

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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Gülben SAYILAN ÖZGÜN

**KAFEİNİN AKRİLAMİD UYGULANAN İNSAN
KAYNAKLI HEPATOMA HÜCRELERİNDE PROTEİN
OKSİDASYONU VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Tuğçe KARABAŞ

Referans no: 10210495

EDİRNE-2020

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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Gülben SAYILAN ÖZGÜN

**KAFEİNİN AKRİLAMİD UYGULANAN İNSAN
KAYNAKLI HEPATOMA HÜCRELERİNDE PROTEİN
OKSİDASYONU VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Tuğçe KARABAŞ

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2018/266

EDİRNE-2020

TEŞEKKÜR

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

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
AKRİLAMİDİN YAPISI, METABOLİZMASI ve TOKSİSİTESİ.....	3
OKSİDATİF STRES VE PROTEİN OKSİDASYONU.....	5
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ.....	5
ŞAPERONLAR.....	6
KATLANMAMIŞ PROTEİN CEVABI.....	7
KAFEİN.....	9
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	11
BULGULAR.....	18
TARTIŞMA.....	29
SONUÇLAR.....	32
ÖZET.....	34
SUMMARY.....	36
KAYNAKLAR.....	38
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	46
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

AA	: Akrilamid
ATF4	: Transkripsiyon aktive edici faktör 4
CHOP	: C/EBP-homolog protein
ER	: Endoplazmik retikulum
GRP78	: Glukozla ilişkili protein 78 kDa
GSH	: Glutasyon
MTT	: 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür
OS	: Oksidatif stres
PC	: Protein karbonil
PERK	: Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
UPR	: Katlanmamış protein cevabı

GİRİŞ VE AMAÇ

Akrilamid (AA), keşfi 1950'lere dayanan kokusuz, beyaz, kristalize yapıda sentetik bir kimyasaldır (1). Endüstriyel üretimden deneysel araştırmalara kadar birçok alanda çeşitli polimerleri sentezlemek için sıklıkla kullanılmaktadır (2). Kızartma ve fırınlama işlemleri sırasında gıdalardaki asparagin ile indirgenmiş şekerler arasında Maillard reaksiyonu ile AA oluştuğu bildirilmiştir (3). Genellikle kızarmış patates ürünleri, ekmek, bisküvi ve kahve gibi gıda ürünlerinde bulunur (1). Ayrıca AA toksisitesi solunum, su kirliliği ya da cilt teması ile de görülebilmekte (4) ve nörotoksisite, karsinojenite, genotoksisiteye neden olmaktadır (1).

Karaciğer akrilamid metabolizmasında primer organdır. HepG2 hücre hattı, primer hepatositlere benzemektedir. Bu nedenle kimyasallarla indüklenen toksisite modellerinde sıklıkla tercih edilmektedir (5).

AA toksisitesindeki hasar mekanizmalarından birisi oksidatif strestir. AA hücresel redoks durumunu etkileyerek, sitotoksosite yol açan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına neden olabilir (6). AA ile indüklenen toksisite modelinde HepG2 hücrelerindeki intrasellüler ROS düzeyinde artış olduğu bildirilmiştir (7). ROS düzeylerindeki artış, direkt olarak aminoasitlerin veya diğer hücresel komponentlerin oksidasyonu ile oluşan ara ürünler aracılığıyla proteinlerde post-translasyonel modifikasyona yol açar. Protein karbonil (PC), protein oksidasyonu için sık kullanılan belirteçlerden biridir (8).

Endoplazmik retikulum (ER)'da, sekretuar ve transmembran proteinler doğal formlarına katlanır ve aktiviteleri için önemli post-translasyonel modifikasyonlara uğrarlar. Çeşitli uyaranlarla (modifiye proteinlerin birikmesi, yaşlanma, patolojik hastalıklar, oksidatif stres vb.) ER fonksiyonu bozulur ve ER stresi oluşur. ER'de homeostazı yeniden sağlamak, katlanma kapasitesini arttırmak veya protein katlanması engellendiğinde hücre ölümünü

indüklemek için katlanmamış protein cevabı (UPR; unfolded protein response) aktive edilir (9).

Isı şok protein (HSP) 70 ailesi üyesi olan glukozla ilişkili protein 78 (GRP78) bir ER şaperonudur. Fizyolojik koşullarda GRP78, ER membranına yerleşik stres sensörü olarak görev yapar ve membran proteinlerine bağlı iken inaktif şekilde bulunur. ER stresi oluştuğunda GRP78 bu proteinlerden ayrılarak aktif hale geçer ve yanlış katlanan proteinlerin hidrofobik kısımlarına bağlanır. Bu ayrılma, üç ana yoldan oluşan UPR kaskadını başlatır (10).

Stres sensörü olarak görev yapan ER membran proteinlerinden biri olan Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK) ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 α subünitesinin (eIF2 α) fosforilasyonu ile protein translasyonunu inhibe ederek lümende biriken protein miktarını azaltır, diğer yandan transkripsiyon aktive edici faktör 4 (ATF4)'ün transkripsiyonunu uyarır (11). ATF4, C/EBP-homolog proteininin (CHOP) aktivasyonun en önemli indükleyicisidir. Ayrıca, amino asit metabolizması (12) ve oksidasyon/redüksiyon (13) ile ilişkilidir. CHOP'un oksidatif stresi indüklediği ve apoptozda anahtar rol oynadığı bildirilmiştir (14). CHOP'un delesyonunun ER stresiyle ilişkili oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (15).

Kafein, bir metilksantin alkaloiddir, proksidan ve antioksidan özellikler göstermektedir. Kafein; kahve, kakao çekirdekleri, çay yaprakları, kola tohumlarında bulunmaktadır (16). Hepatoprotektif etkileri bulunan kafeinin, oksidatif stresi azalttığı (17) ve karaciğer hastalıklarının ilerlemesini önlediği bildirilmiştir (18).

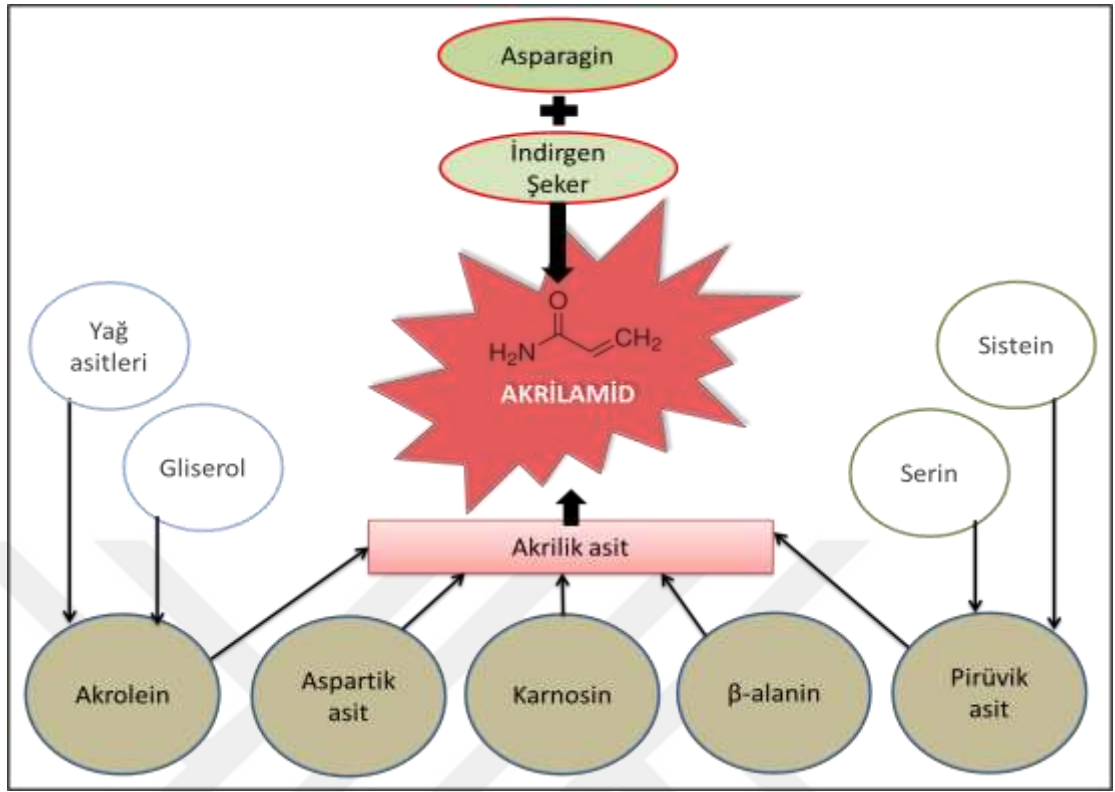
Literatürde kafeinin akrilamid uygulanan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde protein oksidasyonu ve ER stresi üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda akrilamid uygulanan HepG2 hücrelerinde kafeinin protein oksidasyonu ve ER stresi üzerine etkisi ilk kez protein oksidasyonu belirteci olarak PC düzeyi ve ER stres belirteci olarak GRP78, ATF4 ve CHOP protein düzeyleri ölçülerek gösterilmiştir.

GENEL BİLGİLER

AKRİLAMİDİN YAPISI, METABOLİZMASI ve TOKSİSİTESİ

Akrilamid (genel ismi akrilik amid, IUPAC ismi 2-propenamid), beyaz renkli, kokusuz ve vinilmonomer yapıya sahip kristal bir maddedir. AA ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$), polimer veya kopolimer formlarında endüstrinin birçok alanında (içme sularının temizlenmesinde ve endüstriyel atık suların arıtılmasında, besinlerin işlenmesinde, sabun yapımında, boya sanayinde, plastik üretiminde, kâğıt üretiminde, yapıştırıcı madde yapımında, zenginleştirilmiş petrolün geri kazanılmasında, sigara, kozmetik ve madencilikte vb.) kullanılmaktadır (1,19). Monomer formunda toksik iken polimerik formda toksik olmayan AA, moleküler laboratuvarlarda jel kromatografisi ve jel elektroforezinde yaygın olarak kullanılmaktadır (20,21).

Akrilamid, 120°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda gıdalardaki indirgen şekerlerin karbonil grubu ile çoğunlukla serbest asparagin aminoasidinin amino grubu arasında meydana gelen Maillard reaksiyonunun ana ürünüdür (22). Farklı başlangıç molekülleriyle de dolaylı olarak akrilamid oluşmaktadır (Şekil 1). Asparagin aminoasidinin enzimatik dekarboksilasyonu ile açığa çıkan 3-aminopropiyonamidin deaminasyonu ile, gliserolün dehidrasyonu ile oluşan akroleinin oksidasyonu (23), serin aminoasidinin dehidrasyonu ve sistein aminoasidinin hidrojen sülfid kaybı ile oluşan pirüvik asidin indirgenmesiyle (24), karnosin, aspartik asit, β -alanin ve L-argininin termal bozunmasıyla akrilik asit oluşmakta ve ortamdaki amonyak kaynakları ile reaksiyona girerek akrilamide dönüşmektedir (25).



Şekil 1. Akrilamidin gıdalarda temel oluşum yolları (26)

Akrilamid oluşma oranı, indirgen şekerlerin ve asparagin aminoasidinin oranına, ortamdaki nem miktarına, uygulanan sıcaklık derecesine ve işlemin uygulanma süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (27).

Akrilamid iki yolla metabolize edilir. Akrilamid Glutasyon-S-Transferaz aracılığıyla glutasyon (GSH) ile direkt konjuge edilerek ya da sitokrom P450 CYP2E1 aracılığıyla glisidamid olarak isimlendirilen genotoksik bir bileşiğe epoksidasyon ve devamında glutasyon ile konjugasyona uğrayarak metabolize edilir (28). Akrilamid ve glisidamid hızlı bir şekilde merkaptürik asit metabolitlerine dönüşerek idrarla atılır (29).

Akrilamid, 1994 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından “Olası kanserojen madde” olarak sınıflandırılmıştır. 2002 yılında *Toksisite, Ekotoksisite ve Çevre Bilimsel Komitesi* toksik (nörotoksisite, genotoksisite, kanserojenlik, üreme ve gelişim toksisitesi) özelliklerinden dolayı AA’nın insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olduğunu bildirmiştir (2,30). Rawi ve ark. sıçanlara 28 gün 15 mg/kg dozunda AA verildiğinde karaciğer dokusunda Kupffer hücre çoğalması, lökosit infiltrasyonu, hepatosit dejenerasyonu, apoptoz ve vakuolleşmeler saptamıştır (31).

OKSİDATİF STRES VE PROTEİN OKSİDASYONU

Serbest radikaller; genel olarak kovalent bağlı bir molekülün ortak elektronlarından bir tanesini kaybetmesi, radikal olmayan bir molekül ya da atomun tek bir elektron kaybetmesi veya kazanmasıyla oluşmaktadırlar (32). Serbest radikaller; oksijen, azot ve kükürt olmak üzere üç temel elementten oluşmakta ve reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri, reaktif sülfür türleri olarak adlandırılmaktadırlar. En önemli radikaller süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, hidroksil ve peroksit radikalidir (33).

Antioksidan mekanizmalar, hücreleri serbest radikallerden korumak için redoks dengesini devamlı olarak sürdürmektedir. Antioksidan savunma mekanizmaları ve ROS arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulması durumu oksidatif stres (OS) olarak adlandırılmaktadır. Bu dengesizlik sonucu, hücresel stres ve hasar meydana gelmektedir (34). OS'nin Parkinson, Alzheimer, Huntington, enzimopati, immün sistem bozuklukları, diyabet, kardiyovasküler bozukluklar, kanser ve toksik karaciğer hastalıklarına etkisi bulunmaktadır (35).

ROS, fizyolojik şartlarda hücresel metabolizmanın yan ürünü olarak düşük konsantrasyonda üretilmektedir (13) ve dengeyi bozmadıkları sürece sinyal iletimi, düzenleme ve patojenlerle savunmada görev alırlar. ROS, hücrenin antioksidan sistemleri tarafından detoksifiye edilerek hücredeki lipidler, karbonhidratlar, proteinler ve nükleik asitlerde oluşabilecek oksidatif hasarı ortadan kaldırmaktadır (34).

ROS düzeylerindeki artış, direkt olarak aminoasitlerin veya diğer hücresel komponentlerin oksidasyonu ile proteinlerde post-translasyonel modifikasyonlara yol açar. Bu modifikasyonlardan biri de protein karbonilasyonu olarak bilinen proteinlere aktif karbonil gruplarının eklenmesidir ve protein oksidasyonu ölçümü için en sık kullanılan belirteçlerden biridir (8). Proteinlerin karbonillenmesi geri dönüşümsüz bir oksidatif hasardır ve sıklıkla protein fonksiyon kaybına yol açar, bu da hastalık kaynaklı protein fonksiyon bozukluğunun ve ciddi oksidatif hasarın yaygın bir göstergesidir. Orta derecede karbonillenmiş proteinler proteazomal sistem tarafından yıkılırken, ağır karbonillenmiş proteinler, yıkıma dirençli olan ve hasarlı veya katlanmamış proteinler olarak biriken yüksek moleküler ağırlıklı agregatlar oluşturma eğilimindedir (36).

ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

Endoplazmik Retikulum; yassılaştırmış kesecikler, dallı tübüller, sisternal membran ağından oluşan ve tüm ökaryotik hücrelerde bulunan bir organeldir. Bu organel, düz

(granülsüz) ve kaba (granüllü) ER olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Düz ER'nin başlıca görevleri; ilaç metabolizması, ER'nin trigliserid ve kolesterol biyosentezi, hücre içi kalsiyum homeostazı ve sekresyonudur (37). Kaba ER ise, polipeptidlerin sentezlenmesi, doğru katlanması ve post-translasyonel modifikasyonundan sonra fonksiyonel özellik kazanmasından sorumludur (38).

Fizyolojik koşullarda, katlanmamış polipeptidlerin oluşum hızı ile ER'nin katlama kapasitesi arasında bir homeostatik denge bulunmaktadır (39). Viral enfeksiyon, oksidatif stres, artan sıcaklık, enerjinin (ATP) azalması, hipoksi, glikoz yoksunluğu, kalsiyum depolarının tükenmesi, hücre döngüsü, gelişim süreci, şaperon eksikliği, protein sentezi artışı, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikimi gibi faktörler ER için önemli stres uyarımlarıdır. Stres uyarımı varlığında ER'deki homeostatik denge bozulur ve yanlış katlanmış proteinler birikir. Bu durum ER stresi olarak adlandırılmaktadır (40).

Lenfositler, asiner hücreler, pankreas beta hücreleri ve hepatositler gibi ER organeli bakımından zengin ve protein sentezinden sorumlu hücrelerde fizyolojik adaptif cevaplar özel bir öneme sahiptir. ER stresi, translasyon veya yanlış katlanmış protein miktarı arttığında apoptotik yolların aktivasyonu ile sonuçlanan patolojik bir yanıt oluşturmaktadır (41). Bu patolojik yanıtın karaciğer, böbrek ve nöronal defektler ile birlikte akut hastalıklarla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (42).

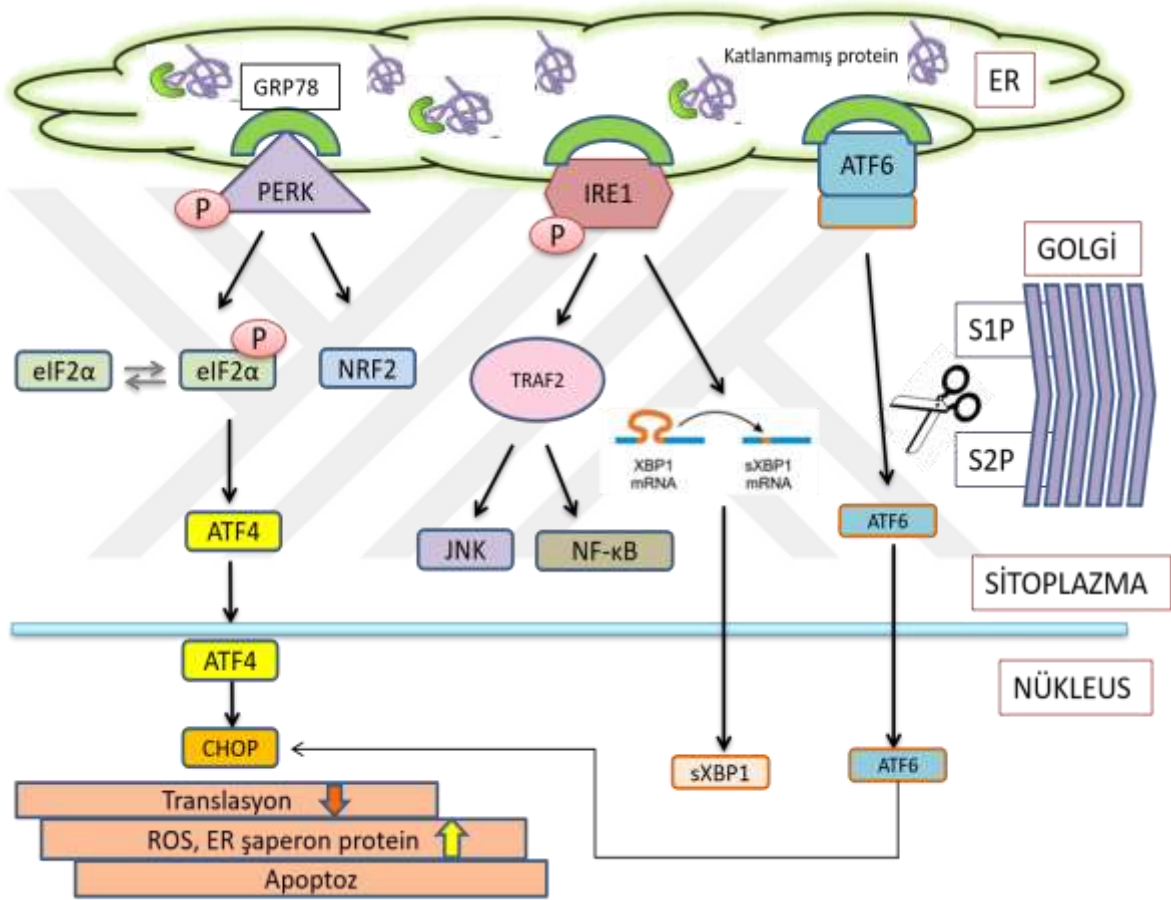
Şaperonlar

Tüm memeli hücrelerinde bulunur. Proteinlerin katlanma katalizörleri olarak bilinirler. Şaperonlar, proteinlere tersiyer yapı kazandırmaz ancak yeni sentezlenmiş proteinlerin ara maddeler ile etkileşimini önleyerek doğru katlanmasına aracılık ederler. Ayrıca yüksek konsantrasyonda ROS maruziyeti, zehirlenme, ani sıcaklık değişimleri gibi stres oluşturabilecek şartlar altında denatüre olmuş proteinlerin yeniden katlanmasına yardımcı olurlar (43).

Isı şok proteinleri, hücresel strese karşı ilk savunma hattı ve moleküler şaperonlardır. Bu şaperonlardan bazıları: Isı şok protein 70 (HSP70- Heat shock protein 70 kDa) ailesi üyesi olan GRP78/BiP, ısı şok protein 90 ailesi üyesi olan glukozla ilişkili protein 94, glikoprotein ilişkili kalretikulin ve kalneksindir (44). GRP78, HSPA5 gen ürünü olan ve yaygın kullanılan bir ER stres belirtecidir (45). GRP78, HSP70 ailesinin diğer üyeleri gibi polipeptitlerle spontane olarak etkileşime girmeyen bir ATP'azdır ve ER lümeninde en çok bulunan şaperondur. GRP78, ER dışında nükleus ve mitokondride bulunmaktadır (46).

Katlanmamış Protein Cevabı

ER’de bir uyaran ile stres oluştuğunda, ER içinde transmembran reseptörlere bağlı olan intralüminal şaperon GRP78, protein katlanmasına yardımcı olmak için stres sensör proteinlerinden ayrılarak aktif hale geçer ve yanlış katlanan proteinlerin hidrofobik kısımlarına bağlanır. Bu ayrılma ile ER’de katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak isimlendirilen bir kaskad başlar (10) (Şekil 2).



Şekil 2. Katlanmamış protein cevabı (UPR) sinyal yolları (47)

↓: Azalma ↑: Artma

UPR’de ilk adım ER’de transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde homeostazı yeniden sağlamak, protein sentezini yavaşlatmak, şaperon sentezini ve katlanma kapasitesini arttırmaktır. Bu adım başarısız olursa, yanlış katlanan proteinler ubiquitinlenir ve 26S proteozomları tarafından yıkılmak üzere ER ilişkili protein degradasyon (ERAD-ER Associated Degredation) proteini ile sitozole aktarılır (48). Hücre ilk iki adım ile homeostatik dengeyi geri kazanamazsa çevre dokuya zarar vermemesi için apoptoza gider (49).

Katlanmamış protein cevabını başlatan N terminali ER lümeninde, C terminali sitozolde bulunan üç önemli transmembran stres sensör proteini bulunmaktadır. Bunlar; Protein Kinaz RNA Benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz (PERK), İnositol Aracılı Transmembran Endonükleaz-1, Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü-6 (ATF6)'dır (50).

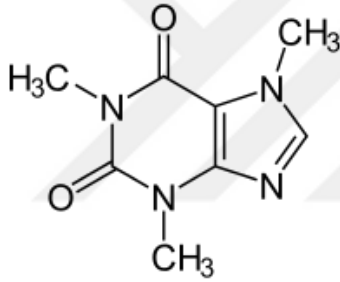
ER membranına bağlı bir serin treonin kinaz olan PERK, GRP78'in ayrılmasıyla otofosforilasyona ve dimerizasyona uğrayarak aktif hale gelir. PERK' in temel görevi; ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 α subünitesinin fosforilasyonu ile protein translasyonunu inhibe etmek ve ER'nin yükünü azaltmaktır. PERK, cAMP yanıt elemanı bağlayıcı transkripsiyon faktörlerinin bir üyesi olan ATF4'ün transkripsiyonunu artırır. Sentezi artan ATF4; amino asit taşıyıcıları, şaperonlar ve CHOP gibi birçok genin ekspresyonunu indükler (51). ATF4 ayrıca antioksidan cevap geliştirilmesi ve mitokondri ilişkili kalsiyum seviyelerinin düzenlenmesi için redoks reaksiyonlarını düzenlemektedir (13). Katlanmamış protein cevabının her iki kolunda da (Protein Kinaz RNA Benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz, Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü-6) preapoptotik aşamada aktive olabilen CHOP, primer olarak PERK yolundan ATF4 aracılığıyla indüklenir. Endoplazmik retikulum oksidaz 1 α proteini, CHOP varlığında aktive olur ve endoplazmik retikulum oksidaz 1 α proteini, inositol 1,4,5-trifosfat reseptör aracılı bir mekanizma yolu ile kalsiyumun ER'den sitozole geçişini artırarak kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II'yi aktive eder. Aktivite kazanan kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II, NADPH oksidaz 2'yi indükleyerek OS oluşturur (52). ER, CHOP sentezlendiğinde sitokin ekspresyonunu güçlendirerek de ROS oluşumunu artırır (53). ER stresi ile ilişkili CHOP'a bağlı oksidatif stres olduğu ve CHOP'un delesyonunun apoptozu ve ROS birikimini engellendiği bildirilmiştir (15). ATF4 tarafından indüklenen bir diğer gen olan GADD34 (Büyümenin durdurulması ve DNA hasarına bağlı protein) fosfataz 1'e bağlanarak eIF2 α 'yı defosforile eder ve böylece protein translasyonunun sürdürülmesini sağlayan bir negatif feedback mekanizması oluşturur (51).

ER strese bağlı başlatılan apoptozda üç ana yol bilinmektedir. Bunlar CHOP'un transkripsiyonel olarak uyarılması, c-Jun NH2-terminal kinaz yolağının aktifleşmesi ve kaspaz-12 aktivasyonudur (47). CHOP, ER stresine bağlı olarak gelişen apoptozda önemli bir proapoptotik gendir (45). İndüklenen CHOP; B lenfoma hücresi-2 (Bcl-2), nöronal hücre ölümü ile indüklenebilir protein kinaz, büyümenin durdurulması ve DNA hasarına bağlı protein gibi birçok pro ve antiapoptotik genleri düzenlemektedir (11). CHOP, nöronal hücre ölümü ile indüklenebilir protein kinaz geninin promotörüne doğrudan bağlanarak

ekspresyonunu düzenler, bu bağlanma sitoprotektif Akt aktivasyonunu inhibe ederek apoptoza neden olur. B lenfoma hücresi-2 proteinlerin aktive edilmesi mitokondriyal depolarizasyona neden olan kalpain aktivasyonunu ve ROS'u arttırmaktadır Ayrıca c-Jun NH2-terminal kinaz ile birlikte apoptozu modüle eden kaspaz 4 aktivasyonunu da arttırmaktadır (54).

KAFEİN

Kafein (1,3,7 trimetilksantin), kakao çekirdekleri, kola tohumları kahve ve çay yaprakları gibi altmıştan fazla bitki türünde doğal olarak bulunan bir alkaloiddir (Şekil 3). Antioksidan ve proksidan özellik göstermektedir (16,55). 1820 yılında kimyasal izolasyonundan sonra dünyada ağrı kesici ve çeşitli reçeteli-reçetesiz satılan ilaçlarda terapötik olarak en sık kullanılan etken maddedir (56).



Şekil 3. Kafein molekülünün yapısı (57)

Fizyolojik ve farmakolojik etkileri nedeniyle popüler olan kafein apne, baş ağrısı, uykusuzluk için planlanan tedavilerde günümüzde kullanılmaktadır (58). Hepatoprotektif etkileri bulunan kafeinin (18) oksidatif stresi azalttığı (17) ve karaciğer hastalıklarının ilerlemesini önlediği ve karaciğeri yağlanmaya karşı koruduğu bildirilmiştir (59).

Yarı ömrü yaklaşık 4 saat olan kafein oral olarak alındıktan sonra gastrointestinal sistemden ortalama 45 dakika sonra tamamen emilmekte, en yüksek plazma konsantrasyonuna ise 30-120 dakika sonra ulaşmaktadır (60). Ayrıca yarı ömür, hamilelik, sigara kullanımı, karaciğer yetmezliği, emilim ve maksimum konsantrasyona ulaşım süreleri gibi metabolik farklılıklar ve ekzojen faktörlere bağlı olarak da değişim göstermektedir

Karaciğer, kafein metabolizmasının öncü görevini hepatik mikrozomal enzim sistemindeki sitokrom P450 1A2 (CYP1A2) ile yerine getirmektedir. Bu enzim, kafein klirensinin % 90-95'ini oluşturur (61).

Kafein; adenosin reseptörlerinin antagonizması, hücre içi kalsiyum mobilizasyonu ve fosfodiesterazların inhibisyonu olmak üzere hücre düzeyinde üç etki mekanizmasına sahiptir. ER stresi üzerinde de rol alan hücre içi kalsiyum mobilizasyonunda kafeinin görevi, sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salımını başlatmak ve yeniden alımını inhibe etmektedir (62).



GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (TÜTF-BAEK 2018/266, onay tarihi:17.09.2018) (Ek-1).

Kullanılan kimyasallar ve temin edilen firmalar aşağıdaki listede verilmiştir.

Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Akrilamid (Merck)

Amonyum persülfat (Sigma Aldrich)

Antibiyotik-Antimikotik (Thermo)

ATF4 antikoru (Abcam)

Bakır (II) sülfat pentahidrat (Sigma)

Bromofenol mavisi (Sigma Aldrich)

CHOP antikoru (Santa Cruz)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma)

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

EMEM-fenol red içermeyen (Wisent)

Etilendiamin tetra asetik asit EDTA (Sigma)

Fetal Sığır Serum (Thermo)

Folin reaktifi (Merck)

Gliserol (Sigma)

Glisin (Sigma)
Glukozla ilişkili protein 78 (GRP78) (Abcam)
Hidroklorik asit (%37) (Merck)
Hidrojen peroksit (Merck)
İsopropanol (Honeywell)
Kafein (Sigma)
Kemilüminesans substrat (Thermo)
Metanol (Merck)
N,N-Metilen bis-akrilamid (Merck)
N,N,N,N-tetrametiletilediamin (TEMED) (Sigma Aldrich)
Poliviniliden diflorid (PVDF) membran (Roche)
Pre-stained Protein Ladder (Thermo)
Protein karbonil antikoru (Abcam)
Sekonder antikorlar (Abcam)
Sığır Serum Albumini (Sigma)
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)
Sodyum hidroksit (Merck)
Sodyum karbonat (Merck)
Sodyum klorür (Sigma)
Sodyum potasyum tartarat (Merck)
Tuzlu fosfat tamponu (PBS) tablet (Thermo)
Tübülin antikoru (Abcam)
Tween 20 (Sigma)
Yağsız süt tozu (Sigma)
2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propanediol (Tris) (Sigma)
2-merkaptotanol (Sigma)
3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür (MTT) (Sigma)
%0.25 Tripsin-EDTA (Thermo)

Deneylerde Kullanılan Plastik ve Cam Laboratuvar Malzemeleri

Balon joje (Isolab)
Beher (Isolab)
Flask 75 cm² (Nest)

Hücre kazıyıcı (Biosorfa)
Mezür (Isolab)
Mikroplaka (96 kuyucuklu) (SPL)
Petri Kabı (90*16 mm) (SPL)
Steril otomatik pipet uçları (20, 200 ve 1000 uL)(Isolab)
Steril santrifüj tüpü (15 ve 50 mL) (Isolab)
Steril serolojik pipetler (5, 10 ve 25 mL) (Isolab)
Steril şırınga filtre (Biosorfa)

Analizlerde Kullanılan Aletler

Biyogüvenlik Kabini (Thermo Scientific Safe 2020)
Çalkalayıcı (Cleaver Scientific CW23)
Dikey Elektroforez sistemi (Cleaver Scientific Omnipage Mini Vertical System)
Distile su cihazı (Nüve)
Elektronik tartı (Sartorius AG)
Faz Kontrast İnvert Mikroskop (Olympus CKX 53)
Güç kaynağı (Cleaver Scientific)
Homojenizatör (Next Advance Bullet Blender Storm)
Isı kontrollü UV-VİS spektrofotometre (Shimadzu UV 1700A)
Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Daihan Scientific WiseStir)
Karbondiyoksitli İnkübatör (Thermo Scientific Forma Steri-cycle 371)
Kemilüminesans Görüntüleme Sistemi (Bio-rad ChemiDoc MP Imaging System)
Mikrobiyolojik inkübatör (Thermo Scientific Heratherm IMC-18)
Mikroplaka okuyucu (Biotek µQuant)
Otomatik pipetler (Eppendorf ve Capp)
pH metre (İnolab)
Santrifüj (Heraeus multifuge 3 S-R)
Sıvı Azot Tankı (Air Liquide GT21)
Su banyosu (GFL 1083)
Vortex (Velp Scientifica)
Western blotting sistemi (Cleaver Scientific Semi Dry Blotter)
-80°C Derin Dondurucu (Heraeus HERAfreeze)

Hücre Kültürü

Bu çalışmada Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda sıvı azot tankında depolanan HepG2 hücreleri kullanıldı. Tüm hücre kültürü çalışmaları, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında bulunan Laminar Airflow biyogüvenlik kabininde ve steril malzemeler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan sıvı azot Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden satın alındı. Deneylerde 15-25. pasajlar arasındaki %80 doluluk oranına sahip hücreler kullanılmıştır. HepG2 hücreleri %10 fetal bovin serum ve %1 antibiyotik-antimikotik içeren EMEM ile 75 cm²'lik flasklarda kültüre edilmiştir. Hücrelerin besiyeri 3 gün arayla değiştirilmiş ve pasajlama 1:4 oranında yapılmıştır. Hücrelerin yaşaması için gerekli ortam, 37°C sıcaklığa sahip, nem ve %5 oranında CO₂ içeren bir inkübatör ile sağlanmıştır.

Akrilamidin Hücre Canlılığına Etkisi

Çalışmamızda 96 kuyucuklu mikropalakalara 10⁴ insan kaynaklı hepatoma hücresi ekildi. Belirlenen konsantrasyonlarda akrilamid (10, 1000 ve 10000 µM) besiyerinde çözülde. Bu mikropalakalara kontrol grubunda yalnızca besiyeri olacak şekilde sırasıyla hazırlanan AA dozları uygulandı. 24 saat boyunca inkübe edilerek hücre canlılığına etkisi, Mossmann ve arkadaşlarının 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür (MTT) hücre canlılığı testi ile gösterildi (63). İnkübasyonun sonunda kuyucuklar boşaltıldı ve her bir kuyucuğa fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS)'nde çözünmüş 5 mg/mL konsantrasyonunda 10 µL MTT ve 100 µL renksiz EMEM konularak 37°C'de nemli ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 4 saat süreyle inkübe edildi. MTT çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra oluşan formazan kristallerinin 200 µL DMSO ve 25 µL Sorenson tamponu (0.1 M glisin, 0.1 M sodyum klorür, pH=10.5) ile çözünmesi sağlandı ve oluşan renk mikropalaka okuyucuda spektrofotometrik olarak 570/630 nm'de ölçüldü (64). Ölçülen absorbanslar kontrol grubunun ortalamasına bölündü ve elde edilen sonuçlar aynı plakadaki kontrol grubunun yüzdesi olarak verildi.

Akrilamid ile Eş Zamanlı Uygulanan Kafeinin Hücre Canlılığına Etkisi

HepG2 hücrelerinde akrilamid ile eş zamanlı uygulanan kafeinin hücre canlılığına etkisi yukarıda anlatıldığı şekilde aynı sayıda hücre ve aynı yöntem ile gösterildi (63,64). Kafein, 10000 µM AA içeren besiyerinde çözülde ve hücreler 10, 50 ve 200 µM

konsantrasyonda kafein ile 24 saat süreyle inkübe edildi. Kontrol grubuna yalnızca besiyeri, akrilamid grubuna sadece AA uygulandı.

Hücre Homojenizasyonu

Hücrelere yukarıda bahsedilen şekilde deneysel prosedür uygulandı. Uygulamadan 24 saat sonra hücreler soğuk PBS ile yıkandı ve 10 mM Tris (pH=8), 50 mM EDTA, %1 SDS (w/v) içeren 90°C'ye ısıtılmış sıcak liziz tamponu ile kazındı. Numuneler, 90°C'de 10 dakika inkübasyon sonrası insülin enjektöründen geçirilerek homojenize edildi. Homojenatlar 2000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlar total protein tayini ve jel elektroforezinde kullanılmak üzere porsiyonlandı.

Total Protein Ölçümü

Total protein ölçümü, Lowry ve ark.'nın (65) metoduna göre yapıldı. Bu metodun prensibi, alkali ortamda bakır iyonu (Cu^{2+}) peptid bağları ile bir kompleks oluşturur ve bakır iyonunun yükü +1'e indirgenirken proteinlerin yan zincirinde yer alan tirozin, triptofan ve sistein aminoasitleri yükseltgenir. İndirgenmiş bakır iyonu ve açığa çıkan kompleks, Folin-Ciocalteu reaktifiyle reaksiyon vererek yoğun mavi bir renk oluşturur (66). Oluşan rengin şiddeti 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Çalışmamızda homojenat ile eşit hacimde alkali bakır (%2 Na_2CO_3 , 1M NaOH, %0.16 Na-K tartarat, %4 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) iyice karıştırılıp oda koşullarında 10 dakika inkübe edildi. Total hacmin 2 katı hacimde folin reaktifi eklenerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika daha inkübe edildi. Sürenin sonunda 660 nm dalga boyunda absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel (SDS PAGE) Elektroforez Yöntemi

Yukarıda açıklanan şekilde elde edilen süpernatantlar kullanıldı, ayrıca ER stresi indükleyicisi olan tunikamisin 12 μM konsantrasyonda 24 saat süreyle uygulanarak elde edilen süpernatant ER stresin pozitif kontrolü olarak kullanıldı.

Elektroforez, Laemmli ve ark. (20) metoduna göre yapıldı. Yükleme jeli %4'lük, ayırma jeli %8'lik olacak şekilde hazırlandı. GRP78, CHOP, ATF4 protein düzeylerinin ölçümünde her bir numune için 20 μg protein elektroforez jeline yüklendi.

Protein karbonil düzeylerinin ölçümünde, Reznick ve Packer tarafından geliştirilen metod kullanıldı. Bu yöntem protein yapısında bulunan karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin ile oluşturdukları dinitrofenilhidrazonların oluşturduğu rengin şiddetinin 370 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanır (67). Homojenatlar, 21 µL %12 (w/v) SDS ve 42 µL 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) çözeltisi (trifloroasetik asit ile çözüldü) ile iyice karıştırıldı. 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Sürenin sonunda 36 µL nötralizasyon çözeltisiyle reaksiyon durduruldu. PC düzeylerinin ölçümü için 5 µg protein elektroforez jeline yüklendi

Western Blot Yöntemi

Tüm proteinler için elektroforez tamamlandıktan sonra proteinler jelden yarı-ıslak western blot sistemi kullanılarak PVDF membrana aktarıldı. Western blot cihazına sırasıyla aktarım tamponu ile ıslatılmış whatmann kağıtları, 0.2 µm PVDF membran, jel ve tekrar whatmann kağıtları yerleştirildi. 1 saatlik aktarım işleminin sonunda membranlar, %0.1 tween 20 içeren tris tamponlu tuzlu su (TBST, pH=7.5) ile hazırlanan yağsız süt tozunda (%5, w/v) oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Bloklamadan sonra membranlar primer antikorlar (CHOP; 1:200, ATF4; 1:2000, PC; 1:5000) ile gece boyunca +4 °C’de, devamında sekonder antikorlar ile (CHOP için yabancu peroksidaz enzimi (HRP) keçi anti-fare 1:10000, ATF4 ve PC için HRP keçi anti-tavşan 1:10000) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Antikorlar ile muamelelerden sonra membranlar 5 kez 5’er dakika TBST ile yıkandı.

Western blot membranlarının kemilüminesans görüntülenmesi için Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TUTAGEM)’nden hizmet satın alındı. Protein bantlarının görüntülenmesinde HRP içeren kemilüminesans substrat kullanıldı. TUTAGEM’de bulunan ve elektrokemilüminesans prensibiyle çalışan cihazda membranlarda oluşan bantlar görüntüledi. Elde edilen protein bantlarına ait yoğunluklar Image-J programı kullanılarak hesaplandı (68). Aynı gün membranlara stripping yapıldı. TBST tamponunda hazırlanan yağsız süt tozu (%5, w/v) ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca membranlar tekrar bloklandı. Bloklamadan sonra membranlar, GRP78 antikor (1:10000) ve yükleme kontrolü olarak kullandığımız alfa-tübül primer antikor (1:10000) ile 1 gece boyunca +4°C’de inkübe edildi. Primer antikorlar ile uyumlu sekonder antikor uygulama ve görüntüleme aşamaları yukarıdaki prosedüre uyarak aynı şekilde gerçekleştirildi. Görüntülemekten elde edilen kontrol ve numunelere ait bant yoğunlukları tübül protein düzeyine oranlanarak aynı deneyde bulunan kontrolün katı olarak

verildi (69,70). Deneysel prosedür ve ölçümler en az 3 kez tekrarlanarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

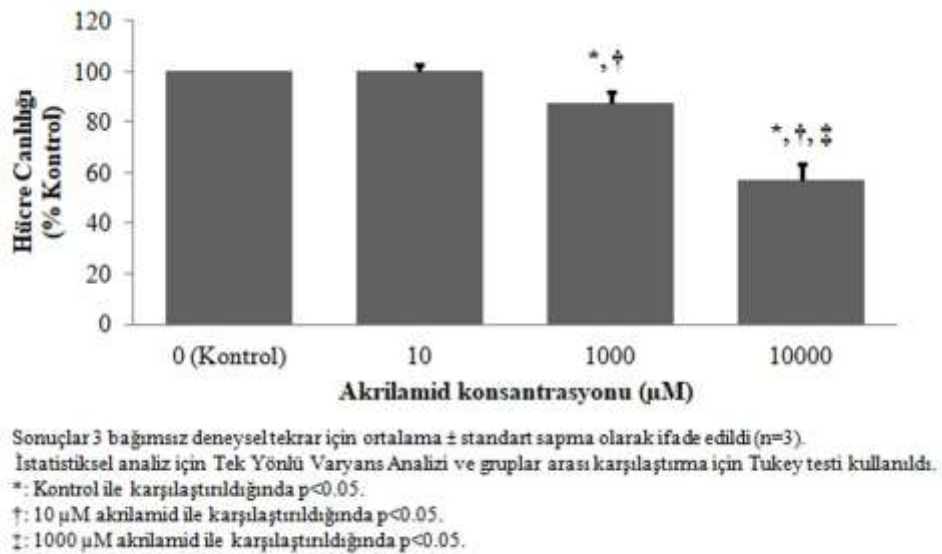
İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

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



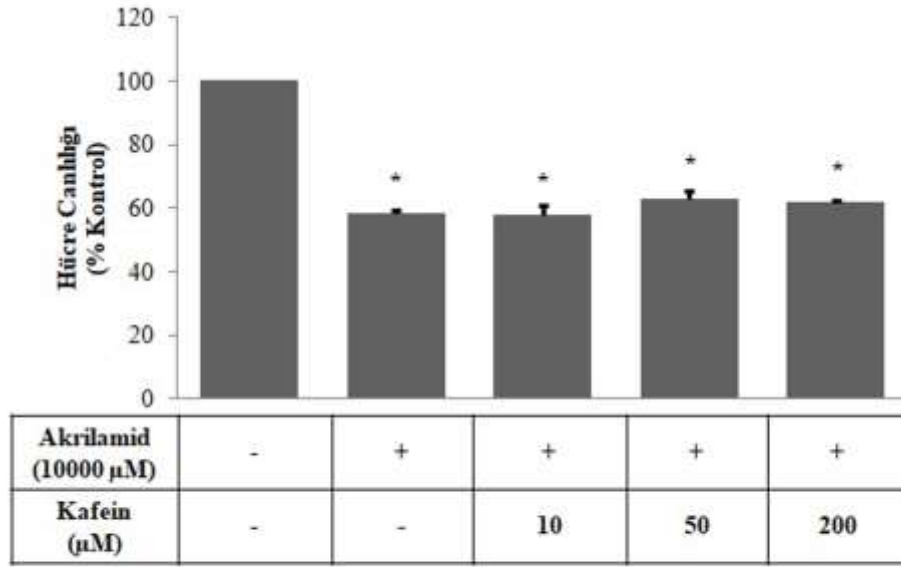
BULGULAR

Geniş konsantrasyon aralığında 24 saat süreyle uygulanan AA'nın HepG2 hücreleri üzerinde hücre canlılığına etkisi Şekil 4'te görülmektedir. Hücre canlılığı; kontrol grubunda 100.00 ± 0.00 , 10 μM AA uygulanan hücrelerde 100.28 ± 2.26 , 1000 μM AA uygulanan hücrelerde 87.67 ± 4.65 , 10000 μM AA uygulanan hücrelerde 57.13 ± 6.61 bulundu. 10 μM AA hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak değiştirmede ($p > 0.05$). 1000 μM AA hücre canlılığını, kontrole ve 10 μM AA uygulanan hücrelere göre anlamlı oranda azalttı (her ikisi için $p < 0.05$). 10000 μM AA; kontrol, 10 μM ve 1000 μM AA uygulanan hücrelere göre hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı (tümü için $p < 0.05$).



Şekil 4. Akrilamidin hücre canlılığına etkisi

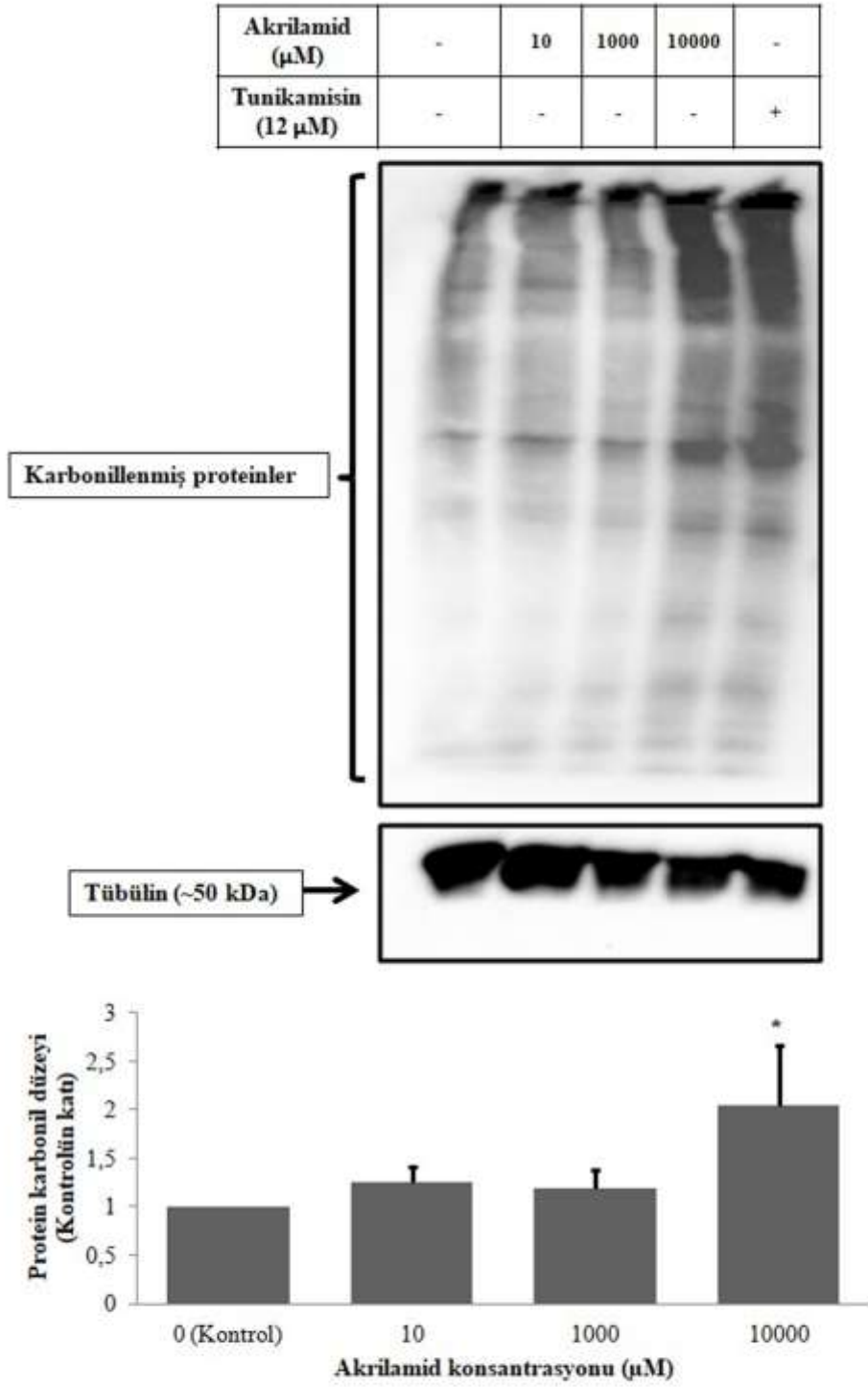
Kafeinin HepG2 hücrelerinde 10000 μM AA ile toksisite oluşturulmuş modelde hücre canlılığına etkisi Şekil 5'te gösterilmiştir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreli uygulama sonrası hücre canlılıkları; kontrol grubunda 100.00 ± 0.00 , yalnızca 10000 μM AA uygulanan hücrelerde 58.10 ± 1.21 bulunurken, 10000 μM AA ile birlikte 10 μM kafein uygulanan hücrelerde 58.03 ± 2.88 , 50 μM kafein uygulanan hücrelerde 62.94 ± 2.69 , 200 μM kafein uygulanan hücrelerde 61.90 ± 0.72 olarak bulundu. 10, 50 ve 200 μM kafein tedavisi 10000 μM AA uygulanan hücrelerde hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmede (tümü için $p > 0.05$).



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

Şekil 5. Kafeinin akrilamid ile oluşturulan toksisitede hücre canlılığına etkisi

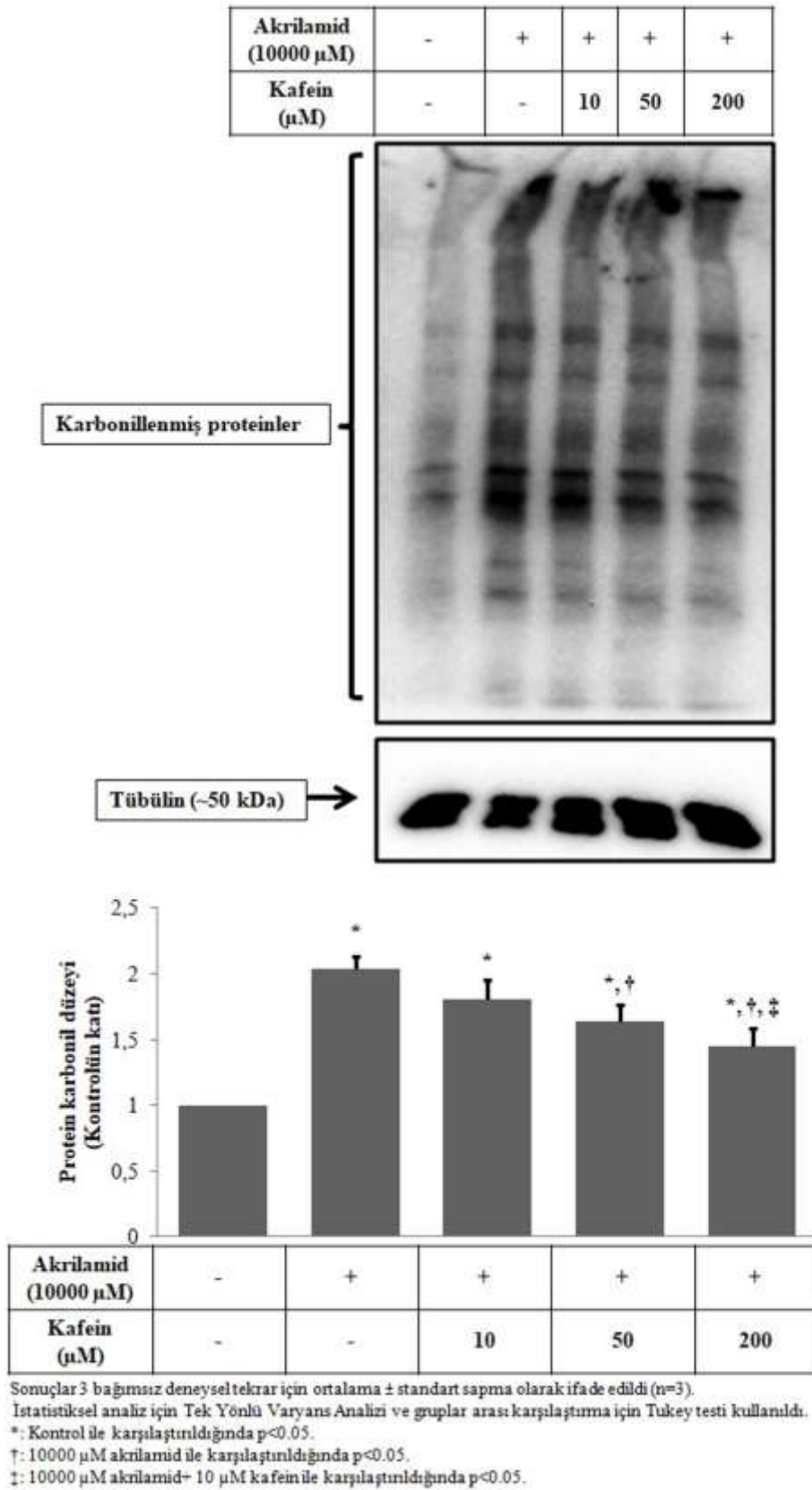
AA konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerinde PC düzeylerine etkisi Şekil 6'da gösterilmiştir. AA'nın HepG2 hücrelerine 24 saat süre ile uygulama sonrası PC düzeyleri için sonuçlar kontrol grubunun ortalamasına bölünerek kontrolün katı olarak verildi. PC düzeyleri 10 μM AA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.26 ± 0.15 katı, 1000 μM AA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.18 ± 0.20 katı, 10000 μM AA uygulanan hücrelerde ise kontrolün 2.04 ± 0.62 katı bulundu. PC düzeyleri 10 ve 1000 μM AA uygulanan hücrelerde kontrole göre değişmedi (her ikisi için $p > 0.05$). 10000 μM AA uygulanan hücrelerde ise yalnızca kontrol grubuna göre PC düzeylerinde anlamlı olarak artış görüldü (her ikisi için $p < 0.05$).



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

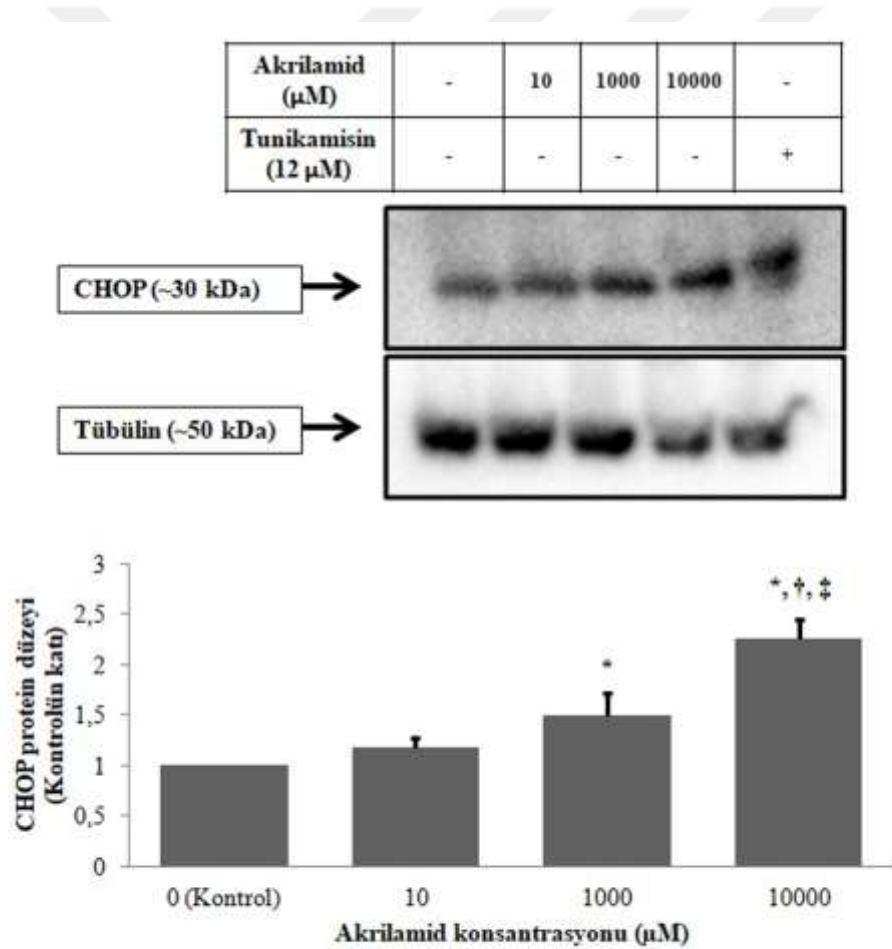
Şekil 6. Akrilamidin protein karbonil düzeylerine etkisi

Kafeinin 10000 μM AA ile toksisite oluşturulan HepG2 hücreslerinde PC düzeylerine etkisi Şekil 7’de gösterilmiştir. Kafeinin HepG2 hücrelerine 24 saat süre ile uygulama sonrası PC düzeyleri için sonuçlar kontrol grubunun ortalamasına bölünerek kontrolün katı olarak verildi. PC düzeyleri, yalnızca AA uygulanan hücrelerde kontrolün 2.04 ± 0.10 katı, 10 μM kafein uygulanan hücrelerde kontrolün 1.80 ± 0.15 katı, 50 μM kafein uygulanan hücrelerde kontrolün 1.64 ± 0.12 katı, 200 μM kafein uygulanan hücrelerde kontrolün 1.45 ± 0.13 katı bulundu (tümü için $p < 0.05$). 50 μM kafeinin, sadece AA uygulanan hücrelere göre protein karbonil düzeyindeki artışı önlediğı, 200 μM kafein tedavisinin ise hem sadece AA hem de AA ile birlikte 10 μM kafein uygulanan hücrelere göre protein karbonil düzeylerini azaltmada daha etkili olduğı gösterildi (tümü için $p < 0.05$).



Şekil 7. Kafeinin akrilamid ile oluşturulan toksisitede protein karbonil düzeylerine etkisi

AA konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerinde CHOP düzeylerine etkisi Şekil 8’de gösterilmiştir. HepG2 hücrelerine 24 saat süre ile uygulama sonrası CHOP düzeyleri kontrol grubunun ortalamasına bölünerek kontrolün katı olarak verildi. CHOP düzeyleri 10 μM AA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.19 ± 0.10 katı, 1000 μM AA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.50 ± 0.21 katı, 10000 μM AA uygulanan hücrelerde ise kontrolün 2.26 ± 0.19 katı bulundu. CHOP düzeyleri 10 μM AA uygulanan hücrelerde kontrole göre değişmezken ($p > 0.05$), 1000 μM AA uygulanan hücrelerde kontrole göre anlamlı olarak arttı ($p < 0.05$). 10000 μM AA uygulanan hücrelerde ise CHOP düzeyleri kontrole ve 10 μM ve 1000 μM AA uygulanan hücelere kıyasla anlamlı olarak arttı (tümü için $p < 0.05$).

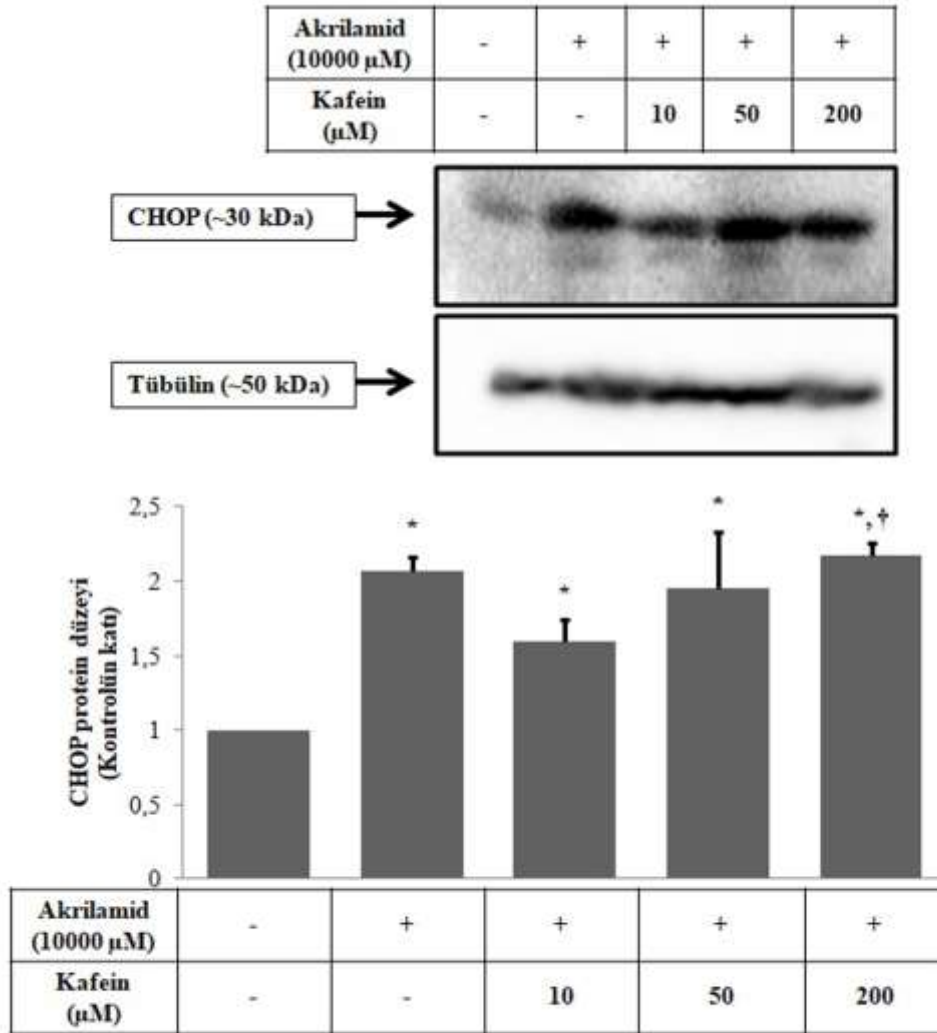


Sonuçlar 3 bağımsız deneysel tekrar için ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi ($n=3$).
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.
†: 10 μM akrilamid ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.
‡: 1000 μM akrilamid ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

Şekil 8. Akrilamidin CHOP düzeylerine etkisi

CHOP: C/EBP Homolog Protein

Kafeinin 24 saat süre ile 10000 μM AA toksisitesi oluşturulan HepG2 hücrelerinde CHOP düzeylerine etkisi Şekil 9’da gösterilmiştir. CHOP düzeyleri AA uygulanan hücrelerde kontrolün 2.06 ± 0.10 katı, 10 μM kafein uygulanan hücrelerde kontrolün 1.60 ± 0.15 katı, 50 μM kafein uygulanan hücrelerde kontrolün 1.95 ± 0.38 katı, 200 μM kafein uygulanan hücrelerde ise kontrolün 2.17 ± 0.09 katı bulundu (tümü için $p < 0.05$). AA uygulanmış tüm hücrelerde kontrole kıyasla CHOP düzeylerinde anlamlı artış gözlemlendi (tümü için $p < 0.05$). 10, 50 ve 200 μM kafein tedavisi AA uygulanan hücrelerde CHOP düzeylerindeki artışı anlamlı olarak önleyemedi (tümü için $p > 0.05$). Ayrıca 200 μM kafein tedavisi, 10 μM kafeine oranla CHOP düzeylerini anlamlı olarak arttırdı (her ikisi için $p < 0.05$).



Sonuçlar 3 bağımsız deneysel tekrar için ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi ($n=3$).

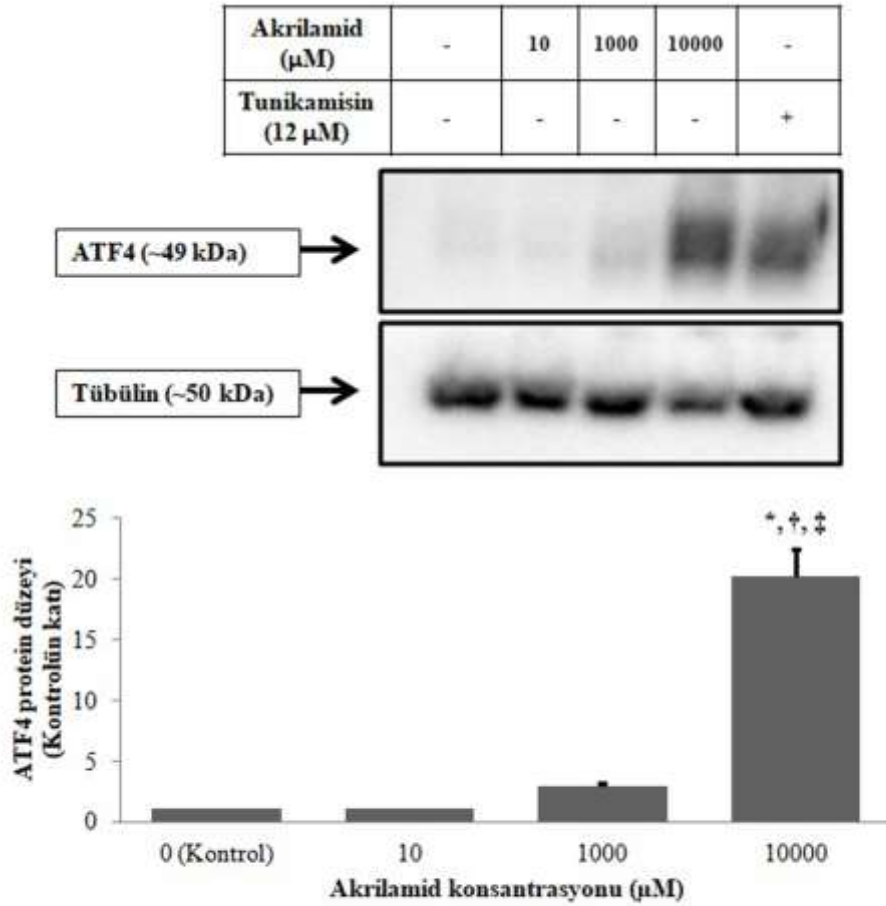
İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.

*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

†: 10000 μM akrilamid+ 10 μM kafein ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

Şekil 9. Kafeinin akrilamid ile oluşturulan toksisitede CHOP düzeylerine etkisi
CHOP: C/EBP Homolog Protein

AA konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerinde ATF4 düzeylerine etkisi Şekil 10'da gösterilmiştir. AA'nın HepG2 hücrelerine 24 saat süre ile uygulama sonrası ATF4 düzeyleri kontrol grubunun ortalamasına bölünerek kontrolün katı olarak verildi. ATF4 düzeyleri 10 μ M AA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.05 ± 0.05 katı, 1000 μ M AA uygulanan hücrelerde kontrolün 2.92 ± 0.29 katı, 10000 μ M AA uygulanan hücrelerde ise kontrolün 20.18 ± 2.34 katı bulundu (tümü için $p < 0.05$). ATF4 düzeyleri 10 ve 1000 μ M AA uygulanan hücrelerde kontrole kıyasla değişmediği (her ikisi için $p > 0.05$), 10000 μ M AA uygulanan hücrelerde ise ATF4 düzeylerinin hem kontrole ve hem de diğer dozlara göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (tümü için $p < 0.05$).

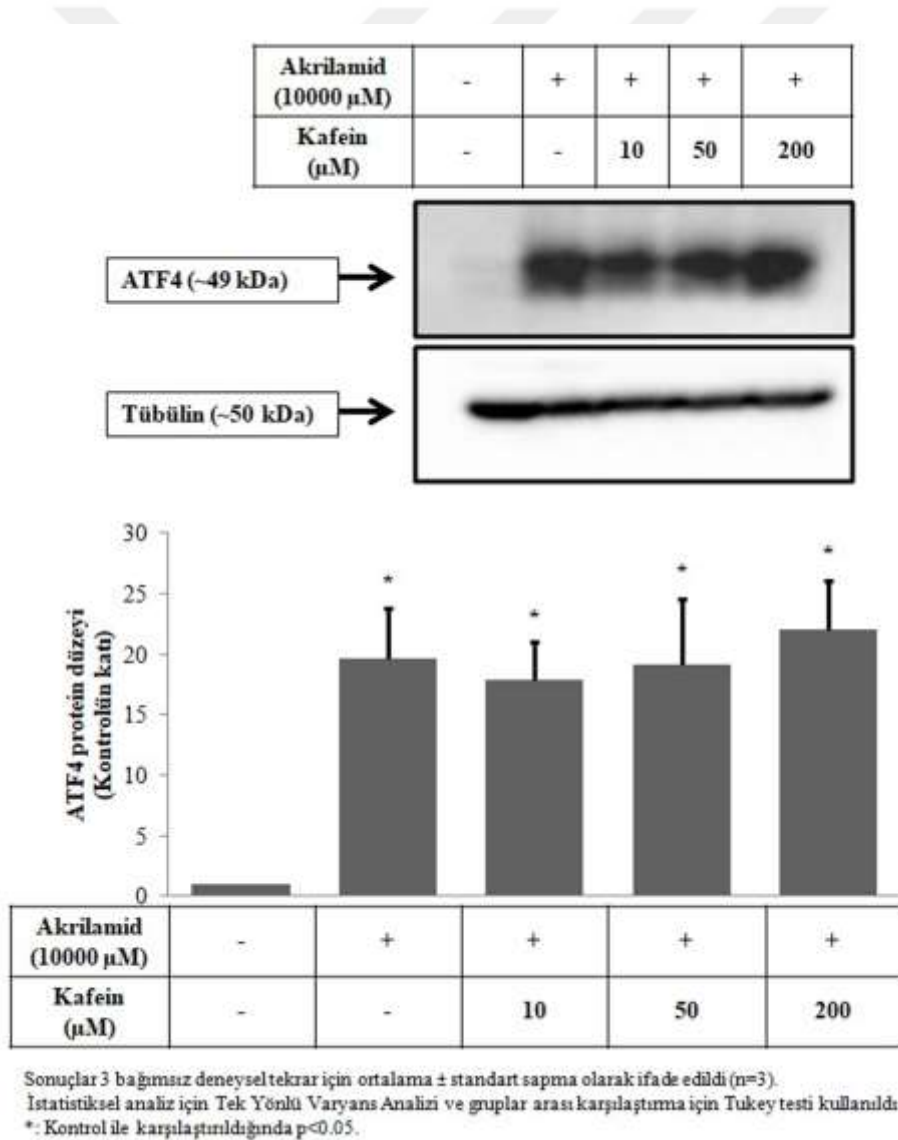


Sonuçlar 3 bağımsız deneysel tekrar için ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi ($n=3$). İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı.
 *: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.
 †: 10 μ M akrilamid ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.
 ‡: 1000 μ M akrilamid ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

Şekil 10. Akrilamidin ATF4 düzeylerine etkisi

ATF4: Transkripsiyon Aktive Edici Faktör 4

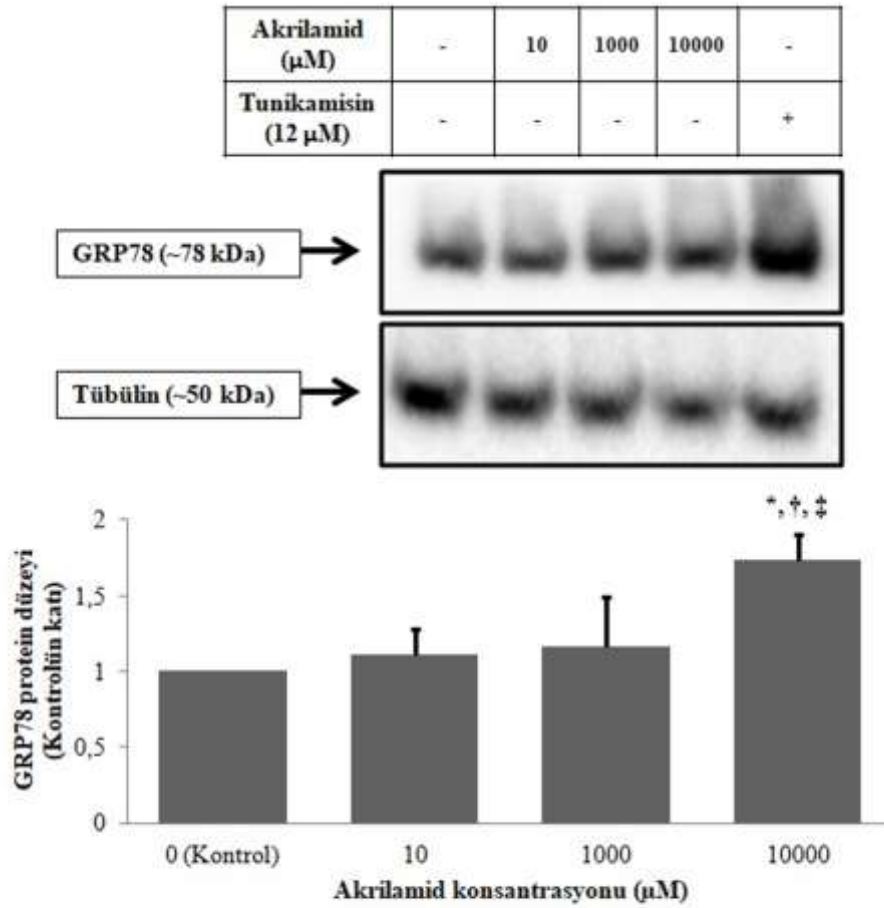
Kafeinin 10000 μM AA ile toksisite oluşturulan HepG2 hücrelerinde ATF4 düzeylerine etkisi Şekil 11’de gösterilmiştir. Kafeinin HepG2 hücrelerine 24 saat süre ile uygulama sonrası ATF4 düzeyleri kontrol grubunun ortalamasına bölünerek kontrolün katı olarak verildi. ATF4 düzeyleri sadece AA uygulanan hücrelerde kontrolün 19.64 ± 4.20 katı, AA ile birlikte 10 μM kafein uygulanan hücrelerde kontrolün 17.84 ± 3.24 katı, AA ile birlikte 50 μM kafein uygulanan hücrelerde kontrolün 19.21 ± 5.34 katı, AA ile birlikte 200 μM kafein uygulanan hücrelerde ise kontrolün 22.00 ± 4.07 katı bulundu (tümü için $p < 0.05$). AA uygulanan tüm gruplarda kontrole göre ATF4 düzeylerinde anlamlı artış gözlemlendi (tümü için $p < 0.05$). 10, 50 ve 200 μM kafein tedavisi 10000 μM AA uygulanan hücrelerde ATF4 düzeylerini anlamlı olarak değiştirmede (tümü için $p > 0.05$).



Şekil 11. Kafeinin akrilamid ile oluşturulan toksisitede ATF4 düzeylerine etkisi

ATF4: Transkripsiyon Aktive Edici Faktör 4

AA konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerinde GRP78 düzeylerine etkisi Şekil 12’de gösterilmiştir. AA’nın HepG2 hücrelerine 24 saat süre ile uygulama sonrası GRP78 düzeyleri kontrol grubunun ortalamasına bölünerek kontrolün katı olarak verildi. GRP78 düzeyleri 10 μ M AA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.11 ± 0.16 katı, 1000 μ M AA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.16 ± 0.33 katı, 10000 μ M AA uygulanan hücrelerde ise kontrolün 1.73 ± 0.17 katı bulundu. GRP78 düzeyleri 10 ve 1000 μ M AA uygulanan hücrelerde kontrole kıyasla değişmedi (her ikisi için $p > 0.05$). 10000 μ M AA uygulanan hücrelerde ise kontrole ve diğer AA dozlarına (10, 1000 μ M) kıyasla GRP78 düzeyleri anlamlı olarak arttı (tümü için $p < 0.05$)

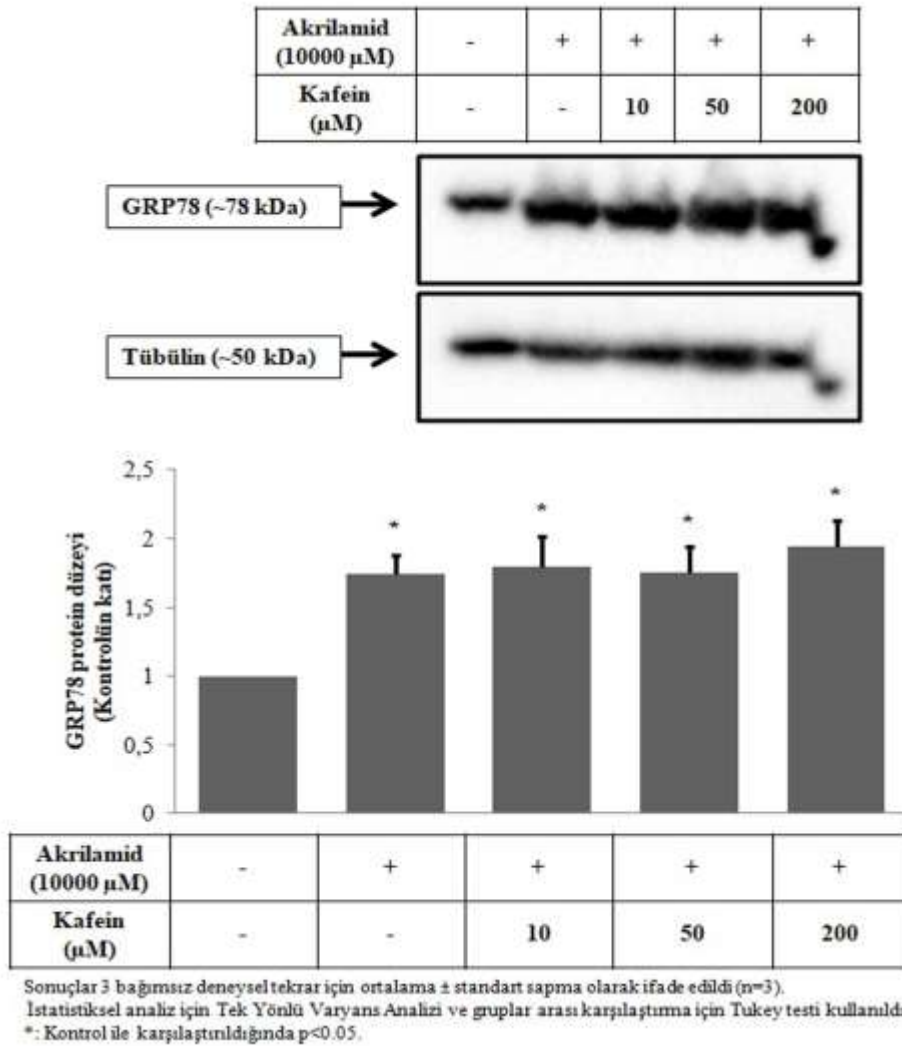


Sonuçlar 3 bağımsız deneysel tekrar için ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi (n=3). İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırmaya için Tukey testi kullanıldı.
 *: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.
 †: 10 μ M akrilamid ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.
 ‡: 1000 μ M akrilamid ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

Şekil 12. Akrilamidin GRP78 düzeylerine etkisi

GRP78: Glukozla ilişkili protein 78

Kafeinin AA ile toksisite oluşturulan HepG2 hücrelerinde GRP78 düzeylerine etkisi Şekil 13'te gösterilmiştir. Kafeinin HepG2 hücrelerine 24 saat süre ile uygulama sonrası GRP78 düzeyleri kontrol grubunun ortalamasına bölünerek kontrolün katı olarak verildi. GRP78 düzeyleri 10000 μ M AA uygulanan hücrelerde kontrolün 1.74 ± 0.14 katı, akrilamid dozu ile birlikte 10 μ M kafein uygulanan hücrelerde kontrolün 1.79 ± 0.22 katı, 50 μ M kafein uygulanan hücrelerde kontrolün 1.75 ± 0.19 katı, 200 μ M kafein uygulanan hücrelerde ise kontrolün 1.94 ± 0.19 katı idi (tümü için $p < 0.05$). AA uygulanan tüm hücrelerde GRP78 düzeylerinde kontrole kıyasla anlamlı olarak yükselme gözlemlendi (tümü için $p < 0.05$). 10, 50 ve 200 μ M kafein tedavisi 10000 μ M AA uygulanan hücrelerde GRP78 oluşumunu engelleyemediğinden bu protein düzeylerinde anlamlı olarak değişim görülmedi (tümü için $p > 0.05$).



Şekil 13. Kafeinin akrilamid ile oluşturulan toksisitede GRP78 düzeylerine etkisi

GRP78: Glukozla ilişkili protein 78

TARTIŞMA

Akrilamid, suda çözünebilen vinil monomer yapıya sahip, nörotoksik ve genotoksik etkileri olan bir maddedir (2). Ayrıca karbonhidrat bakımından zengin gıdaların 120°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda pişirilmesiyle spontane olarak oluşmaktadır (71). Akrilamidin vücuttaki etkisinin diğer kanserojenlere benzediği ancak diğer gıda kaynaklı kanserojenlere kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda alındığı bildirilmiştir (72). Oral yolla alınan akrilamid primer olarak karaciğerde metabolize edilmektedir ve karaciğer için toksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (73).

Proteinlerin sentezlenmesi, doğru şekilde katlanması, post-translasyonel modifikasyonu ve hücre içinde farklı organellere ya da hücre dışına iletilmesi granüllü ER'de gerçekleşir (11). Protein katlanması patojenik enfeksiyon, kimyasal hasar, genetik mutasyon, besin yoksunluğu gibi çeşitli endojen veya ekzojen uyaranlardan etkilenebilen hassas bir işlemdir (50). ER, lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış protein birikimiyle oluşan ER stresi durumunda, UPR yolaklarını aktive ederek kendi iç homeostasını sağlamaya çalışır (74).

Proteinlerin doğru katlanmasına aracılık eden ER şaperonlarından biri olan GRP78 yaygın kullanılan bir ER stres belirtecidir. ER lümeninde hatalı katlanmış veya katlanmamış protein birikmesiyle ER membranından ayrılarak hatalı katlanmış proteinlere bağlanır ve UPR'yi başlatır (10). ER stres sensörü olarak rol oynayan proteinlerden biri olan PERK, protein translasyonunu inhibe ederek ER'nin protein yükünü azaltmakta aynı zamanda ATF4 transkripsiyonunu arttırmaktadır.

ATF4; ER fonksiyonu, ER stres ile indüklenen apoptoz, ER stres aracılı ROS üretiminde yer alan genlerin ekspresyonlarını indükleyen bir transkripsiyon faktörüdür ve UPR'nin hiperaktivasyonunu önlemek için eIF2 α 'nın fosforilasyonu yoluyla GADD34 aracılı negatif feedback mekanizması olan bir transkripsiyon faktörüdür ATF4'ün CHOP ekspresyonunda ana indükleyici olduğu kabul edilmektedir (11,13). CHOP, ER stres kaynaklı bir proapoptotik faktördür (75). CHOP'un aşırı ekspresyonunun ER'de ROS üretimini arttırdığı bilinmektedir (54).

Kafein; kahve, kakao çekirdekleri gibi çok fazla bitki türünde doğal olarak bulunan bir alkaloiddir. Kafeinin prooksidan ve antioksidan etkileri bildirilmiştir (76).

Çalışmamızın amacı, kafeinin akrilamid uygulanan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde protein oksidasyonu ve ER stresine etkisini araştırmaktır. İn vitro karaciğer modeli oluşturmak amacıyla birçok yönden hepatositlere benzeyen HepG2 hücreleri kullanıldı (77). HepG2 hücreleri 24 saat süreyle 10, 1000 ve 10000 μ M akrilamid ile inkübe edildi. 1000 ve 10000 μ M konsantrasyonlarında akrilamid hücre canlılığını azaltırken, 10 μ M konsantrasyonda hücre canlılığını değiştirmedi. Bu bulgumuz akrilamidin yüksek dozlarının karaciğer hücrelerine sitotoksik etkisi olduğunu göstermektedir. Çalışmamızla benzer şekilde literatürde akrilamidin yüksek konsantrasyonlarda HepG2 hücrelerine toksik etkilerinin bulunduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. (5,78,79).

Klinik çalışmalarda kafein alımının hepatoprotektif etkileri gösterilmiş (18) ayrıca kafeinin karaciğer hastalıklarının ilerlemesini önlediği bildirilmiştir (59) Günlük kahve tüketimine bağlı olarak, plazma kafein konsantrasyonlarının yetişkinlerde genellikle 2-10 mg/L (yaklaşık 10-50 μ M) arasında olduğu bildirilmiştir. 40 mg/L'den (yaklaşık 200 μ M) yüksek bir plazma kafein konsantrasyonunda toksik etkiler gözlenmiştir (80) Özgün ve ark.'da HepG2 hücre hattında 24 saat süreyle uygulanan 200 μ M konsantrasyonda kafeinin toksik etkiler göstermeye başladığını bildirmişlerdir (70). Bu nedenle, bu çalışmada 10, 50 ve 200 μ M kafein konsantrasyonlarının akrilamid uygulanan HepG2 hücreleri üzerindeki etkilerini araştırdık. Kafeinin akrilamid uygulanan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde hücre canlılığına etkisi bu çalışma ile ilk kez gösterildi. 10000 μ M AA ile eş zamanlı olarak uygulanan 10, 50 ve 200 μ M konsantrasyonlarda kafein tedavisinin hücre canlılığı üzerinde etkisi olmadı.

Akrilamid karaciğerde glutatyon ile konjuge edilerek vücuttan atılır. GSH ayrıca ROS uzaklaştırmada vücuttaki en önemli endojen antioksidandır ve ROS'u nötralize ederek proteinlerin geri dönüşümsüz inaktivasyonunu önler. AA maruziyeti aşırı miktarda ROS

üretimine neden olur, GSH bu radikallere bağlandığından konsantrasyonu düşer. GSH tüketiminin artması oksidan/antioksidan dengesini bozar (81). Bu dengenin bozulması ve ROS düzeylerindeki artış, proteinlerde post-translasyonel modifikasyona yol açar. Bu modifikasyonlardan biri de protein karbonilasyonudur (8).

Literatürde akrilamidin karaciğer PC düzeyine etkisini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır (82,83). Çalışmamız, bu çalışmalara benzer şekilde akrilamidin HepG2 hücrelerinde PC düzeyini arttırdığını gösterdi. AA toksisitesinin PC düzeylerini arttırmasının nedeni GSH tüketiminin artmasına ve buna bağlı olarak ROS düzeylerinin artmasıyla oksidatif stresin indüklenmesi olabilir. Bu çalışmada ayrıca kafeinin, akrilamidin yol açtığı protein karbonilasyonuna etkisi araştırıldı. 10 µM kafein PC düzeylerini değiştirmezken, 50 ve 200 µM kafein protein karbonilasyonunu anlamlı olarak önledi. Bu durum kafeinin antioksidan özelliğini göstermektedir.

Akrilamid toksisitesinin ER stres ile ilişkisini araştıran sadece iki çalışma bulunmaktadır. Zebra balığının yüzgeçlerinden izole edilen fibroblast hücrelerinde (BRF41) 6 saat süreyle uygulanan 10 mM AA'nin ER stresi ve oksidatif stresi içeren hücre içi sinyal yollarını up regüle ettiği gösterilmiştir (84). SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde yapılan çalışmada 10 mM AA'nin farklı sürelerde (0, 1, 2, 4, 6, 8 saat) uygulanmasıyla hücrede ROS birikiminin arttığı ve buna bağlı olarak eIF2 α -ATF4-CHOP sinyal kaskadının aktive olduğu ve apoptotik nöronal hücre ölümünün indüklendiği bildirilmiştir (85). Çalışmamızda yüksek konsantrasyonda AA uygulanan hücrelerde GRP78, ATF4 ve CHOP'un protein düzeyleri arttı. Bu bulgumuz yüksek konsantrasyonda akrilamidin ER stresi arttırdığını göstermektedir.

Literatürde GRP78, ATF4 ve CHOP protein düzeyleri ölçülerek kafeinin akrilamid uygulanan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde ER stresi üzerine etkisini gösteren bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda 10, 50 ve 200 µM kafein konsantrasyonları GRP78, ATF4 ve CHOP protein düzeylerindeki artışı önleyemedi. Bu bulgularımız ise uygulanan kafein dozlarının 24 saatlik süreyle ER stresi önlemede yetersiz kaldığını göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamız yüksek konsantrasyonda akrilamidin HepG2 hücrelerinde; hücre canlılığını azalttığını, protein oksidasyonu ve ER stresi arttırdığını gösterdi. Bu çalışma ile insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde akrilamidin yüksek konsantrasyonlarıyla oluşturulmuş ER stres üzerinde kafeinin bir etkisinin olmadığı ancak 50 ve 200 µM kafeinin oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Bu bakımdan kafein akrilamid toksisitesiyle ilişkili oksidatif stresin önlenmesinde faydalı olabilir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada kafeinin akrilamid uygulanan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde protein oksidasyonu ve ER stresine etkisini göstermeyi amaçladık. Akrilamidin ve akrilamid ile birlikte uygulanan kafeinin hücre canlılığına etkisini MTT testiyle ölçerek protein oksidasyonu üzerine etkisini PC düzeylerini ve ER stresine etkisini, GRP78, ATF4 ve CHOP protein düzeylerini ölçerek gösterdik.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar şöyledir:

1. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 1000 μ M AA, kontrol ve 10 μ M AA uygulanan hücrelere göre hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı.
2. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10000 μ M AA, hücre canlılığını kontrol, 10 μ M AA ve 1000 μ M AA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
3. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle 10000 μ M AA ile birlikte uygulanan 10, 50 ve 200 μ M kafein 10000 μ M AA uygulanan hücrelere kıyasla hücre canlılığını değiştirmedir.
4. 10 ve 1000 μ M AA uygulanan hücrelerde, PC düzeyleri kontrole göre değişmedi.
5. 10000 μ M AA, PC düzeylerini kontrole göre anlamlı oranda arttırdı.
6. 10000 μ M AA ile birlikte uygulanan 50 μ M kafein, PC düzeylerini 10000 μ M AA'ya göre azalttı.
7. 10000 μ M AA ile birlikte uygulanan 200 μ M kafein, PC düzeylerini 10000 μ M AA ve akrilamid ile birlikte 10 μ M kafein uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
8. 1000 μ M AA, CHOP protein düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı.

9. 10000 μ M AA, HepG2 hücrelerinde CHOP protein düzeylerini kontrol, 10 ve 1000 μ M AA uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak arttırdı.
10. 10000 μ M AA ile birlikte uygulanan 200 μ M kafein, CHOP protein düzeylerini kontrol ve AA ile birlikte uygulanan 10 μ M kafeine göre anlamlı olarak arttırdı.
11. 10000 μ M AA ATF4 protein düzeyleri kontrol, 10 ve 1000 μ M AA'e göre arttırdı.
12. 10000 μ M AA ile birlikte uygulanan 10, 50, 200 μ M kafein, ATF4 protein düzeylerini 10000 μ M AA uygulanmış hücrelere göre değıştirmedı.
13. 10000 μ M AA, GRP78 protein düzeylerini kontrol, 10 ve 1000 μ M AA'e göre anlamlı oranda arttırdı.
14. 10, 50 ve 200 μ M kafein, GRP78 protein düzeylerini 10000 μ M AA uygulanan hücrelere göre değıştirmedı.

Sonuç olarak, bu çalışma akrilamidin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığını azaltarak toksik etki gösterdiğini, kafeinin özellikle yüksek akrilamid dozlarında oluşan ER stresini önleyemediğı, ancak protein karbonilasyonunu önleyebildiğini gösterdi.

ÖZET

Çalışmamızın amacı, kafeinin akrilamid uygulanan insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde protein oksidasyonu ve endoplazmik retikulum stresine etkisini araştırmaktır.

Akrilamid ve akrilamid ile birlikte uygulanan kafeinin; hücre canlılığına etkisi 3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür testi ile, protein karbonil, glukozla ilişkili protein 78, transkripsiyon aktive edici faktör 4, C/EBP-homolog protein düzeyleri western blot yöntemiyle ölçüldü.

HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 1000 ve 10000 μM konsantrasyonlarında akrilamid hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı (her ikisi için $p<0.05$). 10000 μM akrilamid, ER stres belirteci olan glukozla ilişkili protein 78, transkripsiyon aktive edici faktör 4, C/EBP-homolog protein düzeylerini anlamlı olarak arttırdı (tümü için $p<0.05$). Kafein uygulanan hücrelerde glukozla ilişkili protein 78, transkripsiyon aktive edici faktör 4, C/EBP-homolog protein düzeyleri anlamlı olarak değişmedi (tümü için $p>0.05$).

Protein karbonil düzeyleri 24 saat süre ile 10000 μM akrilamid uygulanan hücrelerde kontrole göre anlamlı oranda yüksekti. 50 ve 200 μM kafein, 10000 μM akrilamid uygulanan hücrelerde protein karbonil düzeylerini anlamlı olarak önledi (ikisi için $p<0.05$).

Sonuç olarak çalışmamız, HepG2 hücrelerinde akrilamidin 1000 ve 10000 μM konsantrasyonlarında hücre canlılığını azalttığını, protein oksidasyonu ve endoplazmik retikulum stresi arttırdığını, 10000 μM akrilamid ile birlikte uygulanan 10, 50 ve 200 μM kafeinin endoplazmik retikulum stresi değiştirmediğini ancak 50 ve 200 μM konsantrasyonlarında kafeinin protein oksidasyonunu önlediğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, Kafein, HepG2, Protein karbonil, Endoplazmik retikulum stresi



EFFECT OF CAFFEINE ON PROTEIN OXIDATION AND ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN ACRYLAMIDE-TREATED HUMAN-DERIVED HEPATOMA CELLS

SUMMARY

Our study aims to investigate the effect of caffeine on protein oxidation and endoplasmic reticulum stress in human-induced hepatoma cells treated with acrylamide.

The effect of caffeine administered with acrylamide and acrylamide on cell viability was measured by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay, protein carbonyl, glucose regulated protein 78, activating transcription factor 4, C/EBP-homologous protein levels were measured by western blot method.

Applied for 24 hours, 1000 and 10000 μM acrylamide significantly reduced the viability of HepG2 cells (for both $p < 0.05$). 10000 μM acrylamide significantly increased the protein levels of glucose regulated protein 78, activating transcription factor 4, C/EBP-homologous protein ($p < 0.05$ for all). The protein levels of glucose regulated protein 78, activating transcription factor 4, C/EBP-homologous protein were not significantly changed in 10, 50, 200 μM caffeine treated cells ($p > 0.05$ for all).

The protein carbonyl levels were significantly higher in cells treated with 10000 μM acrylamide compared to control. 50 and 200 μM caffeine significantly prevented protein carbonyl levels in cells treated with 10000 μM acrylamide ($p < 0.05$ for both).

As a result, our study showed that acrylamide decreases cell viability at concentrations of 1000 and 10000 μ M in HepG2 cells, increases protein oxidation and endoplasmic reticulum stress, caffeine did not change endoplasmic reticulum stress, but doses of 50 and 200 μ M caffeine prevent protein oxidation.

Keywords: Acrylamide, Caffeine, HepG2, Protein carbonyl, Endoplasmic reticulum stress



KAYNAKLAR

1. Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide, a review. *J Agric Food Chem* 2003;51(16):4504-26.
2. European Commission Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection, European Union Risk Assessment Report; acrylamide. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities 2002;24.
3. Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA et al. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002;419(6906):449–50.
4. Pedreschi F, Mariotti MS, Granby K. Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *J Sci Food Agric* 2014;94(1):9–20.
5. Chu Q, Zhao Y, Shi X, Han W, Zhang Y, Zheng Y et al. In vivo-like 3-D model for sodium nitrite- and acrylamide-induced hepatotoxicity tests utilizing HepG2 cells entrapped in micro-hollow fibers. *Nature* 2017;7(1):14837-47.
6. Prasad SN, Muralidhara. Evidence of acrylamide induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*– Its amelioration with spice active enrichment: Relevance to neuropathy. *Neurotoxicology* 2012;33(5):1254-64.
7. Jiang L, Cao J, An Y, Geng C, Qu S, Jiang L et al. Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. *Toxicol In Vitro* 2007;21(8):1486–92.
8. Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ, Bernlohr DA. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J Biol Chem* 2008;283(32):21837-41.
9. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005;74:739-89.

10. Lee, AS. GRP78 induction in cancer: Therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res* 2007;67(8):3496-9.
11. Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: Dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013;301:215–90.
12. Siu F, Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H, Kilberg MS. ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem* 2002;277(27):24120–7.
13. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 2003;11(3):619–33.
14. Cao SS, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxid Redox Signal* 2014;21(3):396-413.
15. Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ. Chop deletion reduces oxidative stress, improves β cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest* 2008;118(10):3378–89.
16. Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit* 2003;9(9):325-30.
17. Xiongwen Lv, Chen Z, Li J, Zhang L, Liu H, Huang C et al. Caffeine protects against alcoholic liver injury by attenuating inflammatory response and oxidative stress. *Inflamm Res* 2010;59(8),635–45.
18. Modi AA, Feld JJ, Park Y, Kleiner DE, Everhart JE et al. Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology* 2010;51(1):201–9.
19. United States Environmental Protection Agency. Health and environmental effects profile for acrylamide. Washington, DC: Office of Research and Development, U.S. EPA.1985;95. (Erişim tarihi: 16.06.2020, <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=47199>).
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
21. Blancher C, Cormick RM. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide denaturing gel electrophoresis and western blotting techniques. *Methods Mol Biol* 2012;878:89–110.
22. Zhang Y, Ren Y, Jiao J, Li D, Zhang Y. Ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of asparagine, sugars, and acrylamide in Maillard reactions. *Anal Chem* 2011;83(9):3297–304.

23. Yasuhara A, Tanaka Y, Hengel M, Shibamoto T. Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *J Agric Food Chem* 2003;51(14):3999-4003.
24. Stadler RH, Robert F, Riediker S, Varga N, Davidek T, Devaud S et al. In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *J Agric Food Chem* 2004;52(17):5550-8.
25. Yaylayan VA, Stadler RH. Acrylamide formation in food: A mechanistic perspective. *J AOAC Int* 2005;88(1):262-7.
26. Krishnakumar, T, Visvanathan, R. Acrylamide in food products: a review. *J Food Process Technol* 2014;5(7):344-53.
27. Surdyk N, Rosén J, Andersson R, Aman P. Effects of asparagine, fructose, and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread. *J Agric Food Chem* 2004;52(7):2047-51.
28. Koszucka A, Nowak A, Nowak I, Motyl. 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.
29. Fennell TR, Sumner SC, Snyder RW, Burgess J, Spicer R, Bridson WE et al. Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol Sci* 2005;85(1):447-59.
30. IARC. Acrylamide, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogen Risk to Human: Some Industrial Chemicals. International Agency for Research on Cancer 1994;60:389–443.
31. 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.
32. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen Toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002;33(2):110–8.
33. Lu J, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med* 2010;14(4):840–60.
34. Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med* 2011;51(5):993–9.
35. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem* 2015;97:55-74.

36. Dalle-Donne I, 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.
37. Anelli T, Sitia R. Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J* 2008;27(2):315-27.
38. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999;397(6716): 271-4.
39. Dara L, Ji C, Kaplowitz N. The contribution of ER stress to liver diseases, *Hepatology* 2011;53(5):1752-63.
40. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(7):519-29.
41. Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response. *Cell Death Differ* 2006;13(3):374-84.
42. Hosoi T, Ozawa K. Endoplasmic reticulum stress in disease: Mechanisms and therapeutic opportunities. *Clin Sci (Lond)* 2009;118(1):19-29.
43. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996;381(6583):571-9.
44. Kitamura M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295(2):323-34.
45. Wang XZ, Lawson B, Brewer J, Zinszner H, Sanjay A, Mi L et al. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol* 1996;16(8):4273-80.
46. Munro S, Pelham HR. An Hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 1986;46(2):291-300.
47. Colla E. Linking the Endoplasmic reticulum to Parkinson's disease and alpha-synucleinopathy. *Front in Neurosci* 2019;13:560.
48. Vembar SS, Brodsky JL. One step at a time: Endoplasmic reticulum associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(12):944-57.
49. Dufey E, Sepúlveda D, Rojas-Rivera D, Hetz C. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014;307(7):C582-94.
50. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: Coping with stress. *Trends Cell Biol* 2004;14(1):20-8.

51. Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* 2011;54(4):795–809.
52. Zeeshan HMA, Lee GH, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. *J Mol Sci* 2016;17(3):327–47.
53. Cardozo AK, Ortis F, Storling J, Feng YM, Rasschaert J, Tonnesen M et al. Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca^{2+} ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca^{+2} , leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2005;54(2):452–61.
54. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Bio* 2001;21(4):1249–59.
55. Andrews KW, Schweitzer A, Zhao C, Holden JM, Roseland JM, Brandt M et al. The caffeine contents of dietary supplements commonly purchased in the US: Analysis of 53 products with caffeine-containing ingredients. *Anal Bioanal Chem* 2007;389(1):231–9.
56. Weinberg BA, Bealer B. The world of caffeine: the science and culture of the world's most popular drug. Routledge New York 2001;1-41.
57. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Kafein> (Erişim tarihi:12.06.2020)
58. Clark I, Landolt HP. Coffee, caffeine, and sleep: a systematic review of epidemiological studies and randomized controlled trials. *Sleep Med Rev* 2016;31:70–8.
59. Yesil A, Yilmaz Y. Review article: Coffee consumption, the metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38(9):1038–44.
60. Benowitz NL. Clinical pharmacology of caffeine. *Annu Rev Med* 1990;41:277–88.
61. Arnaud MJ. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man, *Handb Exp Pharmacol* 2011;200:33–91.
62. Ribeiro JA, Sebastião AM. Caffeine and adenosine. *J. Alzheimers Dis* 2010;20(1):3–15.
63. 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.
64. Ahmadian S, Barar J, Saei AA, Fakhree MA, Omid Y. Cellular toxicity of nanogenomedicine in MCF-7 cell line: MTT assay. *J Vis Exp* 2009;26:1191.
65. Lowry O, Rosebrough H, Farr NJ, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265–75.

66. Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the folin–ciocalteu reagent. *J Agric Food Chem* 2010;58(14):8139–44.
67. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994;233:357-63.
68. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH image to imageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9(7):671-5.
69. <http://www.abcam.com/protocols/general-western-blot-protocol> (Eriřimtarihi:15.06.2020)
70. Özgün GS, Özgün E, Tabakçioğlu K, Gökmen SS, Eskiocak S, Çakır E. Caffeine increases apolipoprotein A-1 and paraoxonase-1 but not paraoxonase-3 protein levels in human-derived liver (HepG2) cells. *Balkan Med J* 2017;34(6):534-9.
71. Swedish National Food Administration, Information about Acrylamide in Food, 2002. <http://www.slv.se>. (Erişim tarihi: 7.06.2020)
72. Yang HJ, Lee SH, Jin Y, Choi JH, Han DU, Chae C. Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile. *Reprod Toxicol* 2005;19(4):527-534.
73. Miller MJ, Carter DE, Sipes IG. Pharmacokinetics of acrylamide in Fischer-344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982;63(1):36–44.
74. Kaneko M, Imaizumi K, Saito A, Kanemoto S, Asada R, Matsuhisa K et al. ER stress and disease: toward prevention and treatment. *Biol Pharm Bull* 2017;40(9):1337-43.
75. Fawcett TW, Martindale JL, Guyton KZ, Hai T, Holbrook NJ. Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem J* 1999;339(1):135-41.
76. Dong S, Kong J, Kong J, Shen Q, Kong F, Sun W et al. Low concentration of caffeine inhibits the progression of the hepatocellular carcinoma via Akt signaling pathway. *Anticancer Agents Med Chem*. 2015;15(4):484-92.
77. Shan X, Li Y, Meng X, Wang P, Jiang P, Feng Q. Curcumin and epigallocatechin-3-gallate attenuate acrylamide-induced proliferation in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol* 2014;66:194–202.
78. Lamy E, Völkel Y, Roos PH, Kassie F, Mersch-Sundermann V. Ethanol enhanced the genotoxicity of acrylamide in human, metabolically competent HepG2 cells by CYP2E1 induction and glutathione depletion. *Int J Hyg Environ Health* 2008;211(1-2):74–81.

79. Tan X, Zhao T, Wang Y, Wang J, Wang Z, Liu Z et al. Acrylamide defects the expression pattern of circadian clock and mitochondrial dynamics in C57BL/6J mice liver and HepG2 cells. *J Agric Food Chem* 2018;66(39):10252-66.
80. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 1999;51(1):83-133.
81. Schlesier K, Harwat M, Bohm V. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res* 2002;36(2):177-87.
82. Ghorbel I, Elwej A, Chaabene M, Boudawara O, Marrakchi R, Jamoussi R et al. Effects of acrylamide graded doses on metallothioneins i and ii induction and DNA fragmentation: Biochemical and histomorphological changes in the liver of adult rats. *Toxicol Ind Health* 2017;33(8):611-22.
83. Karimi MY, Fatemi I, Kalantari H, Mombeini MA, Mehrzadi S, Goudarzi M. Ellagic acid prevents oxidative stress, inflammation, and histopathological alterations in acrylamide-induced hepatotoxicity in wistar rats. *J Diet Suppl* 2019:1-12.
84. 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.
85. Komoike Y, Matsuoka M. Endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis by acrylamide exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016;310(1):68-77.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller	Sayfa no
Şekil 1. Akrlamidin gıdalarda temel oluşum yolları.....	4
Şekil 2. Katlanmamış protein cevabı (UPR) sinyal yolları.....	7
Şekil 3. Kafein molekülünün yapısı	9
Şekil 4. Akrlamidin hücre canlılığına etkisi.....	18
Şekil 5. Kafeinin akrlamid ile oluşturulan toksisitede hücre canlılığına etkisi.....	19
Şekil 6. Akrlamidin protein karbonil düzeylerine etkisi.....	20
Şekil 7. Kafeinin akrlamid ile oluşturulan toksisitede protein karbonil düzeylerine etkisi.....	22
Şekil 8. Akrlamidin CHOP düzeylerine etkisi.....	23
Şekil 9. Kafeinin akrlamid ile oluşturulan toksisitede CHOP düzeylerine etkisi.....	24
Şekil 10. Akrlamidin ATF4 düzeylerine etkisi.....	25
Şekil 11. Kafeinin akrlamid ile oluşturulan toksisitede ATF4 düzeylerine etkisi.....	26
Şekil 12. Akrlamidin GRP78 düzeylerine etkisi.....	27
Şekil 13. Kafeinin akrlamid ile oluşturulan toksisitede GRP78 düzeylerine etkisi.....	28

ÖZGEÇMİŞ

11.12.1989 tarihinde Edirne’de doğdum. İlk ve orta öğretimimi Edirne’de tamamladım. Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’ne 2008 yılında başlayıp 2012 yılında mezun oldum. Ardından Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı’nda başladığım yüksek lisans programından 2015 yılında mezun oldum. 2017 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım ve aynı Anabilim Dalı’nda 2019 yılından beri araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

EKLER



Ek 1

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

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2018/299				
	PROTOKOL ADI	Kafeinin Akrilamid Uygulanan İnsan Kaynaklı Hepatoma Hücrelerinde Protein Oksidasyonu ve Endoplazmik Retikulum Stresine Etkisi				
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Dr. Öğr. Üyesi Gülben SAYILAN ÖZGÜN				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ					
	DESTEKLEYİCİ					
KARAR BİLGİLERİ	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası			
	Karar No: 15/02	Tarih: 17.09.2018				
Fakültemiz Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Gülben SAYILAN ÖZGÜN'ün sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Tuğçe KARABAS'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenilmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevduatın oy birliği ile karar verilmiştir.						
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi					
ÜYELER						
Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Ragül KOSE ÇINAR Başkan Yardımcısı	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji A.D.	K	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Hasan ÜMIT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Cafer Sadık ZORKUN Üye	Kardiyoloji	T.Ü.T.F. Kardiyoloji A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOCAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Niyazi Cenk SAYIN Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Avukat Özden İPÇİ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E H	E H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan
Dekan Yard.