).

2.5. Apoptoz

Apoptoz kelime kökeni olarak Yunanca'da ayrılarak düşmek anlamına gelen 'apoptōsis' kelimesinden türetilmiştir, hücre ölüm yollarından biri olan apoptoz programlanmış hücre ölümü olarak bilinmektedir (10). Apoptoz, hücrenin bölünmesi ve büyümesinin durduğu, bulunduğu ortama zarar vermeden kontrollü bir biçimde hücrenin ölümü ile neticelenen bir süreçtir. Apoptoz; doku homeostazı, embriyonik gelişim ve zararlı hücrelerin uzaklaşması için gereklidir. Apoptozda oluşabilecek herhangi bir düzensizlik çeşitli birçok patolojik bozukluklara neden olabilir (43). Ekstrensek (hücre ölüm reseptörü) veya intrensek (mitokondriyal) yol ile uyarılan apoptoz, hücrenin parçalanmasından sorumlu olan endonükleazların ve proteazların aktivasyonunu tetikler (44).

Hücre içi stres ile aktive olan intristik apoptotik yolda mitokondri oldukça önemli rol oynamaktadır (45). İntrinsik apoptotik yolda mitokondriyal dış zar geçirgen olur ve zardan sitokrom c gibi apoptotik faktörlerin salınmasına neden olan geri dönüşümsüz bir sinyal kaskadı tetiklenir. Bu yol B hücreli lenfoma 2 (BCL-2) protein ailesi tarafından düzenlenir. Antiapopitotik BCL-2 ve Proapopitotik BCL-2-ilişkili X proteini (BAX) olmak üzere BCL-2 ailesinin iki iyi bilinen üyesi vardır (43). Apoptoza yol açan hücresel strese bağlı sitozolik BAX aktive olur, mitokondriye taşınır, mitokondrial dış membrana yerleşmesiyle birlikte zarda porlar oluşmasına neden olur (11).

Kaspazlar olarak adlandırılan sistein aspartik proteazların aktive olması apoptoz sürecinde önemli rol oynar. Kaspazlar başlatıcı ve efektör olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Hücre hasarı tespit edildiği taktirde başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8 ve kaspaz 9) devreye girer, aktif olmayan prokaspazlar aktif hale gelir ve efektör kaspazlar (kaspaz 3, kaspaz 6, kaspaz 7) aktive olur. Kaspaz 3 ve 7 aktivasyonu, DNA parçalanması, endonükleazların aktivasyonu, hücre iskeletlerin yıkımı, fagositik hücreler için ligandların ekspresyonu, proteinlerin çapraz bağlanması ve apoptotik cisimlerin oluşması gibi birçok olayın başlamısına neden olur (46). Kaspaz-3, CASP3 gen tarafından kodlanır, aynı zamanda apopain olarak da adlandırılmaktadır ve sistein aspartik proteaz ailesinin üyesidir (47). Apoptozdaki hem intrensek hem de ekstrensek yolların kaspaz-3 aktivasyonuna yol açmasından dolayı ana efektör kaspaz olduğu kabul edilmiştir. Apoptozda, prokaspaz-3 yarılarak, aktif kaspaz-3'ü oluşturur (12). Kaspaz-3, proteaz yolundaki apoptozu indükleyen en son enzimdir ve hücre ölümüyle ilişkilendirilir (46,48,49).

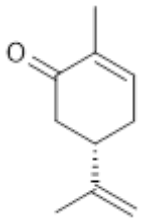
2.6. Otofaji

Otofaji terimi 1963 yılında ilk kez Christian ve Dude tarafından tanımlanmıştır ve Yunancada 'kendini yemek' anlamına gelmektedir (50,51). Katlanmamış proteinler, hasarlı organeller ve patojenler de dahil olmak üzere hücre içi yapıları parçalamak için gerekli durumlarda otofajik zar yapıları etkinleşmektedir ve lizozomlar aracılıklı bir parçalanma meydana gelmektedir (13,46). Otofaji, sitoprotektif bir mekanizma olarak çalıştığı için hasarlı hücre içi bileşenlerin bir araya gelerek birikmesini önlediği ve hücrenin dengesini ve enerji metabolizmasını koruyarak besin açlığı ve stres koşullarında hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olduğu için önemlidir (50). Otofajinin temel olarak makro otofaji, mikro otofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç tipi tanımlanmıştır. Otofaji, hasarlı proteinleri, endoplazmik retikulum, mitokondri, peroksizomlar, kloroplast gibi organelleri ve enfeksiyöz patojenler hedeflenerek seçici otofaji şeklinde ve stres veya açlık durumunda görülebilen seçici olmayan otofaji şeklinde meydana gelebilmektedir (50,51). Otofaji genel anlamda hücrenin hayatta kalmasına katkı sağlayan bir mekanizma olsa da aynı zamanda hücrenin yok olmasına da neden olabilen hücre ölüm yollarından biridir (13).

Otofajik süreçte görev alan otofaji ilişkili (ATG) 3, ATG5, ATG7, ATG10, ATG12 ve mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3 (LC3) gibi çeşitli proteinler tanımlanmıştır. Otofagozomun temel bileşeni olan LC3, otofagozomlara kargoları iletmek için adaptör görevi görür (14). LC3 proteinin LC3A, LC3B ve LC3C varyantları bulunmaktadır. LC3B otofagozomların oluşumu için gereklidir. Otofajinin indüklenmesiyle LC3-I ve LC3-II formları oluşur. LC3-I'in fosfatidilamin ile konjuge edilmesinin ardından membrana bağlı form olan LC3-II'ye dönüşür. LC3B-II otofagozomlara girer ve ardından otofagazomun lizozom ile kaynaşması sonucu lizozomal hidrolazlar aracılığıyla yıkılır. Bu yüzden otofojinin izlenmesinde bir belirteç olarak sıklıkla kullanılmaktadır (15).

2.7. D-Carvone

Carvone, asimetrik karbona sahip bir monoterpen ketondur, kaynama noktası 230 °C'dir ve kapalı formülü ($C_{10}H_{14}O$) şeklindedir (16).



Şekil 2.7. Carvone'nun kimyasal yapısı (ChemDraw programı kullanılarak çizildi)

Carvone'nun, D-Carvone (S-(+) Carvone) ve L-Carvone (R-(-) Carvone) olmak üzere iki stereokimyasal izomeri bulunmaktadır. Carvone esansiyel yağların aktif bir bileşenidir. L-carvone nanenin (Mentha spicata) ana bileşenidir, D-Carvone ise dereotu (Anethum graveolens) ve kimyon (Carum carvi) tohum yağlarında bulunmaktadır. Carvone tat ve koku bileşeni olarak kulanılırken, yüksek oranda carvone içeren bitkiler çeşni ve baharat olarak kulanımı dışında tıpta da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (17). D-carvone'nun antioksidan, anti-inflamatuar, anti-kanser, anti-artritik ve anti-nosiseptif etkiler gösterdiği bildirilmekle (17) birlikte D-carvone'un akrilamid toksisitesi üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık.

Bu tez çalışmasının amacı, AA uygulanan AML-12 hücrelerinde D-carvone'un sitotoksisite, apoptoz, otofaji ve hücresel stresler üzerine etkisini araştırmaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya ait deneyler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yapıldı ve western blot yönteminde membranların kemilüminesans görüntülenmesi Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler:

2-merkaptoetanol (Sigma)

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

% 0,25 Tripsin-etilendiamin tetraasetik asit solüsyonu (Thermo)

α-Tübülin primer antikoru (Santa Cruz)

Akrilamid (Merck)

Amonyum persülfat (Sigma)

Antibiyotik-antimikotik solüsyonu (Thermo)

ATF4 primer antikoru (Cell Signaling)

BAX primer antikoru (Solarbio)

D-Carvone (Sigma)

Deksametazon (Sigma)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma)

Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri-Ham's F12 besiyerleri (fenol red içeren ve içermeyen) (Wisent)

Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma)

Fetal sığır serum (Thermo)

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Merck)

Gliserol (Sigma)

Glisin (Sigma)

HSP70 primer antikoru (Abcam)

Hidrojen peroksit (Merck)

Hidroklorik asit (%37) (Merck)

İsopropanol (Honeywell)

İnsulin transferrin selenium karışımı (100X) (Wisent)

Kaspaz-3 primer antikoru (Solarbio)

Kemilüminesans substrat (Thermo)

LC3B-II primer antikoru (Cell Signaling)

Metanol (Merck)

N,N,N,N-tetrametilendiamin (Sigma Aldrich)

N,N-Metilen bis-akrilamid (Merck)

Poliviniliden diflorür membran (Roche)

Pre-stained protein ladder (Thermo)

Sekonder antikorlar (Boster Bio)

Sığır serum albumini (Sigma)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)

Sodyum hidroksit (Merck)

Sodyum karbonat (Merck)

Sodyum klorür (Sigma)

Tuzlu fosfat tamponu (PBS) tablet (Thermo)

Tween 20 (Santa Cruz)

Yağsız süt tozu (Sigma)

Trizma baz (Sigma)

Analizlerde kullanılan aletler ve diğer malzemeler:

Biyogüvenlik kabini (Thermo)

Çalkalayıcı (Cleaver Scientific)

Derin dondurucu (-80°C) (Heraeus)

Distile su cihazı (Nüve)

Dikey elektroforez sistemi (Cleaver Scientific)

Elektronik tartı (Sartorius)

Faz kontrast invert mikroskop (Olympus)

Güç kaynağı (Cleaver Scientific)

Manyetik karıştırıcı (Daihan Scientific)

Karbondioksitli inkübatör (Thermo)

Kemilüminesans görüntüleme sistemi (Bio-rad)

Mikrobiyolojik inkübatör (Thermo)

Mikroplaka okuyucu (Biotek)

Otomatik pipetler (Eppendorf ve Capp)

pH metre (İnolab)

Santrifüj (Nüve)

Sıvı azot tankı (Air Liquide)

Su banyosu (GFL)

Vortex (Velp Scientificia)

Western blotting sistemi (Cleaver Scientific)

Balon joje (Isolab)

Beher (Isolab)

Flask 75cm^2 (Nest)

Hücre kazıyıcı (Isolab)

Mezür (Isolab)

Mikroplaka-96 kuyucuklu (SPL)

Petri kabı (SPL)

Steril otomatik pipet uçları (Isolab)

Steril serolojik pipetler (Isolab)

Steril şırınga filtre (Biosorfa)

Steril vida kapaklı santrifüj tüpleri (Isolab)

Thoma lamı (Isolab)

3.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada fare karaciğerinden elde edilen ticari AML12 hücre hattı (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu CRL-2254) kullanılmıştır. Deneylerde 3-10 arası hücre pasajları kullanılmıştır. Hücreler, %10 fetal sığır serumu, %1 insülin-transferrin-selenyum çözeltisi, 40 ng/ml deksametazon ve %1 antibiyotik-antimikotik içeren Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri-Ham's F12 besiyeri ile %5 CO_2'li ortamda 37°C inkübatörde yaşatıldı. Hücrelerin haftada 2 veya 3 kez medyumu değiştirildi ve %70-80 hücre yoğunluğuna ulaşıldığında 1:6 oranında pasajlandı. Hücrelere tüm uygulamalar biyogüvenlik kabini içerisinde steril malzemeler kullanılarak yapıldı. D-carvone DMSO'da çözüldü ve tüm deneylerdeki grupların besiyerlerindeki DMSO oranı %0,2 idi. Akrilamid ise besiyerinde çözüldü.

3.1.1. Hücre Canlılığı Ölçümü

Hücre canlılığı ölçümü deneylerinde 96 kuyucuklu mikroplakalara, her bir kuyucukta 5000 adet olacak şekilde hücreler ekildi. İlk deneyde D-carvone'nun AML12 hücrelerinin canlılığına etkisini göstermek için hücreler 24 saat boyunca 10, 25, 50, 100, 250 ve 1000 μM konsantrasyonlarda D-carvone ile inkübe edildi. İkinci deneyde D-carvone'un akrilamid uygulanan AML-12 hücrelerinde canlılığa etkisini araştırmak için, hücrelere 24 saat boyunca 10 mM akrilamid ile birlikte 10, 25, 50 ve 100 μM D-carvone konsantrasyonları uygulandı.

Hücre canlılığı ölçümünde MTT testi kullanıldı (52). 24 saatlik deneyler sonrası besiyerleri alınarak hücrelere 10 µl MTT (5 mg/mL, tuzlu fosfat tamponunda çözüldü) ve 100 µl fenol red içermeyen besiyeri konuldu ve hücreler 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası MTT içeren besiyeri alınarak kuyucuklarda oluşan formazan 200 µl DMSO ve 25 µl Sorenson tamponu (0,1 M glisin ve 0,1 M sodyum klorür; 0,1 M sodyum hidroksit ile pH:10,5'e ayarlandı) ile çözüldü ve oluşan renk mikroplaka okuyucuda 570/630 nm'de ölçüldü (53). Her bir deney için ölçülen absorbanslar kontrol grubunun ortalamasına bölünürek sonuçlar aynı plakadaki kontrol grubunun yüzdesi olarak verildi.

3.2. Western Blot

Hücreler petri kabına ekildi ve kaplar %70-80 hücre doluluğuna ulaştığında hücrelere 24 saat süreyle 10 mM akrilamid ile birlikte 10 ve 25 µM D-carvone konsantrasyonları uygulandı. Uygulamanın ardından hücreler tuzlu fosfat tamponu ile yıkandı ve 10mM Tris (pH=8), 50 mM EDTA, %1 SDS (w/v) içeren 90 °C'ye kadar ısıtılmış olan liziz tamponu ile homojenize edildi. Homojenatlarda protein düzeyi Lowry yöntemi (54) ile ve standart olarak sığır serum albumini kullanılarak ölçüldü.

Her bir grup için 20 µg protein Laemmli yöntemine (55) göre hazırlanan %4-12'lik poliakrilamid jele yüklenerek dikey sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıldı. Elektroforez sonrası jeldeki proteinler poliviniliden diflorür membrana aktarıldı. Aktarım sonrası membran 1 saat boyunca oda sıcaklığında %5 yağsız süt tozu bloklandı ve ardından 4 °C'de gece boyunca primer antikorlar (ATF4 için 1:1000, BAX için 1:1000, HSP70 için 1:10000, Kaspaz-3 için 1:1000, LC3B-II için 1:1000 dilüe) ile inkübe edildi. Daha sonra membranlar 1 saat oda sıcaklığında sekonder antikorlar (1:5000) ile inkübe edildi ve kemilüminesans substrat kullanılarak görüntülendi. Elde edilen bantlara ait yoğunluklar Image-J programı kullanılarak hesaplandı (56) ve her bir proteine ait sonuç aynı numunenin yükleme kontrolü olarak kullanılan α-tübülin sonucuna oranlandı ve sonuçlar aynı membrandaki kontrol grubuna oranlanarak kontrolün katı olarak verildi.

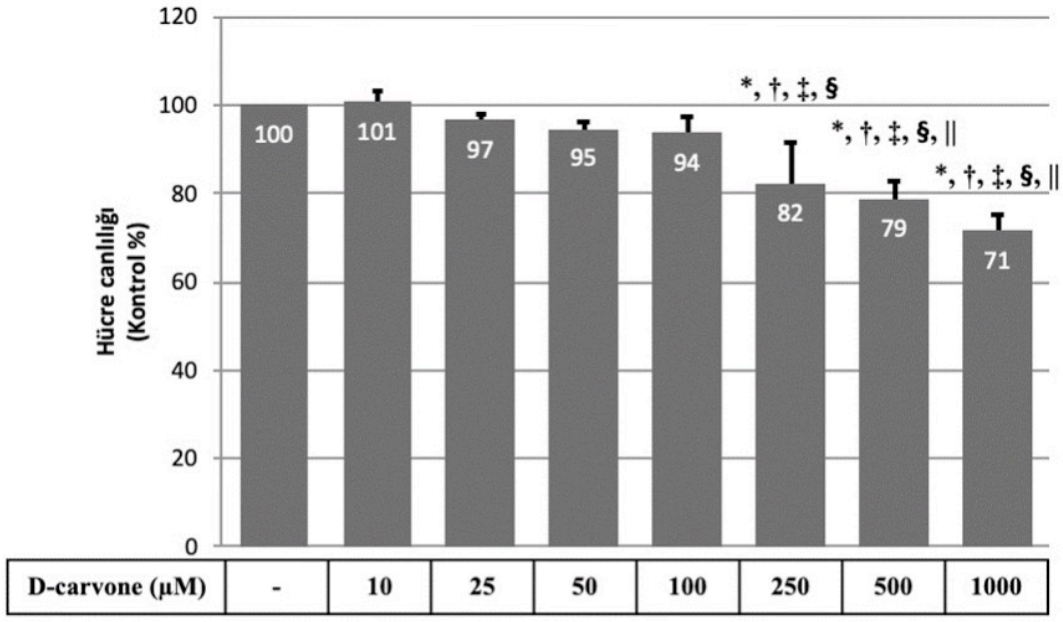
3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 20.00 programı (Lisans no:10240642) kullanılarak gerçekleştirildi. Parametrelerin karşılaştırılması için Tek Yönlü Varyans Analizi ve anlamlı fark saptandığında gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Tek başına D-carvone uygulamasının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.1.'de görülmektedir. AML12 hücrelerine 24 saat süreyle D-carvone uygulaması sonrası hücre canlılıkları kontrolün yüzdesi olarak; 10 µM uygulamada %101±2, 25 µM uygulamada %97±2, 50 µM uygulamada %95±2, 100 µM uygulamada %94±3, 250 µM uygulamada %82±9, 500 µM uygulamada %79±4 ve 1000 µM uygulamada %71±4 olarak bulundu.

250, 500 ve 1000 µM D-carvone uygulamaları hücre canlılığını kontrole ve 10, 25 ve 50 µM D-carvone uygulamalarına göre anlamlı olarak azalttı (tümü için $p<0.05$). 500 ve 1000 µM D-carvone uygulamaları hücre canlılığını 100 µM D-carvone uygulamasına göre anlamlı olarak azalttı (her ikisi için $p<0,05$). Bu sonuçlara göre tek başına uygulandığında hücre canlılığında anlamlı değişmeye yol açmayan 10, 25, 50 ve 100 µM D-carvone konsantrasyonları sonraki deneyde kullanıldı.

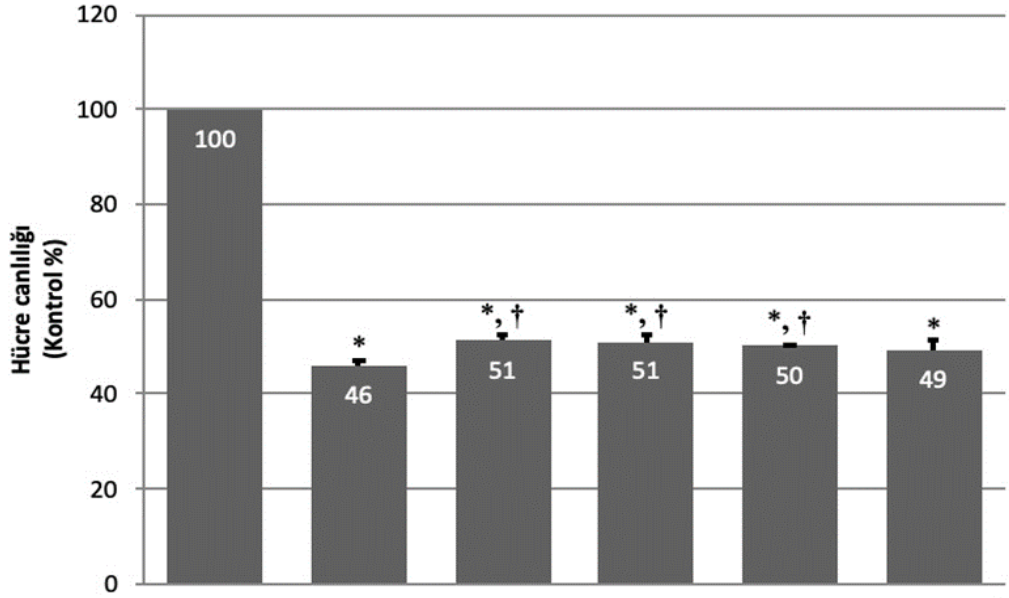


Sonuçlar 3 bağımsız tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı ($p>0.05$).
***: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.**
†: 10 µM D-carvone uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
‡: 25 µM D-carvone uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
§: 50 µM D-carvone uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.
||: 100 µM D-carvone uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

Şekil 4.1. Tek başına D-carvone uygulamasının hücre canlılığına etkisi

Akrilamid ile birlikte D-carvone uygulamasının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.2.'de görülmektedir. AML12 hücrelerine 24 saat süreyle 10 mM akrilamid ile birlikte D-carvone uygulaması sonrası hücre canlılıkları kontrolün yüzdesi olarak; tek başına akrilamid uygulamasında %46±1, akrilamid ile birlikte; 10 µM uygulamada %51±1, 25 µM uygulamada %51±1, 50 µM uygulamada %50±0, 100 µM uygulamada %49±2 olarak bulundu.

Tüm akrilamid uygulaması yapılan gruplarda hücre canlılığı kontrole göre anlamlı olarak düşüktü (tümü için $p<0,05$). Akrilamid ile birlikte 10, 25 ve 50 µM D-carvone uygulamaları hücre canlılığını tek başına akrilamid uygulamasına göre anlamlı olarak arttırdı (tümü için $p<0,05$). Bu sonuçlara göre akrilamid uygulamasına bağlı hücre canlılığındaki azalmayı D-carvone'un en fazla engelleyen konsantrasyonları olan 10 ve 25 µM seçilerek sonraki deneylerde kullanıldı.



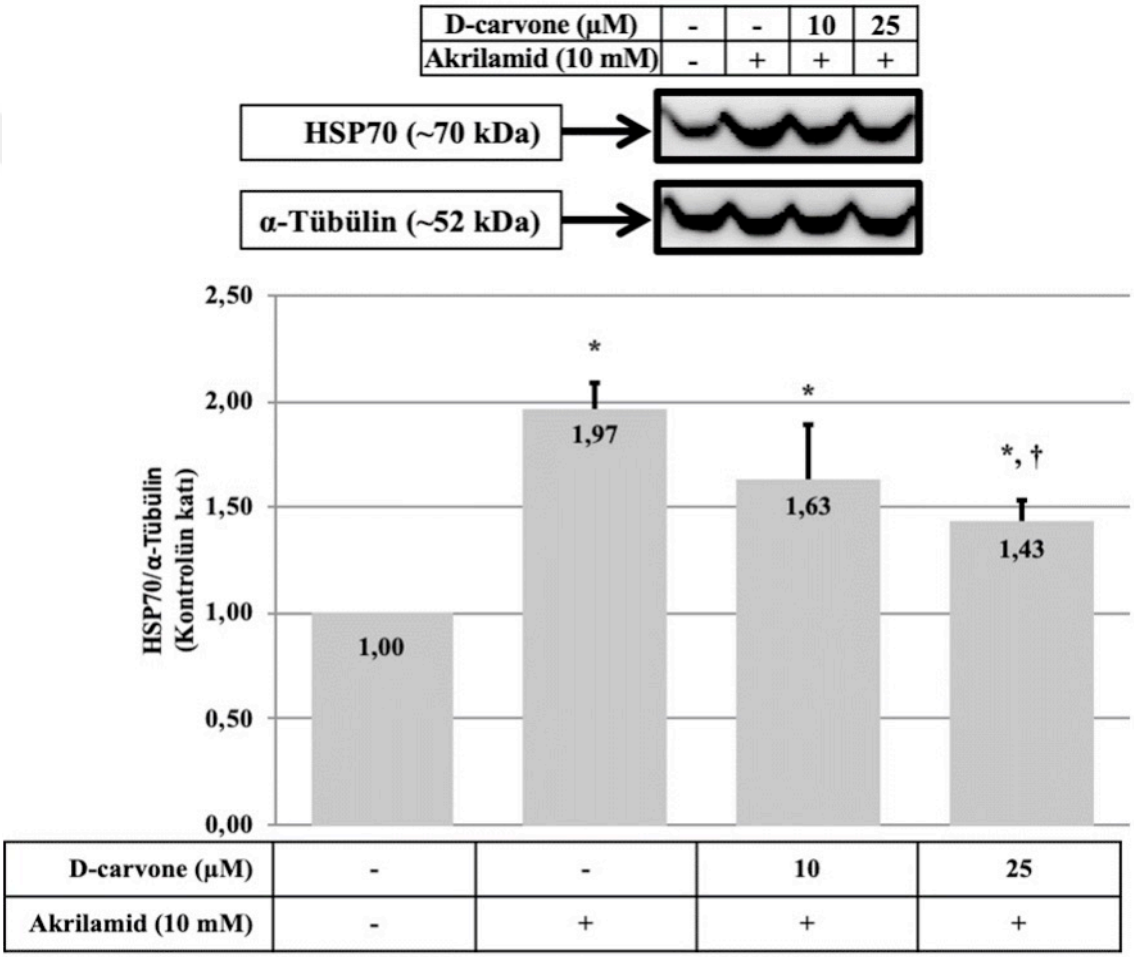
D-carvone (µM)	-	-	10	25	50	100
Akrilamid (10 mM)	-	+	+	+	+	+

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 ($p>0.05$).
***: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.**
†: 10 mM akrilamid uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

Şekil 4.2. Akrilamid ile birlikte D-carvone uygulamasının hücre canlılığına etkisi

Akrilamid ile birlikte D-carvone uygulamasının HSP70 düzeyine etkisi Şekil 4.3.'te görülmektedir. AML12 hücrelerine 24 saat süreyle 10 mM akrilamid ile birlikte D-carvone uygulaması sonrası HSP70 düzeyleri kontrolün katı olarak; tek başına akrilamid uygulamasında 1,97±0,12, akrilamid ile birlikte; 10 µM uygulamada 1,63±0,26 ve 25 µM uygulamada 1,43±0,11 olarak bulundu.

Tüm akrilamid uygulaması yapılan gruplarda HSP70 düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak yüksekti (tümü için $p<0,05$). Akrilamid ile birlikte 25 µM D-carvone uygulaması HSP70 düzeyini tek başına akrilamid uygulamasına göre anlamlı olarak azalttı ($p<0,05$).

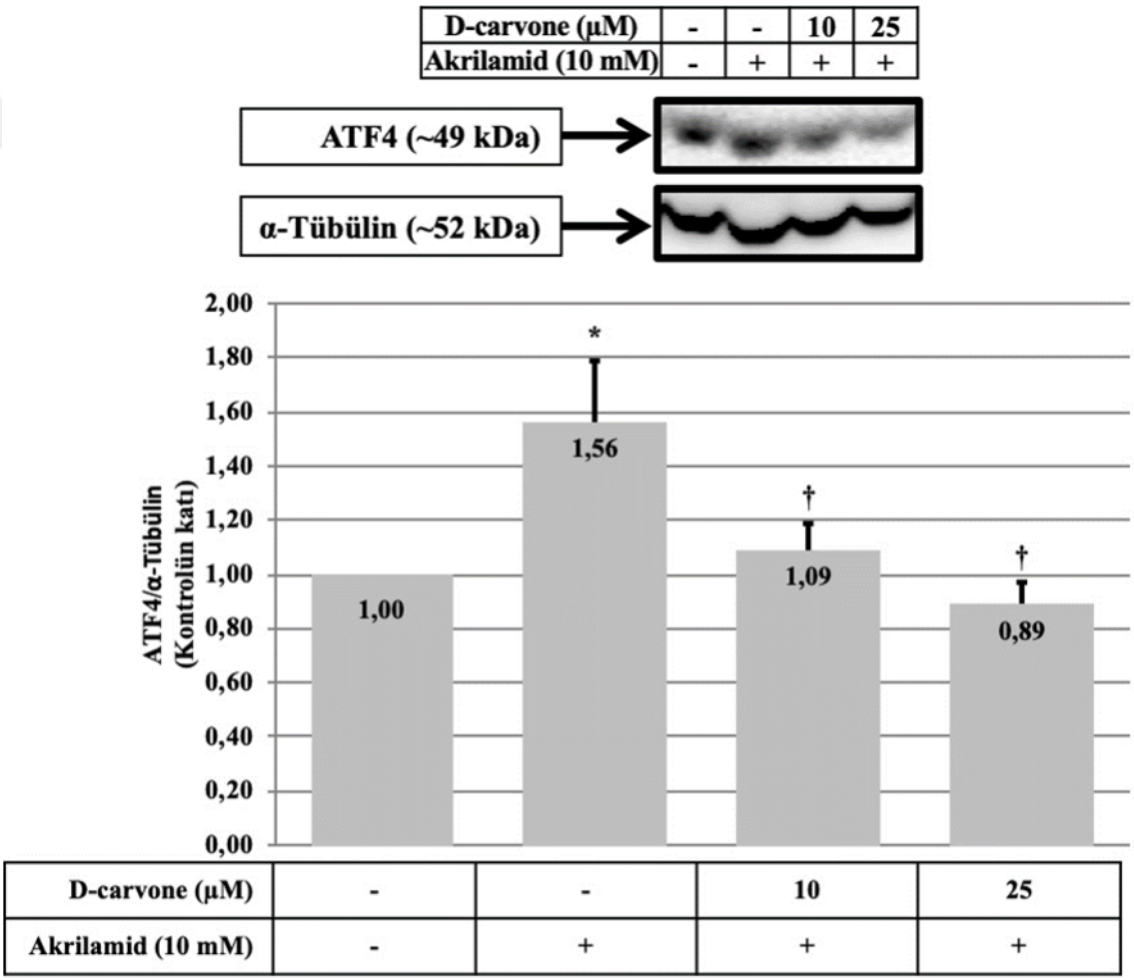


Sonuçlar 3 bağımsız tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
***: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.**
†: 10 mM akrilamid uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında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

Şekil 4.3. Akrilamid ile birlikte D-carvone uygulamasının HSP70 düzeyine etkisi

Akrilamid ile birlikte D-carvone uygulamasının ATF4 düzeyine etkisi Şekil 4.4.'te görülmektedir. AML12 hücrelerine 24 saat süreyle 10 mM akrilamid ile birlikte D-carvone uygulaması sonrası ATF4 düzeyleri kontrolün katı olarak; tek başına akrilamid uygulamasında 1,56±0,23, akrilamid ile birlikte; 10 µM uygulamada 1,09±0,10 ve 25 µM uygulamada 0,89±0,08 olarak bulundu.

Tek başına akrilamid uygulaması yapılan grupta ATF4 düzeyi kontrole göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$). Akrilamid ile birlikte 10 ve 25 µM D-carvone uygulamaları ATF4 düzeyini tek başına akrilamid uygulamasına göre anlamlı olarak azalttı (her ikisi için $p<0,05$).

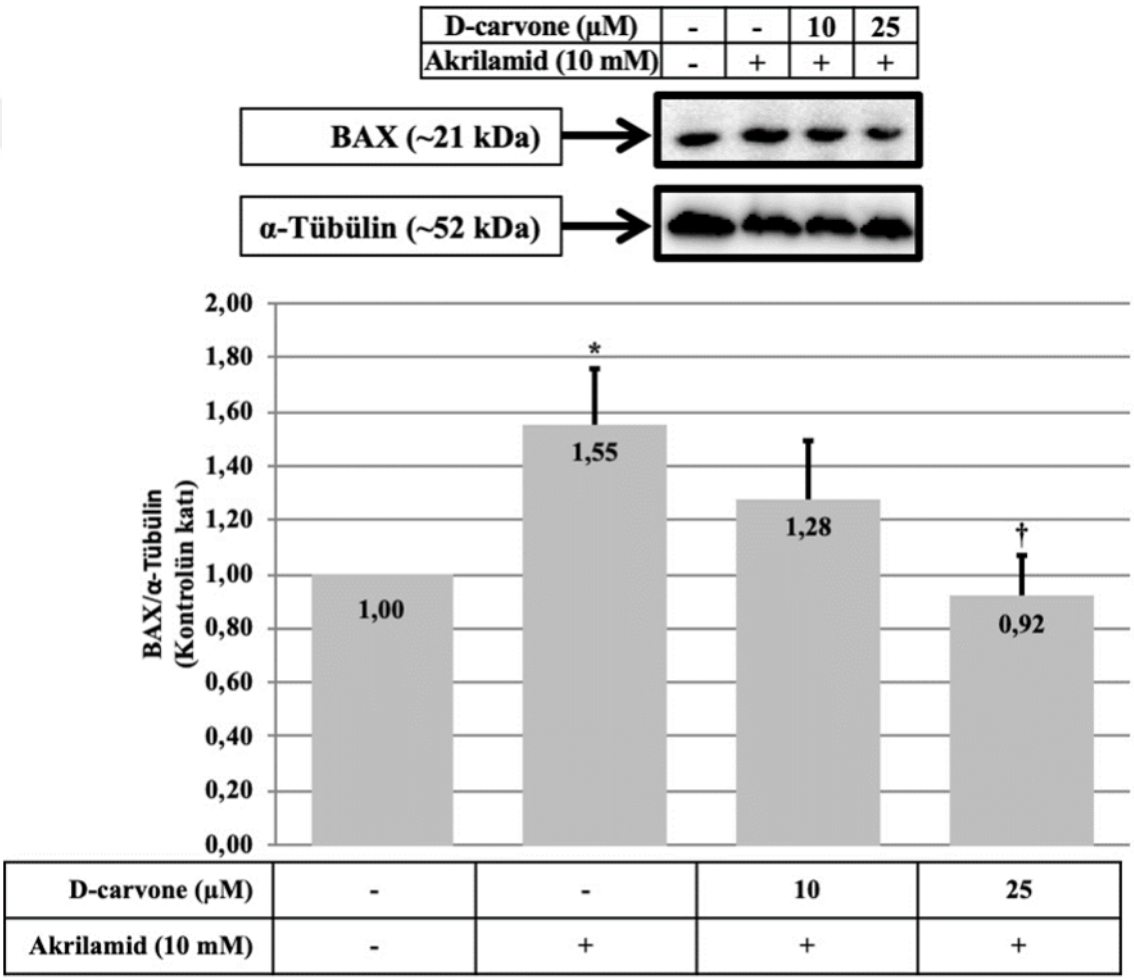


Sonuçlar 3 bağımsız tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3). İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
***: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.**
†: 10 mM akrilamid uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında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

Şekil 4.4. Akrilamid ile birlikte D-carvone uygulamasının ATF4 düzeyine etkisi

Akrilamid ile birlikte D-carvone uygulamasının BAX düzeyine etkisi Şekil 4.5.'te görülmektedir. AML12 hücrelerine 24 saat süreyle 10 mM akrilamid ile birlikte D-carvone uygulaması sonrası BAX düzeyleri kontrolün katı olarak; tek başına akrilamid uygulamasında 1,55±0,20, akrilamid ile birlikte; 10 µM uygulamada 1,28±0,22 ve 25 µM uygulamada 0,92±0,16 olarak bulundu.

Tek başına akrilamid uygulaması yapılan grupta BAX düzeyi kontrole göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$). Akrilamid ile birlikte 25 µM D-carvone uygulaması BAX düzeyini tek başına akrilamid uygulamasına göre anlamlı olarak azalttı ($p<0,05$).



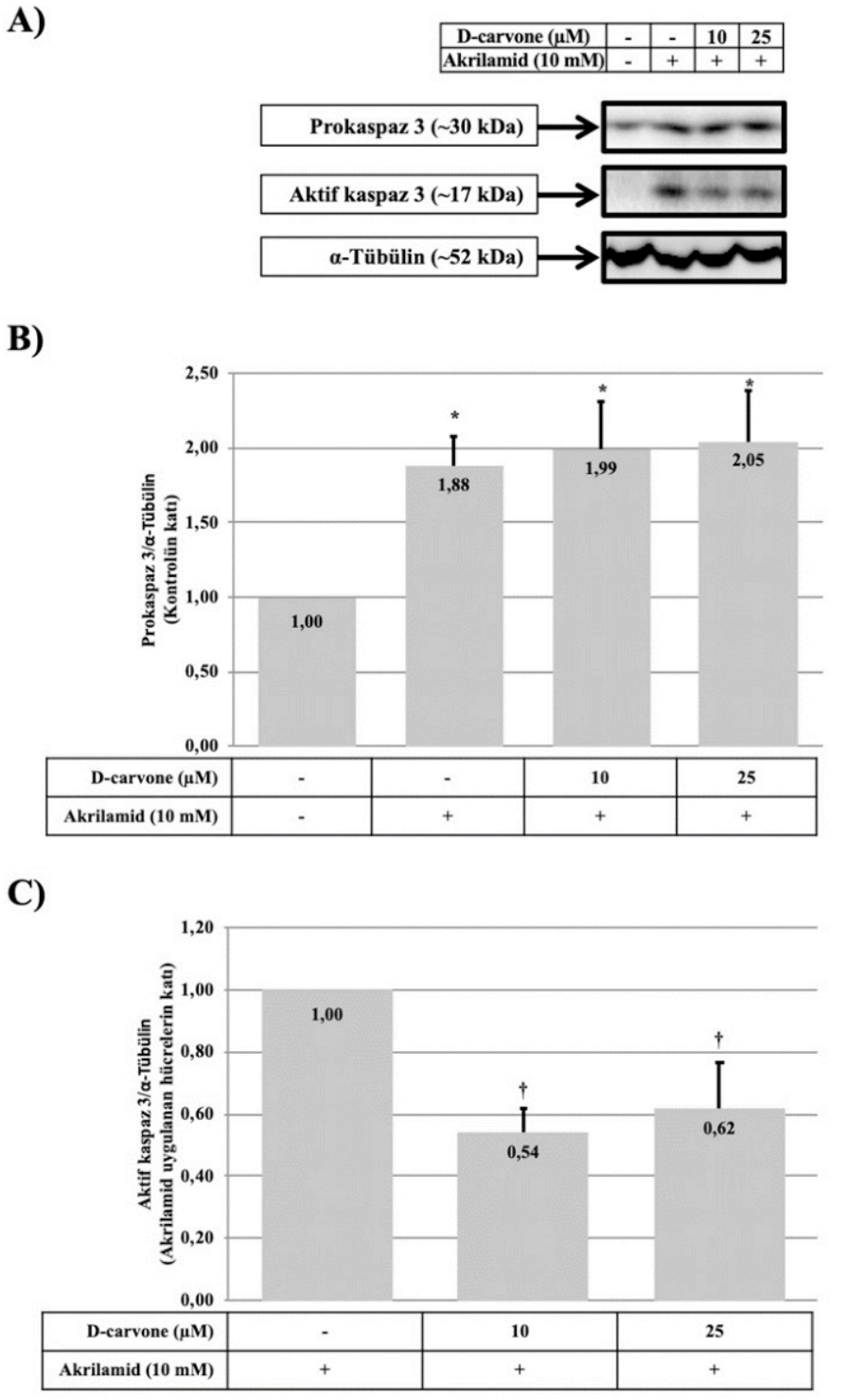
Sonuçlar 3 bağımsız tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3). İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
***: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.**
†: 10 mM akrilamid uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında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

Şekil 4.5. Akrilamid ile birlikte D-carvone uygulamasının BAX düzeyine etkisi

Akrilamid ile birlikte D-carvone uygulamasının prokaspaz 3 düzeyine etkisi Şekil 4.6. ’da (A ve B) görülmektedir. AML12 hücrelerine 24 saat süreyle 10 mM akrilamid ile birlikte D-carvone uygulaması sonrası prokaspaz 3 düzeyleri kontrolün katı olarak; tek başına akrilamid uygulamasında 1,88±0,20, akrilamid ile birlikte; 10 µM uygulamada 1,99±0,32 ve 25 µM uygulamada 2,05±0,33 olarak bulundu.

Tüm akrilamid uygulaması yapılan gruplarda prokaspaz 3 düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak yüksekti (tümü için $p<0.05$).

Akrilamid ile birlikte D-carvone uygulamasının aktif kaspaz 3 düzeyine etkisi Şekil 4.6.’da (A ve C) görülmektedir. Kontrol gruplarında aktif kaspaz 3 protein bandı görülmedi ve bu sebeple sonuçlar aynı deneydeki tek başına akrilamid uygulanan grubun katı olarak verildi. AML12 hücrelerine 24 saat süreyle 10 mM akrilamid ile birlikte D-carvone uygulaması sonrası aktif kaspaz 3 düzeyleri tek başına akrilamid uygulanan grubun katı olarak; akrilamid ile birlikte; 10 µM uygulamada 0,54±0,08 ve 25 µM uygulamada 0,62±0,15 olarak bulundu. Akrilamid ile birlikte 10 ve 25 µM D-carvone uygulamaları aktif kaspaz 3 düzeyini tek başına akrilamid uygulamasına göre anlamlı olarak azalttı (her ikisi için $p<0,05$).

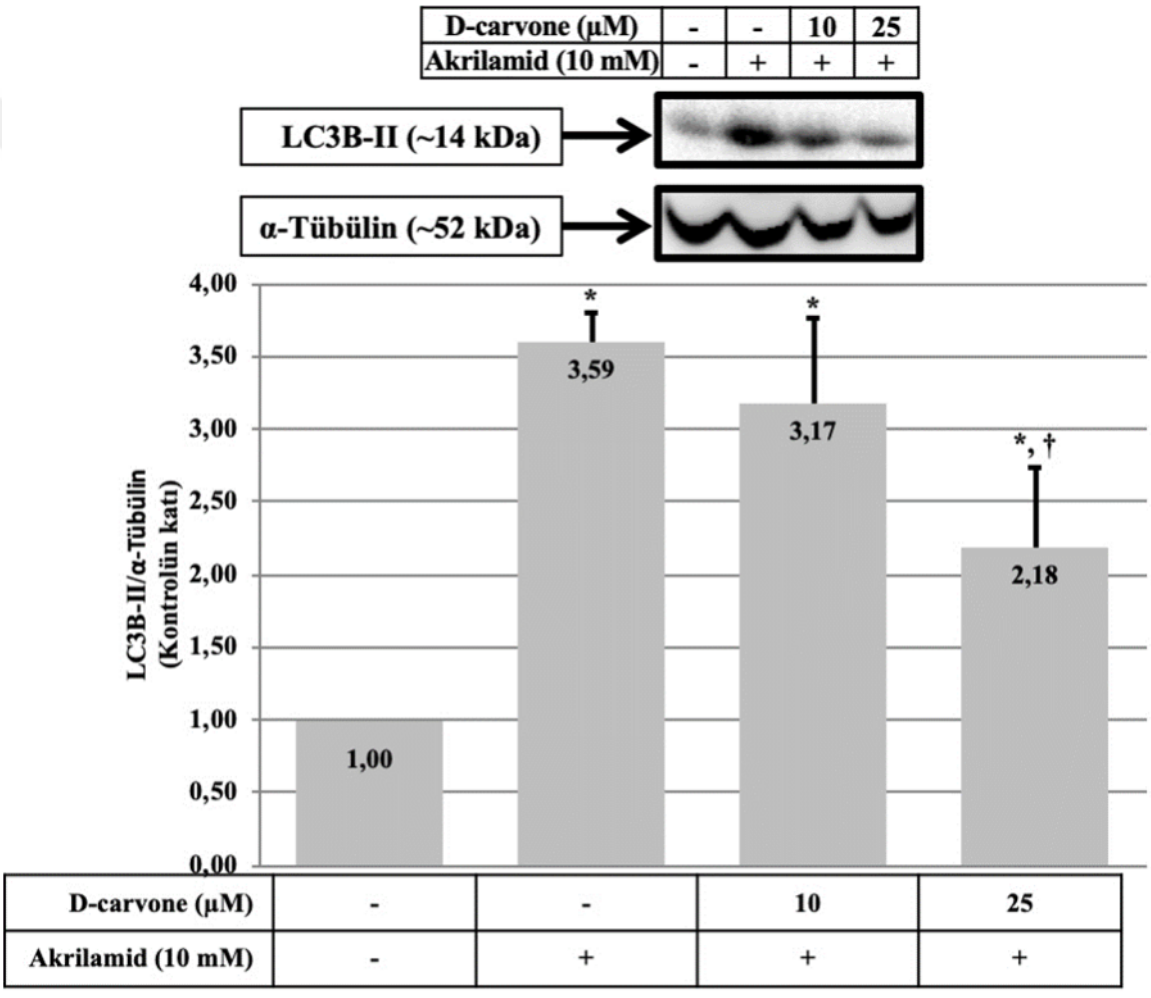


Sonuçlar 3 bağımsız tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
***: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.**
†: 10 mM akrilamid uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında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

Şekil 4.6. Akrilamid ile birlikte D-carvone uygulamasının prokaspaz 3 ve aktif kaspaz 3 düzeyine etkisi

Akrilamid ile birlikte D-carvone uygulamasının LC3B-II düzeyine etkisi Şekil 4.7.'de görülmektedir. AML12 hücrelerine 24 saat süreyle 10 mM akrilamid ile birlikte D-carvone uygulaması sonrası LC3B-II düzeyleri kontrolün katı olarak; tek başına akrilamid uygulamasında 3,59±0,20, akrilamid ile birlikte; 10 µM uygulamada 3,17±0,58 ve 25 µM uygulamada 2,18±0,55 olarak bulundu.

Tüm akrilamid uygulaması yapılan gruplarda LC3B-II düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak yüksekti (tümü için $p<0,05$). Akrilamid ile birlikte 25 µM D-carvone uygulaması LC3B-II düzeyini tek başına akrilamid uygulamasına göre anlamlı olarak azalttı ($p<0,05$).



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 uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

Şekil 4.7. Akrilamid ile birlikte D-carvone uygulamasının LC3B-II düzeyine etkisi

Bu çalışmada yer alan tüm ölçüm sonuçları Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmada yer alan tüm ölçüm sonuçları

PARAMETRE ADI	DENEYSEL GRUPLAR VE UYGULAMALAR								
Hücre Canlılığı (% Kontrol)		Kontrol	10 µM D-Carvone	25 µM D-Carvone	50 µM D-Carvone	100 µM D-Carvone	250 µM D-Carvone	500 µM D-Carvone	1000 µM D-Carvone
	1.tekrar	100,00	97,84	97,06	93,35	97,13	92,19	82,79	72,88
	2.tekrar	100,00	101,31	94,82	93,94	93,57	80,72	74,73	74,39
	3.tekrar	100,00	102,54	97,78	96,63	90,21	73,94	78,84	67,05
		Kontrol	10 mM Akrilamid	10 µM D-Carvone+	25 µM D-Carvone+	50 µM D-Carvone+	100 µM D-Carvone+		
	1. tekrar	100,00	47,56	52,52	51,17	50,19	48,51		
	2. tekrar	100,00	45,11	50,55	52,55	50,47	51,71		
	3. tekrar	100,00	44,91	50,49	49,71	49,57	47,14		
HSP70 düzeyi (Kontrolün katı)		Kontrol	10 mM Akrilamid	10 µM D-Carvone+	25 µM D-Carvone+				
	1. tekrar	1,00	1,92	1,51	1,37				
	2. tekrar	1,00	2,11	1,93	1,55				
	3. tekrar	1,00	1,87	1,45	1,37				
ATF4 düzeyi (Kontrolün katı)		Kontrol	10 mM Akrilamid	10 µM D-Carvone+	25 µM D-Carvone+				
	1. tekrar	1,00	1,81	1,19	0,85				
	2. tekrar	1,00	1,38	1,09	0,98				
	3. tekrar	1,00	1,50	0,99	0,85				
BAX düzeyi (Kontrolün katı)		Kontrol	10 mM Akrilamid	10 µM D-Carvone+	25 µM D-Carvone+				
	1. tekrar	1,00	1,76	1,40	0,92				
	2. tekrar	1,00	1,55	1,40	1,07				
	3. tekrar	1,00	1,35	1,03	0,76				
Prokaspaz 3 düzeyi (Kontrolün katı)		Kontrol	10 mM Akrilamid	10 µM D-Carvone+	25 µM D-Carvone+				
	1. tekrar	1,00	1,85	2,32	2,34				
	2. tekrar	1,00	2,09	1,98	1,68				
	3. tekrar	1,00	1,70	1,68	2,12				
Aktif kaspaz 3 düzeyi (10 mM akrilamid uygulanan hücrelerin katı)		Kontrol	10 mM Akrilamid	10 µM D-Carvone+	25 µM D-Carvone+				
	1. tekrar	-	1,00	0,49	0,59				
	2. tekrar	-	1,00	0,49	0,48				
	3. tekrar	-	1,00	0,63	0,78				
LC3B-II düzeyi (Kontrolün katı)		Kontrol	10 mM Akrilamid	10 µM D-Carvone+	25 µM D-Carvone+				
	1. tekrar	1,00	3,63	2,79	1,60				
	2. tekrar	1,00	3,78	3,84	2,70				
	3. tekrar	1,00	3,37	2,89	2,24				

ATF4: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4; **BAX:** BCL-2-ilişkili X proteini **HSP70**: Isı şok proteini 70; **LC3B-II:** Mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3B-II

5. TARTIŞMA

Akrilamid esas olarak poliakrilamid üretiminde kullanılmakla birlikte aynı zamanda gıdalarda Maillard reaksiyonu sonucu da oluşabilir. Bu açıdan hem meslekleri nedeniyle hem de çeşitli gıdalarla insanlar günlük hayatta AA'ya maruz kalabilmektedirler (1). AA'nın insanlarda çeşitli zararlı etkileri gösterilmiş olmakla birlikte vücutta esas metabolize edildiği yer olan karaciğerde de zararlı etkilerinin olduğu bildirilmiştir (2,3). Fare kaynaklı hepatositler olan AML12 hücreleri, hepatositlerde ilaç araştırması ve toksisite çalışmalarında in vitro bir model olarak sıklıkla kullanılmaktadır (4).

D-Carvone esansiyel yağların aktif bir bileşeni olup literatürde antioksidan, anti-inflamatuar, anti-kanser ve anti-nosiseptif etkiler gösterdiği bildirilmektedir (16,17). Literatürde D-carvone'un AA'ya bağlı hepatotoksisite üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Bu çalışmada, AA uygulanan AML-12 hücrelerinde D-carvone'un sitotoksisite, apoptoz, otofaji ve hücresel stresler üzerine etkisi araştırılması amaçlanmıştı.

Çalışmamızda öncelikle D-carvone AML12 hücrelerine tek başına uygulanarak hücre canlılığına etkisi belirlendi. 24 saat süreyle uygulandığında D-carvone'un 250 µM ve üzeri konsantrasyonlarda AML12 hücrelerinde canlılığı anlamlı olarak azalttığını bulduk. Bulgularımız ile benzer olarak Zenginer (57) de 24 saat sonunda 250 µM ve üzeri D-carvone konsantrasyonlarında AML12 hücrelerinde canlılığın azaldığını bildirmiştir.

Literatürde 10 mM AA'nın karaciğer kökenli hepatoma hücrelerinde sitotoksik etkileri gösterilmiş (58-61) olmakla birlikte AML12 hücrelerinde AA'nın etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda ilk kez 10 mM AA'nın AML12 hücrelerinde sitotoksik etkileri olduğunu gösterdik. Aynı zamanda D-carvone 10, 25 ve 50 µM konsantrasyonlarda AML12 hücrelerinde AA'ya bağlı hücre canlılığındaki azalmayı anlamlı olarak arttırdı. Bu bulgumuz ile D-carvone'un AA'ya bağlı hepatotoksisiteyi azalttığı ilk kez gösterilmiştir.

Isı şok proteinlerinin çeşitli stres koşullarına karşı hücrelerdeki üretimi artmaktadır (5). HSP70 de ısı şok protein ailesinin bir üyesi olup literatürde hem karaciğer kökenli HepG2 hücrelerinde (58) hem de karaciğer kökenli olmayan hücrelerde (62,63) AA uygulamasının HSP70 düzeyini arttırdığı bildirilmiştir. Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak AA uygulanan AML12 hücrelerinde HSP70 düzeyi anlamlı olarak artarken, aynı zamanda 25 µM D-carvone uygulanan hücrelerde HSP70 düzeyi AA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak

azaldı. Isı şok yanıtında bu azalma D-carvone'un AA uygulamasına bağlı ER stresi gibi hücresel stresleri azaltmasına bağlı olabilir.

Literatürde AA'nın ER stresini arttırdığı HepG2 hücrelerinde (64), zebra balığı fibroblast hücrelerinde (65) ve insan nöroblastoma hücrelerinde (66) bildirilmiştir. Çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak AA uygulanan AML12 hücrelerinde ER stresi belirteci olan ATF4 düzeylerinin arttığını bulduk. Bununla birlikte çalışmamızda D-carvone 10 ve 25 μM konsantrasyonlarda AA uygulamasına bağlı artışı önledi ve bu bulgumuz D-carvone'un AML12 hücrelerinde AA uygulamasına bağlı ER stresini azalttığını göstermektedir.

Çalışmamızda hücre ölüm yollarından biri olan apoptozun (10) değerlendirilmesi için aktif kaspaz-3 ve BAX düzeylerini ölçtük. Çalışmamızda 10 mM AA uygulanan AML12 hücrelerinde aktif kaspaz 3 ve BAX düzeylerinin arttığını bulduk. Çalışmamızla uyumlu olarak, Chu ve ark. (61) 10 mM AA'nın HepG2 hücrelerinde apoptozu arttırdığını göstermişlerdir. Bununla birlikte D-carvone AA uygulanan AML12 hücrelerinde 10 ve 25 μM konsantrasyonlarda aktif kaspaz 3 düzeyini ve 25 μM konsantrasyonda BAX düzeyini anlamlı olarak azalttı. Bu bulgularımız D-carvone'un AML12 hücrelerinde AA uygulamasına bağlı apoptozu azalttığını göstermektedir.

Karaciğer kökenli hücrelerde 10 mM AA'nın başka bir hücre ölüm yolu olan otofajiyi de arttırdığı bildirilmektedir (58). Çalışmamızda 10 mM AA uygulanan AML12 hücrelerinde LC3B-II düzeylerinin arttığını, birlikte uygulanan D-carvone'un ise 25 μM konsantrasyonda AA uygulanan AML12 hücrelerinde LC3B-II düzeylerini anlamlı olarak azalttığını bulduk. Bulgularımız D-carvone'un AML12 hücrelerinde AA uygulamasına bağlı artan otofajiyi azalttığını göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda, D-carvone 10 mM AA uygulanan AML12 hücrelerinde azalan canlılığı anlamlı olarak arttırken, artan aktif kapaz-3, BAX, LC3B-II, ATF4 ve HSP70 düzeylerini ise anlamlı olarak azalttı. Bu sonuçlarımız D-carvone'un AA uygulanan AML-12 hücrelerinde sitotoksisiteyi, apoptozu, otofajiyi ve hücresel stresleri azalttığını göstermektedir. Bulgularımız ışığında D-carvone'un AA'ya bağlı hücresel hepatotoksisiteyi azaltmada etkili olabileceğini söyleyebiliriz. Bununla birlikte çalışmamız in vitro bir hücre kültürü çalışması olup bu çalışmadan elde edilen verilerin gelecekte gerçekleştirilecek daha kapsamlı çalışmalar ile desteklenmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. J Agric Food Chem. 2003;30;51:4504-26. doi: 10.1021/jf030204+.
2. Mahmood, SAF, Amin KAM, Salih, SFM. Effect of acrylamide on liver and kidneys in albino wistar rats. Int J Curr Microbiol App Sci 2015;4: 434-44. doi:10.13140/RG.2.1.2508.6880
3. Mohammadi AB, Noshad H, Ostadi A, Ghaffari A.R, Nahandi M,Z., Mohammadi A.B. Successful treatment of acute lethal dose of acrylamide poisoning. Iranian Journal of Toxicology 2015;9:1284–6. URL: http://ijt.arakmu.ac.ir/article-1-408-en.html
4. Ezdihar H, Christopher M. Dichloroacetate and trichloroacetate toxicity in aml12 cells: Role of oxidative stress. J Bipchem Molecular Toxıcology 2015;29:11. doi: 10.1002/jbt.21720
5. Chen B, Feder ME, Kang L. Evolution of heat-shock protein expression underlying adaptive responses to environmental stress. Mol Ecol. 2018;27:3040-54. doi: 10.1111/mec.14769
6. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. Annu Rev Biochem, 2005;74:739-89. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134
7. Wortel IMN, van der Meer LT, Kilberg MS, van Leeuwen FN, Kilberg MS, van Leeuwen FN. Surviving stress: Modulation of ATF4-mediated stress responses in normal and malignant cells. Trends Endocrinol Metab. 2017;28:794-806. doi: 10.1016/j.tem.2017.07.003
8. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. Mol Cell. 2003;11:619-33. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00105-9
9. Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Jungreis R, Harding HP, Ron D. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. EMBO J, 2003;22:1180-7. doi: 10.1093/emboj/cdg112
10. Shojaie L, Iorga A, Dara L. Cell death in liver diseases: A rewiew. Int J Mol Sci. 2020;21:9682. doi: 10.3390/ijms21249682
11. Onyinyechukwu U, Zhou D, Nikolaos B, David L, Sachdev SS, Sheng L, et al. Synthetic antibodies inhibit bcl-2-associated x protein (BAX) through blockade of the N-terminal activation site. J Biol Chem 2016;291:89-102. doi: 10.1074/jbc.M115.680918
12. Zakeri ZF, Ahuja HS. Cell death/apoptosis:normal, chemically induced, and teratogenic effect. Mut Res. 1997;369:149-61. doi:10.1016/s0027-5107(97)00181-4

13. Gao W, Wang X, Zhou Y, Wang X, Yu Y. Autophagy, ferroptosis, pyroptosis and necroptosis in tumor immunotherapy. Signal Transduct Target Ther. 2022;20;7:196. doi: 10.1038/s41392-022-01046-3

14. Liu KP, Zhou D, Ouyang DY, Li-Hui Xu LH, Wang Y, Wang LX, et al. LC3B-II deacetylation by histone deacetylase 6 is involved in serum-starvation-induced autophagic degradation. Biochem Biophys Res Commun 2013;29:441:970-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.007

15. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy. Methods Mol Biol. 2008;445:77-88. doi: 10.1007/978-1-59745-157-4_4.

16. Bouyahya A, Mechchate H, Benali T, Ghchim R, Charfi S, Balahbib A, et al. Health benefits and pharmacological properties of carvone. Biomolecules 2021;11:1803. doi: 10.3390/biom11121803

17. Maged E.M, Nancy S.Y. Ameliorative Effect of D-Carvone a gainst Hepatic Ischemia- Reperfusion-Induced Injury in Rats. Life, 2022;12:1502. doi: 10.3390/life12101502

18. Filipović JM, Karan J, Ivelja I, Matavulj M, Stošić M. Acrylamide and potential risk of diabetes mellitus: effects on human population, glucose metabolism and beta-cell toxicity. Int J Mol Sci. 2022;23:6112. doi: 10.3390/ijms23116112

19. Wang B, Qiu W, Yang S, Cao L, Zhu C, Ma j, et al. Acrylamide exposure and oxidative DNA damage, lipid peroxidation, and fasting plasma glucose alteration: association and mediation analyses in chinese urban adults. Diabetes Care. 2020;43:1479-86. doi: 10.2337/dc19-2603

20. Xiong B, Loss RD, Shields D, Pawlik T, Hochreiter R, Zydney AL, et al. Polyacrylamide degradation and its implications in environmental systems. Review article. NPJ Clean Water, 2018;1:17. doi:10.1038/s41545-018-0016-8

21. Ghamdi A, Alenezi F, Algoferi M, Alhawas M, Farga A, Afifi M. A Review on the new trend of acrylamide toxicity. Biomed J Sci Tech Res. 2020;27:20638-44. doi:10.26717/BJSTR.2020.27.004480

22. Adani G, Filippini T, Wise L A, Halldorson T I, Blaha L, Vinceti M. Dietary intake of acrylamide and risk of breast, endometrial, and ovarian cancers: A Systematic rewievand dose-response meta-analysis. Cancer Epidemiol Biomark Prev. 2020;29:1095-1106. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-1628

23. Bin-Jumah M, Abdel-Fattah AFM, Saied EM, El-Seedi HR. Acrylamide-induced peripheral neuropathy:manifestations, mechanisms, and potential treatment modalities. Review Environ Sci Pollut Res Int 2021;28:13031-46. doi: 10.1007/s11356-020-12287-6

24. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Erikson S, Törnqvist M. Acrylamide: A cooking carcinogen? Chem Res Toxicol. 2000;13:517-22. doi: 10.1021/tx9901938

25. LoPachin RM, Ross JF, Lehning EJ. Nerve terminals as the primary site of acrylamide action: a hypothesis. Neurotoxicology. 2002;23:43-59. doi: 10.1016/s0161-813x(01)00074-2

26. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1994;60:389-433.
27. Delia NB. Relevance of dietary exposure to acrylamide formed in heat-processed agri-food products. Cent Eur J Public Health. 2022;30:179-84. doi: 10.21101/cejph.a6779
28. Rifai L, Saleh FA. A Review on acrylamide in food: Occrurrence, toxicity, and mitigation strategies. Int J Toxicol. 2020;39:93-102. doi: 10.1177/1091581820902405
29. Timmermann CAG, Molck SS, Kadawathagedara M, Bjerrgaard AA, Törnqvist M, Brantsaeter AL, et al. Review of dieraty ıntake of acrylamide in humans. Toxics. 2021;9:155. doi: 10.3390/toxics9070155
30. Mottram DS, Wedzicha, BL, Dodson AT. Acrylamide is formed in the Maillarda reaction. Nature, 2002;419:448-9. doi: 10.1038/419448a
31. Wu JC, Merlino G, Fausto N. Establish mentand characterization of differentiated, non transformed hepatocyt ecelllines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. Proc Natl Acad Sci. 1994;91:674-8. doi: 10.1073/pnas.91.2.674
32. Jing FY, Yu-Jie Weng YJ, Zhang YQ. The protective effect or sericin on AML12 cells exposed to oxidative stress damage in a high-glucose environment. Antioxidants. 2022;11:712. doi: 10.3390/antiox11040712
33. Hassoun E, Mettling C. Dichloroacetate and Trichloroacetate Toxicity in AML12 Cells: Role of Oxidative Stress. J Bipchem Molecular Toxıcology. 2015;29:11. doi: 10.1002/jbt.21720
34. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 1998;10:230-1. doi: 10.1176/jnp.10.2.230a
35. Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhuri D.K. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? Life Sciences. 2010;86:377-84. doi: 10.1016/j.lfs.2009.12.015
36. Chen B, Feder M.E, Kang L. Evolution of heat-shock protein expression underlying adaptive responses to environmental stress. Mol Ecol. 2018;27:3040-54. doi: 10.1111/mec.14769
37. Kregel KC. Heat shock proteins: Modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. J Appl Physiol. 2002;92:2177-86. doi: 10.1152/japplphysiol.01267.2001
38. Tukaj S, Sitko K. Heat shock protein 90 (Hsp90) and Hsp70 as potential therapeutic targets in autoimmune skin diseases. Review Biomolecules. 2022;12:1153. doi: 10.3390/biom12081153

39. Takakuwa JE, Nitika, Knighton LE, Truman AW. Oligomerization of Hsp70: current perspectives on regulation and function. Front Mol Biosci. 2019;6:81. doi: 10.3389/fmolb.2019.00081

40. Sharma D, Masison DC. Hsp70 structure, function, regulation and ınfluence on yeast prions. Protein Pept Lett. 2009;16: 571–81. doi: 10.2174/092986609788490230

41. Hertz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and function of the unfolded protein response. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020;21:421-38. doi: 10.1038/s41580-020-0250-z

42. Al-Hetty HRAK, Jabbar AD, Eremin VF, Jabbar AM, Jalil AT, Al-Dulimi AG, et al. The role of endoplasmic reticulum stress in endometriosis. Cell Stress Chaperones. 2023;28:145-50. doi: 10.1007/s12192-023-01323-2

43. Clifton LA, Wacklin-Knecht HP, Ådén J, Mushtaq AU, Sparrman T, Gröbner G. Creation of distinctive Bax lipid complexes at mitochondrial membrane surfaces drives pore formation to initiate apoptosis. Sci Adv. 2023;9:eadg7940. doi: 10.1126/sciadv.adg7940

44. Jaeschkea H, Duana L, Akakpoa J Y, Farhoodb A, Ramachanrana A. The role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. Food Chem Toxicol. 2018;118:709-18. doi: 10.1016/j.fct.2018.06.025

45. Hill R.B, MacKenzie K.R, Harwig M.C. The tail-end is only the beginning: NMR study reveals a membrane-bound state of BCL-XL. Comment J Mol Biol. 2015;3:427(13):2257-61. doi: 10.1016/j.jmb.2015.04.005

46. Mark S D Arcy. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biol Int. 2019;43:582-92. doi: 10.1002/cbin.11137

47. Fu X, Liu J, Yan X, DiSanto M.E, Zhang X. Heat Shock Protein 70 and 90 Family in Prostate Cancer. Life (Basel). 2022;12:1489. doi: 10.3390/life12101489

48. Shojaie L, Iorga A, Dara L. Cell Death in Liver Diseases: A Rewiew. Int J Mol Sci. 2020;21:9682. doi: 10.3390/ijms21249682

49. Jaeschkea H, Duana L, Akakpoa J Y, Farhoodb A, Ramachanrana A. The Role of Apoptosis in Acetaminophen Hepatotoxicity. Food Chem Toxicol. 2018;118:709-18. doi: 10.1016/j.fct.2018.06.025

50. Rakesh R, PriyaDharshini LC, Sakthivel KM, Rasmi RR. Role and regulation of autophagy in cancer. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2022:1868;166400. doi: 10.1016/j.bbadis.2022.166400

51. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy:cellular and molecular mechanisms. J Pathol. 2010;221:3-12. doi: 10.1002/path.2697

52. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65:55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4

53. Ahmadian S, Barar J, Saei A.A, Fakhree MAA, Omidi Y. Cellular toxicity of nanogenomedicine in MCF-7 cell line: MTT assay. J Vis Exp. 2009;3:1191. doi: 10.3791/1191

54. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265–275. doi:10.1016/S0021-9258(19)52451-6

55. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0

56. Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 2012;9:671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089

57. Diler Zenginer B. D-Carvone'un palmitat ile oluşturulan hücresel hepatotoksisite üzerine etkisi. [Yüksek Lisans Tezi] Trakya Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü; 2023.

58. 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 Chemical Toxicol. 2022;45:1536-43. doi: 10.1080/01480545.2020.1846548

59. Cao J, Liu Y, Jia L, Jiang LP, Geng CG, Yao XF, et al. Curcumin attenuates acrylamide-induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells by ROS scavenging. J Agric Food Chem. 2008;56:12059–63. doi: 10.1021/jf8026827

60. Zhang X, Cao J, Jiang L, Geng C, Zhong L. Protective effect of hydroxytyrosol against acrylamide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells. Mutat Res. 2009;664:64–8. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.02.013

61. Chu Q, 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;7:14837. doi: 10.1038/s41598-017-13147-z

62. Saito K, Dai Y, and Ohtsuka, K. Enhanced expression of heat shock proteins in gradually dying cells and their release from necrotically dead cells. Exp Cell Res, 2005;310:229–36. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.07.014

63. Sumizawa T, and Igisu H. Release of heat shock proteins from human neuroblastoma cells exposed to acrylamide. J Toxicol Sci. 2008; 33:117-22.

doi: 10.2131/jts.33.117.

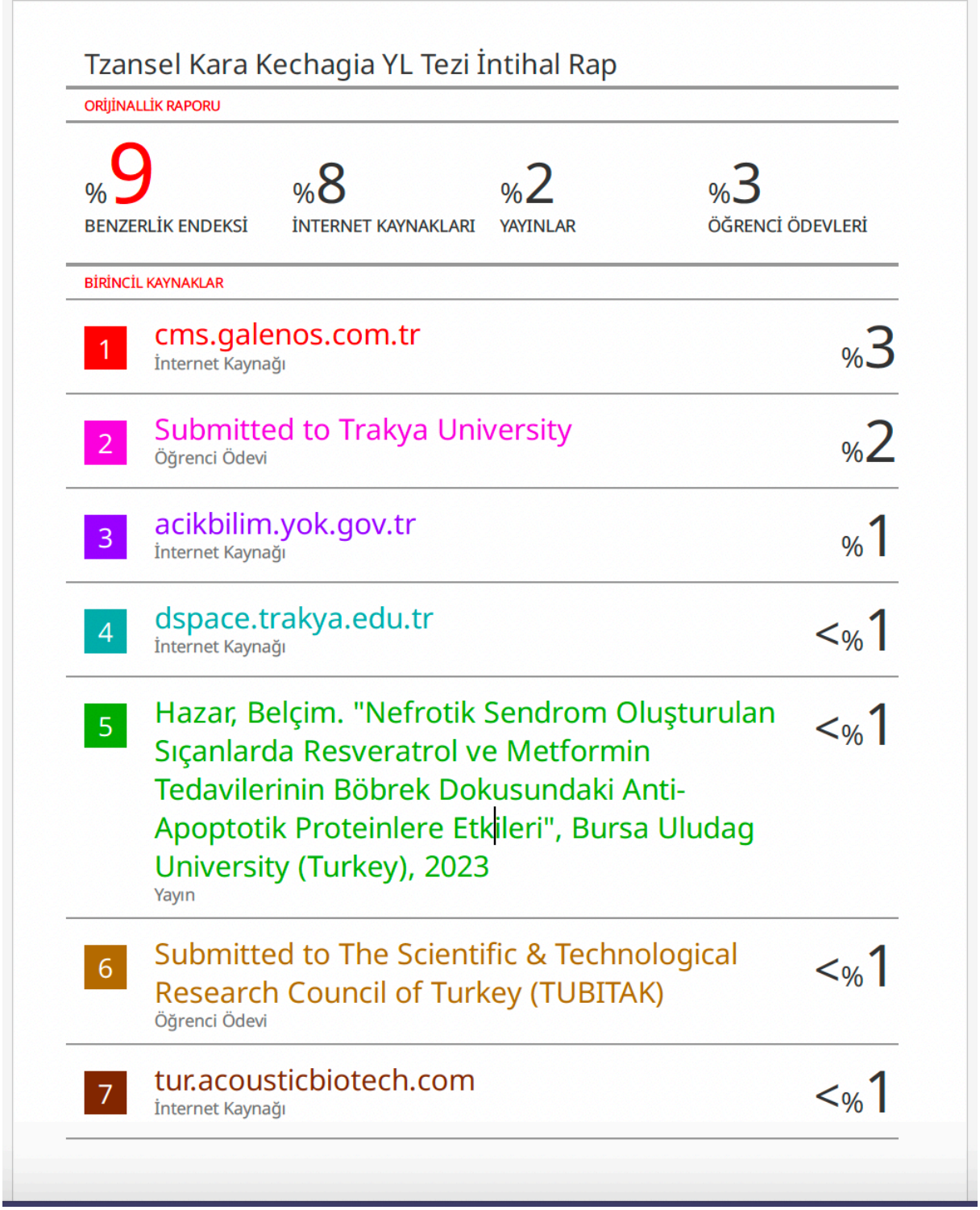
64. Karabas T.Kafein akrilamid uygulanan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde protein oksidasyonu ve endoplazmik retikulum stresine etkisi. [Yüksek Lisans Tezi] Trakya Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü; 2020.

65. Komoike Y, Matsuoka M. In vitro and in vivo studies of oxidative stress responses against acrylamide toxicity in zebrafish. J Hazard Mater. 2019;365:430–9. doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.11.023

66. Komoike Y, Matsuoka M. Endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis by acrylamide exposure. Toxicol Appl Pharmacol. 2016;310:68-77. doi: 10.1016/j.taap.2016.09.005

ÖZGEÇMİŞ

BENZERLİK RAPORU



Tzansel Kara Kechagia YL Tezi İntihal Rap

ORİJİNALLİK RAPORU

%9	%8	%2	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	cms.galenos.com.tr İnternet Kaynağı	%3
2	Submitted to Trakya University Öğrenci Ödevi	%2
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
4	dspace.trakya.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Hazar, Belçim. "Nefrotik Sendrom Oluşturulan Sıçanlarda Resveratrol ve Metformin Tedavilerinin Böbrek Dokusundaki Anti-Apoptotik Proteinlere Etkileri", Bursa Uludag University (Turkey), 2023 Yayın	<%1
6	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
7	tur.acousticbiotech.com İnternet Kaynağı	<%1