

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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Eray ÖZGÜN

**AKRİLAMİDİN İNSAN KAYNAKLI HEPATOMA
HÜCRELERİNDE PROTEİN YIKIM YOLLARI
ÜZERİNE ETKİLERİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Abdullah Yahya Salih AL-HAJM

Referans no: 10210499

EDİRNE - 2019

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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Eray ÖZGÜN

**AKRİLAMİDİN İNSAN KAYNAKLI HEPATOMA
HÜCRELERİNDE PROTEİN YIKIM YOLLARI
ÜZERİNE ETKİLERİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Abdullah Yahya Salih AL-HAJM

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2018/265

Tez no:

EDİRNE - 2019

T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde ve Dr. Öğretim Üyesi Eray ÖZGÜN' ün danışmanlığında Yüksek Lisans öğrencisi Abdullah Yahya Salih AL-HAJM' a ait tez başlığı "Akrilamidin İnsan Kaynaklı Hepatoma Hücrelerinde Protein Yıkım Yolları Üzerine Etkileri" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 27.05.2019 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN
JÜRİ BAŞKANI



Dr. Öğr. Üyesi Eray ÖZGÜN
ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Aliye ÇELİKKOL
ÜYE



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

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

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
AKRİLAMİD	3
HEPG2 HÜCRE HATTI	5
PROTEOSTAZ ve HÜCRE İÇİ PROTEİN YIKIM YOLLARI	5
GEREÇ VE YÖNTEMLER	9
BULGULAR	14
TARTIŞMA	20
SONUÇLAR	23
ÖZET	25
SUMMARY	27
KAYNAKLAR	29
ŞEKİLLER LİSTESİ	34
ÖZGEÇMİŞ	35
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

ATP	: Adenozin trifosfat
HSP70	: Isı şok proteini
LC3	: Mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3
MTT	: 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür

GİRİŞ

Akrilamid, günlük hayatta insanların maruz kalabildiği sağlıklı tehdit edici kimyasal maddelerden biridir. Akrilamidin polimerizasyonu ile oluşan poliakrilamid, tarımda, atık su arıtmada, endüstriyel olarak ve laboratuvarlarda kullanılmaktadır ve bu sektörlerde çalışan kişilerde farklı dozlarda ve sürelerde akrilamid maruziyeti görülebilmektedir (1). Bununla birlikte gıdaların yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi esnasında Maillard reaksiyonu ile de akrilamid oluşmakta ve bu durum çoğu insanda daha düşük dozlarda ancak kronik akrilamid maruziyetine neden olmaktadır (2).

Sindirim sistemi, solunum sistemi ve deri yolu ile vücuda alınan akrilamid esas olarak karaciğerde metabolize edilerek idrarla atılır. Karaciğerde metabolizması esnasında da toksik metabolitler ortaya çıkabilir (3). Akrilamid bir nörotoksindir ve deneysel çalışmalarda genotoksik, karsinojenik, reproduktif sisteme ve karaciğere toksik etkileri gösterilmiştir (3-5).

İnsan kaynaklı hepatoma hücreleri olan HepG2 hücreleri ölümsüz hücre hatlarından ve birçok plazma proteinini sentezleyebilen bu hücreler protein sentezi açısından primer hepatositlere benzemektedir (6). HepG2 hücreleri toksikoloji çalışmalarında kullanılabilir ve akrilamidin karaciğerdeki etkilerinin araştırılması için de kullanılmıştır (7,8).

Canlılığın ve sağlığın korunması için protein homeostazının sürdürülebilmesi gerekli olup bunun için de proteinlerin sentezinin, katlanması, taşınmasının ve yıkımlarının kontrolü şarttır (9). Moleküler şaperonlar, protein ile etkileşerek, onların fonksiyonel yapıda kalmasını sağlarlar ve ısı şok proteini 70 (HSP70) ailesi proteinlerin katlanma, disagregasyonunda ve yıkımında rol oynayan önemli şaperonlardan biridir (10).

Ubikitin-proteazom sistemi ve otofaji hücre içi temel protein yıkım yollarıdır (11). Ubikitin-proteazom sistemi protein yıkımının büyük kısmından sorumlu olup; daha çok kısa ömürlü, anormal, denatüre edilmiş ya da hasar görmüş proteinlerin yıkımında görev alır (12). Ubikitin hedef proteinlere kovalent olarak bağlanmasına ubikitinasyon adı verilir ve ubikuitin bağlı proteinler, 26S proteazomu tarafından tanınarak yıkılır (13). Otofaji ise, disfonksiyonel veya gerekli olmayan hücresel komponentlerin, çift membranlı veziküllerin oluşumu ile lizozomal olarak yıkım veya geri dönüşüm sürecidir (11).

Akrilamidin karaciğerde HSP70 düzeylerine, ubiquitin-proteazom sistemine veya otofajiye etkisini araştıran bir çalışmaya literatürde rastlamadık. Bu çalışmada akrilamidin insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde protein yıkım yolları üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

AKRİLAMİD

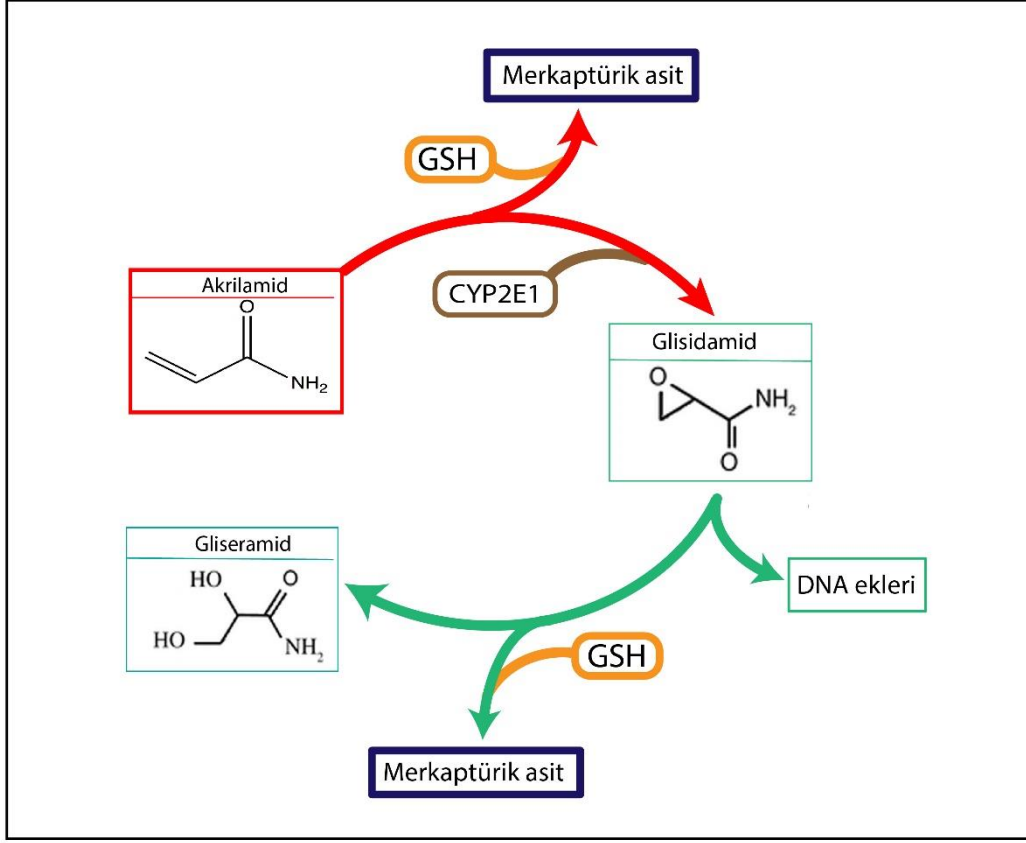
Akrilamid, 2-propenamid ve akrilik asit amid olarak da adlandırılmaktadır, beyaz renkli ve kristal formda bir maddedir. Molekül ağırlığı 71.08 gram olan akrilamid, polar olduğu için suda ve etanol ve metanol gibi polar çözücülerde iyi çözünür (14). Akrilamid hem nitril hidrataz gibi bakterilerden elde edilen enzimler kullanılarak hem de kimyasal reaksiyonlar ile akrilonitrilden üretilebilir. Akrilamidin polimerizasyonu ile oluşan poliakrilamid, tarımda, atık su arıtmada, kozmetik, kâğıt ve tekstil endüstrilerinde ve laboratuvarlarda elektroforezle proteinlerin ayrılması için sıklıkla kullanılmaktadır (1).

Akrilamid aynı zamanda gıdaların yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi esnasında Maillard reaksiyonu olarak adlandırılan asparagin aminoasidinin amino grubu ile şekerlerin karbonil grubunun reaksiyona girmesi ile de oluşabilmektedir (2). Pişirilmiş gıdalardaki akrilamid seviyeleri pişirme sıcaklığı ve süresi, nem içeriği ve çiğ gıdalardaki indirgen şeker ve asparagin miktarı gibi faktörler ile ilişkilidir (15). Genellikle çocukların ve ergenlerin, akrilamide daha fazla maruz kaldıkları bildirilmiştir (16).

Akrilamid Metabolizması

Akrilamid sindirim sistemi, solunum sistemi ve deri yolu ile vücuda alınabilir (17). Deriden akrilamid Emilimi diğer yollara göre çok daha düşüktür çünkü deri akrilamid Emilimini azaltan bir bariyer sağlar (18). Bununla birlikte, oral yolla alınan akrilamid ise hızla Emilir (19). Akrilamidin vücuttan uzaklaştırılmasında esas yol redüktif metabolik yoldur ve akrilamid glutatyon ile konjuge olur ve son ürün merkaptirik asit idrarla atılır. Ancak

akrilamidin sitokrom P450 2E1 enzimi tarafından oksidasyonu ile toksik metabolit glisidamid de meydana gelebilir (Şekil 1) (18).



Şekil 1. Akrilamidin kimyasal yapısı ve metabolizması (20)

GSH: glutasyon ; CYP2E1: Sitokrom P450 2E1

Akrilamidin zararlı etkileri

Sigara içenlerde ve sigara dumanına maruz kalanlarda akrilamidin hemoglobine eklenme ürünleri artmaktadır (21). Akrilamidin plasenta bariyerini geçme yeteneği, bebeklerde güvenliği ve potansiyel sağlık etkileri ile ilgili kaygılarını artırmaktadır (22).

Akrilamid bir nörotoksin olarak sınıflandırılmaktadır. Akrilamidin; kinezin-temelli hızlı aksonal taşınma, direkt nörotransmisyon inhibisyonu ve nörotransmitter seviyelerindeki değişimler gibi mekanizmalarla nörotoksisiteye sebep olduğu öne sürülmektedir (23). Akrilamidin deneysel çalışmalarda genotoksik, karsinojenik, reproduktif sisteme toksik etkileri gösterilmiştir (2). Ayrıca akrilamidin karaciğerde de hasara yol açabildiği hem deneysel çalışmalarda hem de bir intihar vakasında bildirilmiştir (4,5,24).

HEPG2 HÜCRE HATTI

HepG2 hücre hattı ilk olarak 15 yaşında Kafkasyalı bir erkeğin karaciğerinden alınan hepatoma hücrelerinden elde edilen ve günümüzde sıklıkla kullanılan hücre hatlarından biridir. HepG2 hücre hattı ölümsüz hücre hatlarından ve 55 kromozom çifti içerir. HepG2 hücreleri, tek tabaka olarak ve küçük agregatlar halinde büyüyen yapışık, epitel benzeri hücrelerdir (25).

Bu hücreleri protein sentezi açısından birçok yönden primer hepatositlere benzemektedir. Hücre kültürü koşulları altında, transferrin, plazminojen, albümin ve fibrinojenin ve apolipoproteinler gibi plazma proteinlerinin çoğunu sentezlemektedirler (26).

Bu insan kaynaklı hepatoma hücrelerinin genetik toksikolojide başarılı bir şekilde uygulanması, hücrelerin normal insan hepatositlerinin metabolizmasını yansıtan ksénobiyotik metabolizmasının enzimlerini sentezleme yeteneğine dayanmaktadır (27). Literatürde HepG2 hücreleri akrilamidin karaciğerdeki etkilerinin araştırılması için de kullanılmıştır (7,8).

PROTEOSTAZ ve HÜCRE İÇİ PROTEİN YIKIM YOLLARI

Memelilerin ribozomlarında 10000'den fazla farklı protein sentez edilmektedir. Bu proteinlerin görevlerini yerine getirebilmesi ve buna bağlı olarak memelilerde canlılığın ve sağlığın korunması için proteostazın, yani protein homeostazının, sürdürülebilmesi gereklidir. Proteostazın sürdürülebilmesi için de proteinlerin sentezinin, katlanmasının, taşınmasının ve yıkımlarının kontrolü şarttır (9). Ökaryotik hücrelerde proteinlerin doğru şekilde katlanmasında görevli ve proteinlerin hatalı katlanarak veya agregate olarak yıkılmalarını engelleyen moleküler şaperonlar bulunmakla birlikte esas olarak ubiquitin-proteazom sistemi ve otofaji olmak üzere iki ana hücre içi protein yıkım yolu bulunmaktadır (9,11).

Şaperonlar

Proteinler ribozomlarda düz aminoasit zincirleri şeklinde sentezlenirler ve biyolojik olarak fonksiyonel olabilmeleri için üç boyutlu yapılarını kazanmalıdırlar (28). Moleküler şaperon; başka bir protein ile, son yapısında bulunmadan, etkileşerek, onu stabilize ederek veya ona yardım ederek fonksiyonel yapıda kalmasını sağlayan proteinlerdir. Bu moleküler şaperon proteinlerin birçoğu moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılmakta olup stres proteini veya ışık şok proteinleri olarak da bilinmektedirler (9). Şaperonlar protein yıkım yolları ile de ilişkilidirler (10).

Isı şok proteini-70 ailesi: Hücrel proteostazın en önemli şaperon ailelerinden biri HSP70 ailesidir. HSP70 ailesinin sürekli sentezlenen; sitoplazma ve nükleusta bulunan ısı şok kognat proteini 70, endoplazmik retikulumda bulunan immünglobulin bağlayıcı protein ve mitokondride mortalin gibi izoformları varken, aynı zamanda hücrel stres ile uyarılabilen Isı şok protein A1A ve A1B gibi izoformları da bulunmaktadır (29). Proteinlere katlanmada, disagregasyonda ve yıkımda yardım ederler. HSP70 aktivitesi için adenosin trifosfat (ATP) gereklidir. Protein yıkım yolları olan ubiquitin-proteazom ve otofaji sistemleri ile yakın ilişkidir (10).

Ubikitin-proteazom Sistemi

Ubikitin-proteazom sistemi protein degradasyonunun büyük kısmından sorumludur. Daha çok kısa ömürlü, anormal, denatüre edilmiş ya da hasar görmüş proteinlerin yıkımından sorumludur (12). Hücre döngüsünün düzenlenmesi , apoptoz , reseptör aracılıklı sinyalizasyon ve endositoz gibi birçok önemli hücrel olayda anahtar rol oynar (30-33).

Ubikitin 8.5 kDa ağırlığında 76 aminoasitten oluşan bir proteindir ve hedef proteinlere kovalent olarak bağlanmasına ubiquitinasyon adı verilir (34). Bağlanma genellikle ubiquitininin glisinin karboksil grubu ile genellikle proteindeki lizinin amino grubu arasındadır. Proteine bağlı ubiquitine başka ubiquitinlerde eklenebilir ve bu durum eklenmesi poliubikitinasyon olarak adlandırılır (35).

Ubikitin proteine bağlanması üç aşamada gerçekleşir. Ubikitin, ilk olarak ubiquitin aktive edici enzime bağlanır. Ardından ubiquitin bağlayıcı enzime aktarılan ubiquitin, ubiquitin ligaz enzimi yardımıyla proteine bağlanır (36). Bu işlem geri dönüşümlüdür, deubikitinasyon yapan enzimler tarafından ubiquitin serbest bırakılabilir (37).

Ubikuitin bağlı protein, 26S proteazomu tarafından tanınarak yıkılır ve proteazom enzimleri tarafından küçük peptitlere veya amino asitlere parçalanır. 26S proteazom yaklaşık 2500 kDa ağırlığında bir proteaz kompleksidir, poliubikitinasyon ile işaretli proteinleri tanıyarak ATP-bağımlı bir mekanizma ile işaretli proteinlerin küçük peptitlere veya amino asitlere parçalanmasını sağlar. 26S proteazom; 20 S çekirdek parça olarak adlandırılan ve peptid bağı hidrolizi katalizleyen bir kompleks ile 19S düzenleyici parça olarak adlandırılan 20S proteazomun tarafından hidrolize yardımcı bir kompleks içerir (13). 26S proteazom aktivitesini düzenleyen mekanizmalar hala tam olarak anlaşılmasa da ATP aktivitenin devamlılığı için gereklidir. Hücreler stres faktörlerine maruz kaldığında ve ATP miktarı azaldığında, proteazom sistemi, proteinlerin ATP'den bağımsız bir yıkımına geçebilir ve/veya

otofaji düzenlenebilir (38). Anormal proteazom aktivitesi, kanser, nörodejeneratif bozukluklar, viral enfeksiyon, otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezi ile ilişkilidir (39).

Otofaji

Otofaji, disfonksiyonel veya gerekli olmayan hücrel komponentlerin, otofagosomlar olarak bilinen çift membranlı veziküllerin oluşumu ile lizozomal olarak, fizyolojik yıkım veya geri dönüşüm sürecidir. Hücrenin kendini yemesi olarak da bilinmektedir. Otofaji hücrenin hayatta kalmasında, gelişmesinde ve ölümünde rol oynar (40). Otofajinin makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılıklı otofaji olmak üzere 3 tipi tanımlanmıştır (41).

Makrotofajide hedef proteinler otofagosomların içine füzyon yoluyla alınır. Otofagosomlar daha sonra lizozomlarla birleşir ve bu oluşum fagolizozom olarak adlandırılır. Lizozomal enzimler tarafından fagolizozomun içeriği parçalanır (42).

Mikrotofaji, sitoplazmada bulunan hedef proteinlerin/komponentlerin direkt olarak lizozomal membrandan invajinasyonu ile lizozom içine alınarak parçalanmasıdır (43).

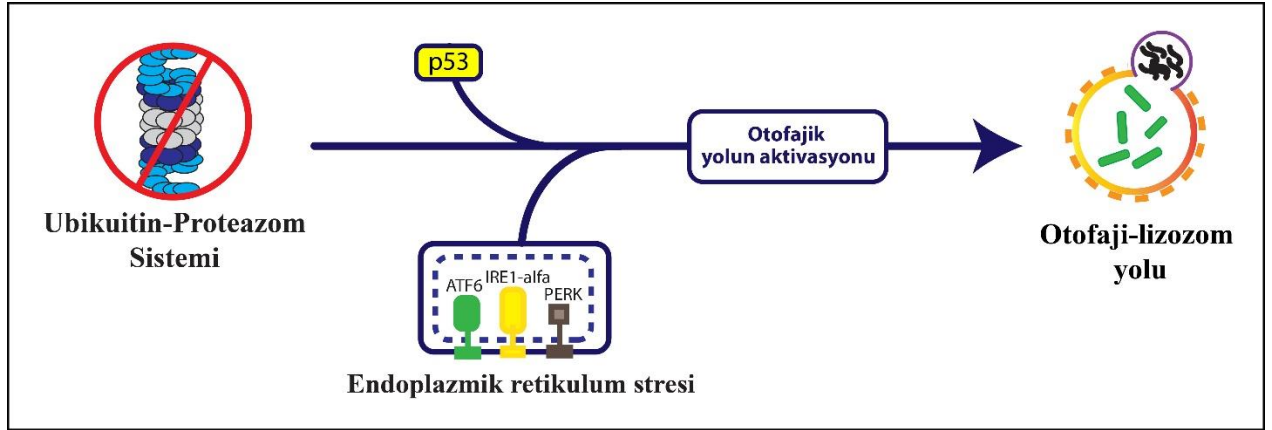
Şaperon aracılıklı otofajide yıkılacak protein sitoplazmada çözünür halde bulunmalıdır ve katlanma ile aminoasit diziliminde KFERQ dizisinin katlanması gereklidir. Isı şok kognat proteini 70, HSP70 ailesindedir. Isı şok kognat proteini yıkımı olacak proteinin KFERQ dizisine bağlanır ve proteinin lizozoma yönlendirilmesini sağlar, şaperon daha sonra lizozomal membrandaki spesifik bir reseptör olan lizozom membran ilişkili reseptör 2A'ya bağlanır ve lizozom içine aktarılır (38).

Mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3 (LC3) birçok memeli dokusunda bulunan çözünür bir proteindir. LC3 proteinin LC3A, LC3B ve LC3C olmak üzere üç varyantı bulunmaktadır. Otofaji esnasında sitozolik proteinler ve organeller otofagosomun içine girerlerken, sitoplazmik LC3 formu (LC3-I) fosfatidiletanolamin ile konjuge olarak LC3-II olarak adlandırılan formda otofagosom yapısına girer. Ardından otofagosomun lizozom ile birleşmesi ve lizozomal hidrolazlar ile LC3-II degrade olur ve bu yüzden otofajinin izlenmesinde bir belirteç olarak kullanılmaktadır (44).

Proteinler lizozomların içinde proteolitik enzimler tarafından hidroliz edilmektedir ve bu proteazların çoğu endopeptidazlar iken aynı zamanda daha az miktarda olmakla birlikte aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlar bulunur (45).

Otofaji; kanser, nörodejeneratif bozukluklar, miyopatiler, kalp ve karaciğer hastalıkları ve gastrointestinal hastalıkları gibi hastalıkların patogenezinde rol oynar (46). Otofajinin

düzenlenmesinde rapamisin memeli hedefi sinyal yolağı önemli rol oynamaktadır. Açlık, büyüme faktörlerinin yoksunluğu, endoplazmik retikulum stresi ve patojen kaynaklı enfeksiyonlar gibi hücrel stres koşullarında otofaji artar (47). Bununla birlikte otofaji, diğer hücre içi protein yıkım yolu olan ubiquitin-proteazom sistemindeki değişimlere bağlı olarak da düzenlenir (Şekil 2) (11).



Şekil 2. Otofajinin ubiquitin-proteozom sistemi tarafından düzenlenmesi (11)

ATF6: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6; **IRE1-alfa:** İnozitol gerektiren kinaz 1-alfa; **PERK:** Protein kinaz ribonükleik asit-benzeri endoplazmik retikulum kinaz

Ubiquitin-proteazom sisteminin inhibisyonunun endoplazmik retikulum stresini ve p53 düzeylerini arttırarak ve kompensatuvar olarak otofajinin aktivasyonuna yol açar. Diğer yandan, otofaji inhibisyonu ise ubiquitin-proteazom sistemini inhibe ettiği gösterilmiştir (11).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 17.09.2018 tarihinde TÜTF-BAEK 2018/298 protokol kodu ve 15/01 karar no ile onaylandı (Ek 1). Western blot membranlarının görüntülenmesi ve hücrelerin saklanması için gerekli sıvı azot temini için Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet satın alındı. Diğer tüm deneysel çalışmalar, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yapıldı.

DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Akrilamid (Sigma)

MG132 (Sigma)

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

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

Fetal sığır serumu (Thermo)

Antibiyotik-antimikotik (Thermo)

% 0.25 Tripsin-etilendiamin tetraasetik asit solüsyonu (Thermo)

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

Dimetil sülfoksit (Sigma)

Glisin (Sigma)

Sodyum klorür (Sigma)

Tuzlu fosfat tamponu tablet (Thermo)

Sodyum dodesil sülfat (Sigma)
Sodyum hidroksit (Merck)
N-etilmaleimid (Sigma)
İyodo asetamid (Sigma)
Etilendiamin tetraasetik asit (Sigma)
Sodyum florid (Merck)
Trizma baz (Sigma)
Bradford reaktifi (Abcam)
Sığır serum albumini (Sigma)
Tricine (Goldbio)
N,N-Metilen bis-akrilamid (Merck)
N,N,N,N-tetrametiletilendiamin (Sigma)
2-merkaptoetanol (Sigma)
Amonyum persülfat (Sigma)
Bromofenol blue (Sigma)
Tween 20 (Fischer)
Metanol (Merck)
Yağsız süt tozu (Sigma)
Pre-stained protein standardı (Thermo)
Poliviniliden diflorid membran (Roche)
Ubiquitin primer antikoru (Santa Cruz)
LC3B primer antikoru (Cell Signaling Technology)
HSP70 primer antikoru (Abcam)
Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz primer antikoru (Abcam)
Sekonder antikorlar (Abcam)
Kemilüminesans substrat (Thermo)

ANALİZLERDE KULLANILAN ALETLER VE DİĞER MALZEMELER

Sıvı azot tankı (Air Liquide GT21)
Santrifüjler (DLAB DM0412), (Nüve NF048), (Heraeus multifuge 3 S-R)
Mikrobiyolojik inkübatör (Thermo Scientific Heratherm IMC-18)
Biyogüvenlik kabini (Thermo Scientific Safe 2020)
Karbondioksitli inkübatör (Thermo Scientific Forma Steri-cycle 371)

Faz kontrast invert mikroskop (Olympus CKX 53)
Hassas terazi (Sartorius)
Vorteks (VELP)
pH metre (Inolab)
Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Daihan Scientific WiseStir)
Mikroplaka okuyucu (Biotek µQuant)
Dikey elektroforez sistemi (Cleaver Scientific Omnipage Mini Vertical System)
Western blotting sistemi (Cleaver Scientific Semi Dry Blotter)
Güç kaynağı (Cleaver Scientific)
Çalkalayıcı (Cleaver Scientific CW23)
-80 °C derin dondurucu (Heraeus HERAfreeze)
Kemilüminesans görüntüleme sistemi (Bio-rad ChemiDoc MP Imaging System)
Su banyosu (GFL 1083)
Otomatik pipetler (Eppendorf)
96 kuyucuklu plaka (SPL)
75 cm² flask (Nest)
Steril şırınga filtre (Biosorfa)
Hücre kazıyıcı (Biosorfa)
Steril serolojik pipetler 5, 10 ve 25 ml (Isolab)
Steril otomatik pipet uçları (Isolab)
Steril santrifüj tüpü 15 ve 50 ml (Isolab)
Beher (Isolab)
Mezür (Isolab)
Balon joje (Isolab)

TEMEL HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI

Hücreler %10 fetal sığır serumu ve %1 antibiyotik-antimikotik içeren Eagle'ın minimum esansiyel medyumu ile %5 CO₂'li ortamda 37°C'de inkübatörde yaşatıldı. Hücrelere tüm uygulamalar yatay hava akışlı biyogüvenlik kabini içerisinde steril malzemeler kullanılarak yapıldı. Deneylede 11-18 arası hücre pasajları kullanıldı. Hücreler 75 cm² flasklarda çoğaltıldı. Hücrelerin haftada iki kez medyumu değiştirildi ve %80-90 hücre yoğunluğuna ulaşıldığında 1:4 veya 1:6 oranında pasajlandı.

HÜCRE CANLILIĞI TESTİ

Akrilamidin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi MTT hücre canlılığı testi ile gösterildi (48,49). 96 kuyucuklu plakalarda her bir kuyucuğa 10000 adet hücre ekildi. Hücreler 24 saat boyunca 10^1 , 10^2 , 10^3 ve 10^4 μM konsantrasyonlarda akrilamid ile inkübe edildi. Akrilamid medyumda çözüldü. İnkübasyon sonrası medyum alınarak yerine 10 μl MTT (5 mg/mL, tuzlu fosfat tamponunda çözüldü) ve 100 μl fenol red içermeyen Eagle'ın minimum esansiyel medyumunu konuldu ve 4 saat inkübe edildi. MTT içeren medium alınarak oluşan formazan 200 μl dimetil sülfoksit ve 25 μl Sorenson tamponu (0.1 M glisin ve 0.1 M sodyum klorür; 0.1 M sodyum hidroksit ile pH:10.5'e ayarlandı) ile çözüldü ve oluşan renk mikropılaka okuyucuda spektrofotometrik olarak 570/630 nm'de ölçüldü. Ölçülen absorpsanslar kontrol grubunun ortalamasına bölünerek sonuçlar aynı plakadaki kontrol grubunun yüzdesi olarak verildi.

DİKEY ELEKTROFOREZ VE WESTERN BLOTTING YÖNTEMLERİ

Akrilamid ile deneysel prosedür uygulandı ve ek olarak proteazom inhibitörü olan 2 μM MG132 ile 24 saat inkübe edilen hücreler western blotting yönteminde antikörlerin pozitif kontrolü olarak kullanıldı. Deneysel prosedür sonrası hücreler soğuk tuzlu fosfat tamponu ile iki kez yıkandı. Hücreler %1 sodyum dodesil sülfat, 50 mM etilendiamin tetraasetik asit, 10 mM N-etilmaleimid, 10 mM iyodo asetamid, 50 mM sodyum florid içeren tris tamponu (pH:8.0) ile homojenize edildi. Protein düzeyleri ticari Optiblot Bradford reaktifi ile standart olarak sığır serum albumini kullanılarak ölçüldü (50). LC3B ve HSP70 proteinleri için %4-10 tricine-jel elektroforezi (51), ubikitinlenmiş proteinlerin ölçümü için ise %4-12 bis-tris jel elektroforezi yapıldı (52). Tüm ölçümler için 20 μg protein yüklendi. Elektroforez sonrası jelde ayrılan proteinler yarı-ıslak western blotting sistemi kullanılarak poliviniliden diflorid membrana aktarıldı. %5 Yağsız süt tozu ile bloklanan membranlar gece boyu +4 °C'de primer antikörler (LC3B için 1:1000, HSP70 için 1:10000 ve ubikitin için 1:500) ile inkübe edildi. Ardından primer antikör ile uyumlu sekonder antikörler (tümü için; 1:10000) ile inkübe edilen membranlardaki spesifik proteinler kemilüminesans substrat ile görüntülendi. Ardından membranlar stripping yapıldı ve membranlar yükleme kontrolü olarak seçilen gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenazın primer antikörü (1:10000) ile inkübe edilerek prosedür tekrarlandı. Elde edilen bantlara ait yoğunluklar Image-J programı kullanılarak hesaplandı (53) ve her bir proteine ait sonuç aynı numunenin gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz sonucuna

oranlandı. Herbir grup için sonuçlar aynı deneydeki ve membrandaki kontrol grubuna oranlanarak kontrol grubunun katı olarak verildi.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

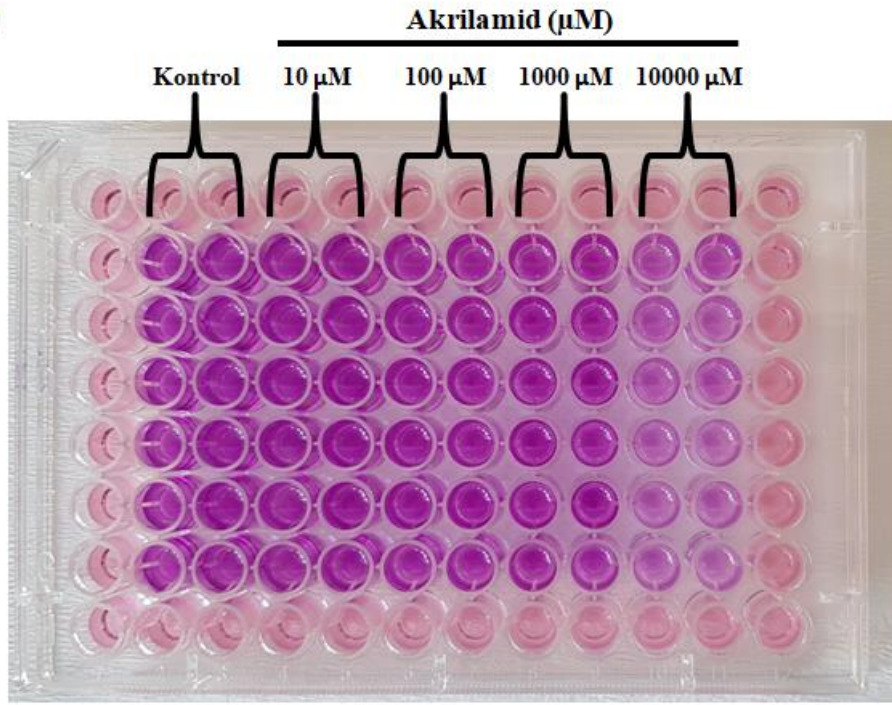
İstatistiksel analizler SPSS 20 programı (Lisans no: 10240642) kullanılarak gerçekleştirildi. Deney parametrelerinin karşılaştırılması için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edildi ve $p<0.05$ istatistiksel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



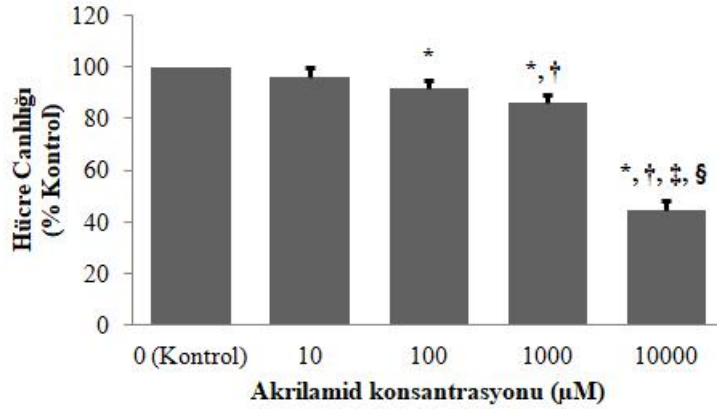
BULGULAR

Akrilamidin HepG2 hücrelerinde, hücre canlılığına etkisi MTT hücre canlılık testi ile belirlenmiş olup deneysel tekrarlardan birine ait resim Şekil 3A'da ve hücre canlılığı sonuçları ise Şekil 3B'de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası kontrole göre hücre canlılıkları 10^1 μ M akrilamid uygulanan hücrelerde 96 ± 3 , 10^2 μ M akrilamid uygulanan hücrelerde 92 ± 3 , 10^3 μ M akrilamid uygulanan hücrelerde 86 ± 3 ve 10^4 μ M akrilamid uygulanan hücrelerde 45 ± 4 bulundu. 10^2 , 10^3 ve 10^4 μ M akrilamid hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak azalttı (tümü için $p < 0.05$). 10^3 μ M akrilamid hücre canlılığını 10^1 μ M akrilamide göre anlamlı olarak azalttı ($p < 0.05$). 10^4 μ M akrilamid hücre canlılığını 10^1 , 10^2 ve 10^3 μ M akrilamide göre anlamlı olarak azalttı (tümü için $p < 0.05$).

A)



B)



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

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

*: Kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

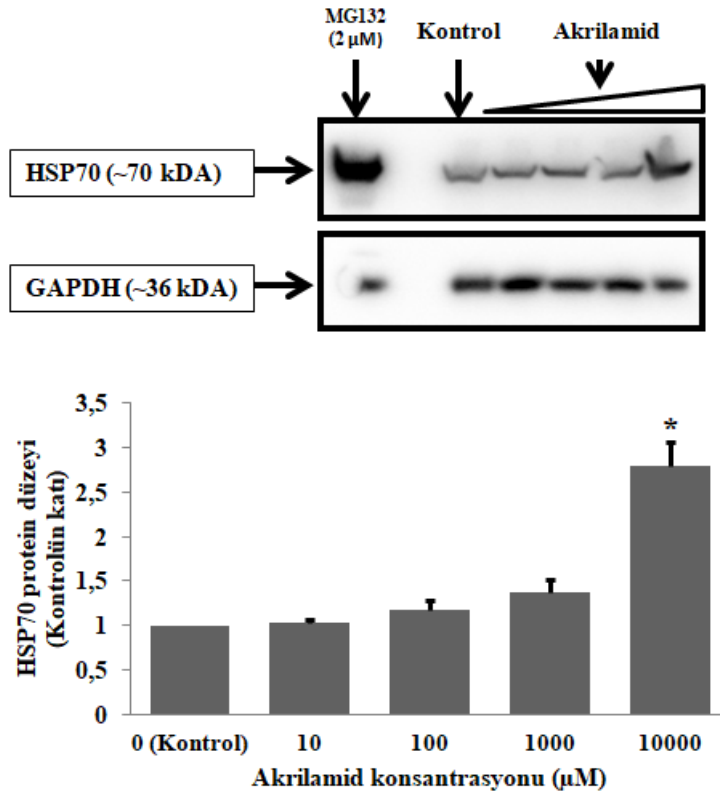
†: 10 µM akrilamid ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

‡: 100 µM akrilamid ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

§: 1000 µM akrilamid ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

Şekil 3. Akrilamidin hücre canlılığına etkisi

Akrilamidin HepG2 hücrelerinde, HSP70 protein düzeylerine etkisi Şekil 4'de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası HSP70 protein düzeyleri; 10^1 µM akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 1.03 ± 0.03 katı, 10^2 µM akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 1.17 ± 0.12 katı, 10^3 µM akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 1.38 ± 0.14 katı ve 10^4 µM akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 2.79 ± 0.26 katı olarak bulundu. 10^4 µM akrilamid, HSP70 protein düzeylerini kontrole, 10^1 , 10^2 ve 10^3 µM akrilamide göre anlamlı olarak arttırdı (tümü için $p < 0.05$).

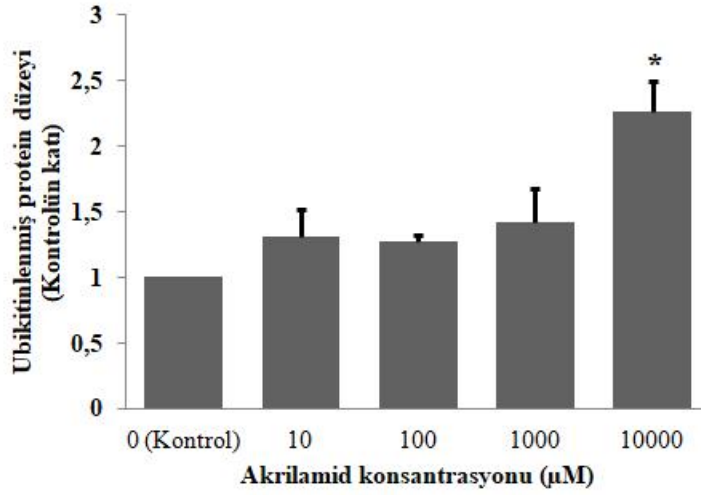
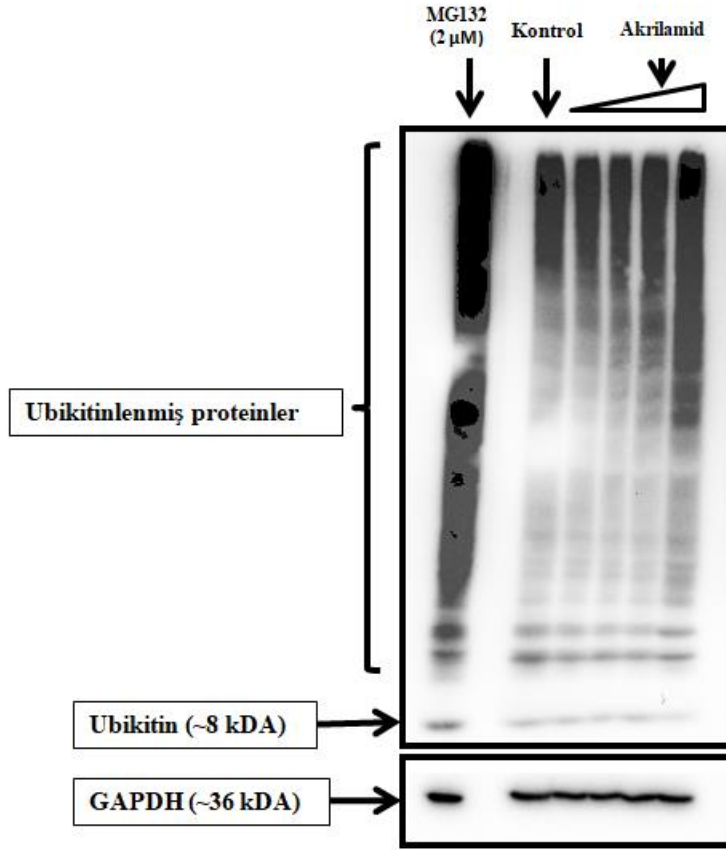


Sonuçlar 3 bağımsız deneysel tekrar için ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi (n=3). İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı. *: Kontrol, 10, 100 ve 1000 μM akrylamid ile karşılaştırıldığında p<0.05.

Şekil 4. Akrylamidin ısı şok proteini 70 düzeylerine etkisi

HSP70: Isı şok proteini 70; **GAPDH:** Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz.

Akrylamidin HepG2 hücrelerinde, ubikitinlenmiş protein düzeylerine etkisi Şekil 5’de görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası ubikitinlenmiş protein düzeyleri; 10¹ μM akrylamid uygulanan hücrelerde kontrolün 1.31±0.21 katı, 10² μM akrylamid uygulanan hücrelerde kontrolün 1.27±0.06 katı, 10³ μM akrylamid uygulanan hücrelerde kontrolün 1.42±0.26 katı ve 10⁴ μM akrylamid, uygulanan hücrelerde kontrolün 2.26±0.23 katı olarak bulundu. 10⁴ μM akrylamid ubikitinlenmiş protein düzeylerini kontrole, 10¹, 10² ve 10³ μM akrylamide göre anlamlı olarak arttırdı (tümü için p<0.05).



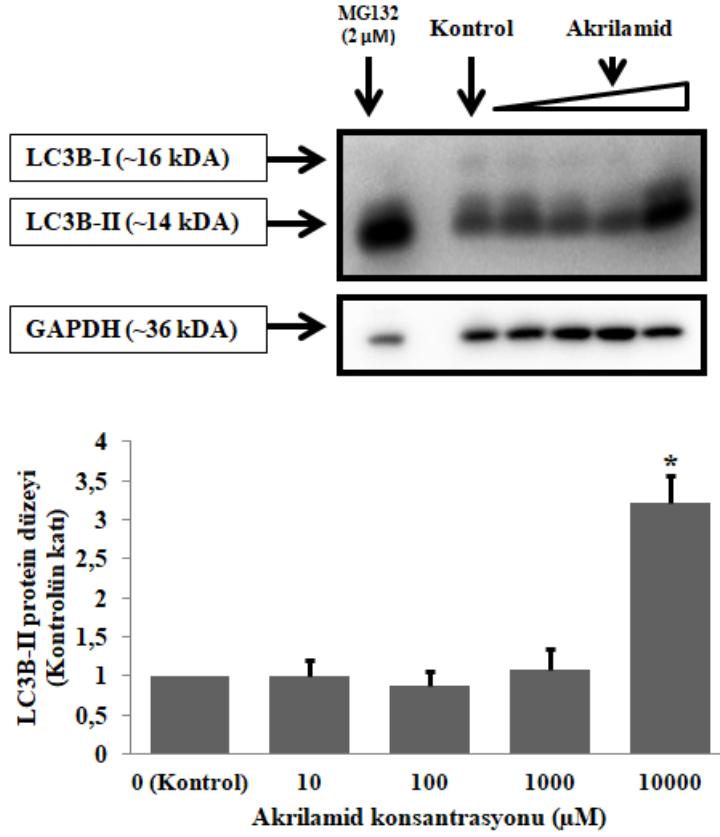
Sonuçlar 3 bağımsız deneysel tekrar için ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi (n=3). İstatistiksel analiz için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı. *: Kontrol, 10, 100 ve 1000 μ M akrilamid ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

Şekil 5. Akriamidin ubikitinlenmiş protein düzeylerine etkisi

GAPDH: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz.

Akriamidin HepG2 hücrelerinde, LC3B-II protein düzeylerine etkisi Şekil 6'da görülmektedir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulama sonrası LC3B-II protein düzeyleri; 10^1 μ M akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 0.99 ± 0.22 katı, 10^2 μ M

akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 0.87 ± 0.19 katı, $10^3 \mu\text{M}$ akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 1.07 ± 0.28 katı ve $10^4 \mu\text{M}$ akrilamid uygulanan hücrelerde kontrolün 3.22 ± 0.34 katı olarak bulundu. $10^4 \mu\text{M}$ akrilamid, LC3B-II protein düzeylerini kontrole, 10^1 , 10^2 ve $10^3 \mu\text{M}$ akrilamide göre anlamlı olarak arttırdı (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, 10, 100 ve 1000 μM akrilamid ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

Şekil 6. Akrlamidin mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3-II düzeylerine etkisi

LC3B: mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3; **GAPDH:** Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz.

Çalışmamızdaki hücre canlılığı, HSP70 protein, ubiquitinlenmiş protein ve LC3B protein düzeylerinin ölçümlerine ait tüm sonuçlar Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1. Çalışmaya ait tüm sonuçlar

		KONTROL	10 µM AKRİLAMİD	100 µM AKRİLAMİD	1000 µM AKRİLAMİD	10000 µM AKRİLAMİD	
HÜCRE CANLILIĞI (% KONTROL)	1. TEKRAR	1	111.77	96.88	90.54	90.71	68.64
		2	123.58	93.97	91.91	80.62	58.37
		3	95.16	99.96	99.96	85.07	53.92
		4	95.51	106.97	109.88	88.83	38.51
		5	92.77	100.30	94.65	90.03	36.80
		6	98.07	91.06	84.04	73.60	31.66
		7	98.07	99.96	91.40	91.91	70.00
		8	97.56	100.47	95.85	89.86	59.39
		9	103.72	107.66	86.95	87.29	53.74
		10	91.57	96.36	92.08	81.99	43.99
		11	101.16	94.99	96.02	82.33	38.34
		12	91.06	86.78	80.27	69.66	34.23
	2. TEKRAR	1	104.23	94.78	87.01	90.06	55.31
		2	99.50	96.00	86.55	95.09	45.56
		3	99.81	101.33	92.04	97.37	42.06
		4	101.33	106.82	90.51	98.59	37.33
		5	95.54	95.39	101.18	87.47	36.11
		6	100.11	90.82	84.27	86.55	42.36
		7	95.54	101.49	89.90	96.15	61.71
		8	95.54	97.98	90.51	81.98	42.51
		9	96.46	114.74	89.14	97.98	49.07
		10	98.74	102.40	89.60	78.02	35.81
		11	111.85	97.98	98.44	99.66	40.08
		12	101.33	99.20	86.25	72.84	36.27
	3. TEKRAR	1	110.11	94.71	92.38	89.27	58.16
		2	101.56	91.91	87.09	82.27	55.21
		3	102.64	86.31	85.07	79.63	35.30
		4	101.71	97.20	85.85	88.18	41.99
		5	100.47	94.25	85.07	94.40	45.41
		6	91.60	92.07	90.51	79.63	57.85
		7	100.00	96.42	91.14	89.42	53.03
		8	95.65	91.91	88.80	81.49	38.41
		9	90.05	83.51	80.40	74.03	34.21
		10	95.18	88.80	83.67	77.45	34.99
		11	106.53	92.69	93.00	79.00	35.93
		12	104.51	97.36	96.73	84.29	53.03
	4. TEKRAR	1	107.44	99.82	103.49	83.61	42.30
		2	101.23	99.96	95.31	73.88	41.73
		3	77.55	100.67	95.73	114.21	34.40
		4	100.81	102.93	102.22	92.35	39.20
		5	103.07	107.72	101.23	116.74	54.85
		6	75.01	85.02	78.53	69.65	33.84
		7	100.11	96.16	95.73	83.47	40.18
		8	98.41	88.83	82.90	90.38	38.63
		9	102.64	93.34	87.56	79.38	26.51
		10	107.16	93.76	93.34	79.24	35.67
		11	112.80	97.43	113.08	92.35	49.07
		12	113.78	83.89	101.52	63.73	48.64
		KONTROL	10 µM AKRİLAMİD	100 µM AKRİLAMİD	1000 µM AKRİLAMİD	10000 µM AKRİLAMİD	
HSP70 PROTEİN (KONTROLÜN KATI)	1. TEKRAR	1.00	1.07	1.29	1.38	2.99	
	2. TEKRAR	1.00	1.00	1.05	1.24	2.90	
	3. TEKRAR	1.00	1.02	1.18	1.52	2.49	
		KONTROL	10 µM AKRİLAMİD	100 µM AKRİLAMİD	1000 µM AKRİLAMİD	10000 µM AKRİLAMİD	
UBİKİTİNLENMİŞ PROTEİN (KONTROLÜN KATI)	1. TEKRAR	1.00	1.51	1.33	1.52	2.50	
	2. TEKRAR	1.00	1.09	1.27	1.61	2.25	
	3. TEKRAR	1.00	1.31	1.21	1.12	2.03	
		KONTROL	10 µM AKRİLAMİD	100 µM AKRİLAMİD	1000 µM AKRİLAMİD	10000 µM AKRİLAMİD	
LC3B PROTEİN (KONTROLÜN KATI)	1. TEKRAR	1.00	1.10	0.80	1.07	2.82	
	2. TEKRAR	1.00	0.74	0.73	0.79	3.42	
	3. TEKRAR	1.00	1.13	1.09	1.35	3.40	

HSP70: Isı şok protein 70; **LC3B:** Mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B hafif zincir 3B.

TARTIŞMA

Akrilamid hem farklı endüstrilerde hem de laboratuvarlarda sıklıkla kullanılmakta olan bir kimyasaldır (1). Bununla birlikte akrilamidin gıdaların yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi esnasında da oluşabildiği ve sigara dumanında da bulunduğu gösterilmiştir (2,21). Sindirim sistemi, solunum sistemi veya deri yolu ile vücuda alınan akrilamid esas olarak karaciğerde metabolize edilmektedir. Akrilamid maruziyetinin doza ve süreye bağlı olarak sinir sistemi ve karaciğer gibi dokulara toksik etkilerinin bulunduğu ve kanser riskini de arttırabildiği bildirilmiştir (2,4,54).

Proteinler hücre canlılığının sürdürülmesi için gerekli ve önemli rollere sahip moleküllerdir. Hücrelerin canlılığını sürdürmesi hücre içi protein dengesine yani hem yeni proteinlerin sentezlemesine hem de hatalı katlanmış, yapısı bozulmuş veya artık proteinlerin de tekrar düzenlenmesi veya yıkımının gerçekleşmesine bağlıdır (42). HSP70 protein ailesinde yer alan proteinler şaperon olarak rol oynayarak hatalı katlanmış proteinlerin tekrar katlanmalarının düzenlenmesinde rol oynar (55). Hücre içi protein yıkımı ise esas olarak ubiquitin-proteazom sistemi ve otofaji ile gerçekleşir (11). Literatürde akrilamidin karaciğerde HSP70 düzeylerine, ubiquitin-proteazom sistemine veya otofajiye etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık.

Çalışmamızın amacı, insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde akrilamidin protein yıkım yolları üzerine etkilerini araştırmaktır.

Çalışmamızda in-vitro karaciğer modeli olarak birçok yönden hepatositlere benzer özellik göstermesi, ölümsüz bir hücre hattı olması nedeniyle kolay çoğalması ve çok sayıda hücre elde edilebilmesi (7,8) sebepleriyle HepG2 hücreleri kullanılmıştır. Ayrıca, akrilamidin

geniş bir doz aralığındaki etkisini incelemek için tüm deneylerde HepG2 hücreleri 24 saat süreyle 10^1 , 10^2 , 10^3 ve 10^4 μM akrilamid ile inkübe edildi.

Akrilamid 10^1 μM konsantrasyonda hücre canlılığını değiştirmezen; 10^2 , 10^3 ve 10^4 μM konsantrasyonlarda ise hücre canlılığını azalttı. Bu bulgumuz akrilamidin özellikle yüksek dozlarda karaciğer hücrelerine toksik olduğunu göstermektedir. Çalışmamızla benzer şekilde Chu ve ark. (56) akrilamidin yüksek dozlarda HepG2 hücrelerinde sitotoksisite oluşturduğunu bildirmiştir. Shan ve ark. (7) ise çalışmamızdan farklı olarak 10^2 μM 'a kadar olan akrilamid konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerinde proliferasyona yol açtığını bildirilmiştir.

Karaciğerde akrilamidin HSP70 düzeyine etkisi ilk kez bu çalışma ile insan hepatoma hücreleri kullanılarak gösterilmiştir. Çalışmamızda HepG2 hücrelerine 10^4 μM akrilamid uygulaması HSP70 düzeyini anlamlı olarak arttırdı. Literatürde Saito ve ark. (57) insan serviks kanseri hücresi olan HeLa hücrelerinde akrilamidin 10^4 μM konsantrasyonda, Sumizawa ve ark. (58) ise insan nöroblastoma hücresi olan SH-SY5Y hücrelerinde akrilamidin 4×10^3 μM konsantrasyonda HSP70 düzeylerini arttırdığını bildirmiş olup bu çalışmalar bulgularımızı destekler niteliktedir. Akrilamidin 10^4 μM konsantrasyonda HSP70 düzeyini arttırması hücrel stresin artmasına ve/veya protein katlanmasında bozukluklara bağlı olabilir. Çalışmamızda akrilamidin 10^4 μM konsantrasyonda hücre canlılığını yüksek oranda azaltmasında hücrel stresteki artışın rolü olabilir.

Akrilamidin ubiquitin-proteazom sistemi üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Bu çalışma ile akrilamidin ubiquitin-proteazom sistemine etkisi ilk kez insan hepatoma hücrelerinde ubikitinlenmiş protein düzeyleri ölçümü ile gösterilmiştir. Akrilamid 10^4 μM konsantrasyonda ubikitinlenmiş protein düzeylerini anlamlı olarak arttırdı. Bu bulgumuz ubiquitin-proteazom sisteminin inhibisyonunu göstermektedir ve bu durum yanlış katlanmış proteinlerin miktarının artmasına bağlı olabilir. Çünkü yanlış katlanmış proteinlerin miktarının artmasının, ubiquitin-proteazom sisteminin inhibisyonuna neden olabildiği gösterilmiştir (59). Çalışmamızda proteinlerin doğru katlanmasında görev alan HSP70 düzeyinin de aynı konsantrasyonda artması bu düşüncemizi destekler niteliktedir. Akrilamidin ubiquitin-proteazom sistemini inhibe etmesi hücre içi glutatyon düzeylerini azaltmasına da bağlı olabilir çünkü karaciğerde akrilamid metabolizması esnasında, hücre içi redoks durumunun ayarlanmasında önemli bir molekül olan glutatyon kullanılmaktadır (60-62). Ayrıca düşüncemizi destekler nitelikte, Lamy ve ark. (62) 5×10^3 μM akrilamidin HepG2

hücrelerinde glutatyon düzeyini azalttığını ve Jahngen-Hodge ve ark. (60) ise glutatyon oksidasyonunun ubiquitin-proteazom sisteminin enzimlerini inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Bu çalışma ile akrilamidin karaciğerde otofaji üzerine etkisi ilk kez bu çalışma ile otofaji belirteci olan LC3B-II protein düzeylerinin ölçümü ile gösterilmiştir. Çalışmamızda HepG2 hücrelerine 10^4 μ M akrilamid uygulaması LC3B-II düzeyini anlamlı olarak arttırdı. Bu bulgumuz akrilamidin 10^4 μ M konsantrasyonda otofajiyi arttırdığını göstermektedir. Bulgularımızla uyumlu olarak, Song ve ark. (63) insan nöroblastoma hücresi olan SH-SY5Y hücrelerinde 2.5×10^3 ve 5×10^3 μ M akrilamidin konsantrasyonlarında otofajiyi arttırdığını bildirmişlerdir. Akrilamidin otofajiyi arttırması, ubiquitin-proteazom sisteminin inhibisyonundan kaynaklanmış olabilir. Çünkü protein yıkımının ubiquitin-proteazom sisteminin inhibisyonu ile bozulması sonucu kompanzasyon mekanizmaları ile otofajinin indüklendiği bilinmektedir (11).

Sonuç olarak çalışmamız akrilamidin HepG2 hücrelerinde; hücre canlılığını azalttığını, HSP70, ubiquitinlenmiş protein ve LC3B düzeylerini arttırdığını gösterdi. Bu çalışma ile insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde akrilamidin özellikle yüksek konsantrasyonlarda karaciğerde protein yıkım yollarının çalışmasını bozduğu gösterilmiştir.

Akrilamidin akut etkisinin araştırıldığı çalışmamızda özellikle yüksek dozlarda akrilamidin protein yıkım yollarını daha fazla etkilemesi, besinlerle alım gibi düşük konsantrasyonlardan ziyade yüksek konsantrasyonlardaki (genellikle mesleki) maruziyetlerin karaciğer protein yıkım yollarında bozulmaya ve toksisiteye yol açabileceğini göstermektedir. Ancak kronik olarak özellikle düşük dozlardaki maruziyetin, karaciğerde protein yıkım yolları üzerine etkisinin gösterilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

Bu çalışmanın amacı, insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde akrilamidin protein yıkım yolları üzerine etkilerinin araştırmaktır. Bu amaçla HepG2 hücreleri 24 saat boyunca 10^1 , 10^2 , 10^3 ve 10^4 μM akrilamid ile inkübe edildi. Akrilamidin hücre canlılığına etkisi MTT hücre canlılık testi ile; HSP70, ubikitinlenmiş protein ve LC3B düzeyleri dikey elektroforez ve ardından western blotting yöntemleri ile ölçüldü. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar şunlardır:

1. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10^2 μM akrilamid, hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak azalttı.
2. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10^3 μM akrilamid, hücre canlılığını kontrole ve 10^1 μM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
3. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10^4 μM akrilamid, hücre canlılığını kontrol, 10^1 , 10^2 ve 10^3 μM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak azalttı.
4. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10^4 μM akrilamid, HSP70 protein düzeylerini kontrol, 10^1 , 10^2 ve 10^3 μM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak arttırdı.
5. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10^4 μM akrilamid, ubikitinlenmiş protein düzeylerini kontrol, 10^1 , 10^2 ve 10^3 μM akrilamid uygulanan hücrelere göre anlamlı olarak arttırdı.

6. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 10^4 μM akrilamid, LC3B-II protein düzeylerini kontrol, 10^1 , 10^2 ve 10^3 μM akrilamid uygulanan hücelere göre anlamlı olarak arttırdı.

Sonuç olarak çalışmamız akrilamidin HepG2 hücrelerinde; hücre canlılığını azalttığını, HSP70, ubikitinlenmiş protein ve LC3B düzeylerini arttırdığını gösterdi. Bu çalışma ile insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde akrilamidin özellikle yüksek konsantrasyonlarda karaciğerde protein yıkım yollarının çalışmasını bozduğu gösterilmiştir.



ÖZET

Proteinlerin sentezinin, katlanmasının, taşınmasının ve yıkımlarının kontrolü proteostazın sürdürülmesi için şarttır. Hücre içi protein yıkımı ubiquitin-proteazom sistemi ve otofaji sistemi tarafından gerçekleştirilmektedir. Mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3B protein otofaji markırlarından biridir ve fosfatidiletanolamin ile konjuge olarak mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3B-II olarak adlandırılan formda otofagazom yapısına girer. Isı şok proteini 70; proteinlerin katlanma, disagregasyonunda ve yıkımında rol oynayan önemli bir şaperondur. Literatürde karaciğerde akrilamidin ısı şok proteini 70 düzeylerine, ubiquitin-proteazom sistemine veya otofajiye etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Bu çalışmada, insan kaynaklı hepatoma hücrelerinde akrilamidin protein yıkım yolları üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Akrilamidin etkisinin araştırılması amacıyla HepG2 hücreleri 24 saat boyunca 10^1 , 10^2 , 10^3 ve 10^4 μM konsantrasyonlarda akrilamid ile inkübe edildi. Hücre canlılığı 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür testi ile değerlendirildi. Isı şok proteini 70, ubiquitinlenmiş protein ve mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3B-II protein düzeyleri western blot yöntemiyle ölçüldü.

Akrilamid, 10^2 , 10^3 ve 10^4 μM konsantrasyonlarda hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı. 10^4 μM akrilamid; ısı şok proteini 70, ubiquitinlenmiş protein ve mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3B-II protein düzeylerinde anlamlı azalmaya yol açtı.

Sonuç olarak, çalışmamız akrilamidin HepG2 hücrelerinde; hücre canlılığını azalttığını, ısı şok proteini 70, ubiquitinlenmiş protein ve mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3B protein düzeylerini arttırdığını gösterdi. Bu çalışma ile insan kaynaklı

hepatoma hücrelerinde akrilamidin özellikle yüksek konsantrasyonlarda protein yıkım yollarının çalışmasını bozduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, HepG2, ısı şok proteini 70, ubiquitin-proteazom sistemi, otofaji



EFFECTS OF ACRYLAMIDE ON PROTEIN DEGRADATION PATHWAYS IN HUMAN-DERIVED HEPATOMA CELLS

SUMMARY

The control of synthesis, folding, transporting and degradation of proteins is essential for maintaining proteostasis. The degradation of intracellular proteins are performed by ubiquitin-proteasome system and autophagy. Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B is an autophagy marker and enters to autophagosome structure by its conjugated form with phosphatidylethanolamine which is called as microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3-II. Heat shock protein 70 is an important chaperone which plays role on the folding, disaggregation and degradation of proteins. In literature, we did not encounter any study which investigates the effect of acrylamide on heat shock protein 70 levels, ubiquitin-proteasome system or autophagy in liver. In present study, we aimed to investigate the effect of acrylamide on protein degradation pathways in human-derived hepatoma cells.

In order to investigate the effects of acrylamide, HepG2 cells were incubated with acrylamide at 10^2 , 10^3 ve 10^4 μM concentrations for 24 hours. Cell viability was evaluated by 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay. Heat shock protein 70, ubiquitinated protein and microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B protein levels were measured by western blotting. Acrylamide at 10^2 , 10^3 ve 10^4 μM concentrations significantly decreased cell viability. 10^4 μM acrylamide caused a significant increase on heat shock protein 70, ubiquitinated protein and microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B-II protein levels.

As a result, our study showed that acrylamide decreases cell viability and increases heat shock protein 70, ubiquitinated protein and microtubule-associated protein 1A/1B lightchain 3B-II protein levels in HepG2 cells. With the present study, it has been shown that acrylamide, especially at high concentrations, disrupts protein degradation pathways in human-derived hepatoma cells.

Key words: Acrylamide, HepG2, heat shock protein 70, ubiquitin-proteasome system, autophagy.



KAYNAKLAR

1. Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J Agric Food Chem* 2003;51(16):4504-26.
2. Pruser KN, Flynn NE . Acrylamide in health and disease. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011;3:41-51.
3. Fennell TR, Friedman MA. Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents. *Adv Exp Med Biol* 2005;561:109-16.
4. Mohammadi AB, Noshad H, Ostadi A, Ghaffari AR, Nahandi MZ, Mohammadi AB. Successful Treatment of Acute Lethal Dose of Acrylamide Poisoning. *Iranian Journal of Toxicology* 2015;9(28):1284-6.
5. Mahmood SA, Amin KA, Salih SF. Effect of acrylamide on liver and kidneys in albino wistar rats. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2015;4(5):434-44.
6. Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980;209(4455):497-9.
7. 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.
8. Azari A, Shokrzadeh M, Zamani E, Amani N, Shaki F. Cerium oxide nanoparticles protects against acrylamide induced toxicity in HepG2 cells through modulation of oxidative stress. *Drug Chem Toxicol* 2019;42(1):54-9.
9. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 2011;475(7356):324-32.
10. Fernández-Fernández MR, Valpuesta JM. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. *F1000Res* 2018;7:F1000 Faculty Rev-1497.

11. Chang Hoon Ji, Yong Tae Kwon. Crosstalk and interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Mol Cells* 2017;40(7):441–9.
12. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994;78(5):761-71.
13. Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* 2009;78:477-513.
14. Semla M, Goc Z, Martiniaková M, Omelka R, Formicki G. Acrylamide: a common food toxin related to physiological functions and health. *Physiol Res.* 2017;66(2):205-17.
15. Virk-Baker MK, Nagy TR, Barnes S, Groopman J. Dietary acrylamide and human cancer: a systematic review of literature. *Nutr Cancer* 2014;66(5):774-90.
16. Dybing E, Farmer PB, Andersen M, Fennell TR, Lalljie SP, Müller DJ, Olin S, Petersen BJ, Schlatter J, Scholz G, Scimeca JA, Slimani N, Törnqvist M, Tuijelaars S, Verger P. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem Toxicol* 2005;43(3):365-410.
17. Vesper HW, Bernert JT, Ospina M, Meyers T, Ingham L, Smith A, Myers GL. Assessment of the relation between biomarkers for smoking and biomarkers for acrylamide exposure in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(11):2471-8.
18. Fennell TR, Sumner SC, Snyder RW, Burgess J, Spicer R, Bridson WE, Friedman MA. Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol Sci* 2005;85(1):447-59.
19. Fennell TR, Sumner SC, Snyder RW, Burgess J, Friedman MA. Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans. *Toxicol Sci* 2006;93(2):256-67.
20. Fuhr U, Boettcher MI, Kinzig-Schippers M, Weyer A, Jetter A, Lazar A, Taubert D, Tomalik-Scharte D, Pournara P, Jakob V, Harlfinger S, Klaassen T, Berkessel A, Angerer J, Sörgel F, Schömig E. Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(2):266-71.
21. Vesper HW, Caudill SP, Osterloh JD, Meyers T, Scott D, Myers GL. Exposure of the U.S. population to acrylamide in the National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2004. *Environ Health Perspect* 2010;118(2):278-83.
22. Magnus P, Irgens LM, Haug K, Nystad W, Skjaerven R, Stoltenberg C; MoBa Study Group. Cohort profile: the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Int J Epidemiol* 2006;35(5):1146-50.
23. Erkekoglu P, Terken B . Acrylamide neurotoxicity. *Nutritional neuroscience* 2014;17(2):49-57.
24. Dobrovolsky VN, Pacheco-Martinez MM, McDaniel LP, Pearce MG, Ding W. In vivo genotoxicity assessment of acrylamide and glycidyl methacrylate. *Food Chem Toxicol* 2016;87:120-7.

25. Bouma ME, Rogier E, Verthier N, Labarre C, Feldmann G. Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989;25(3 Pt 1):267-75.
26. Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980;209(4455):497-9.
27. Wilkening S, Bader A. Influence of culture time on the expression of drugmetabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17(4):207-13.
28. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* 2016;353(6294):aac4354.
29. Evans CG, Chang L, Gestwicki JE. Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *J Med Chem* 2010;53(12):4585-602.
30. Reed SI. The ubiquitin-proteasome pathway in cell cycle control. *Results Probl Cell Differ* 2006;42:147-81.
31. Yang Y, Yu X. Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J* 2003;17(8):790-9.
32. Shenoy SK. Seven-transmembrane receptors and ubiquitination. *Circ Res* 2007;100(8):1142-54.
33. Terzic J, Marinovic-Terzic I, Ikeda F, Dikic I. Ubiquitin signals in the NF- κ B pathway. *Biochem Soc Trans* 2007;35(5):942-5.
34. Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 2012;81:203-29.
35. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* 2006;31(1):137-55.
36. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998;67:425-79.
37. Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 2009;78:363-97.
38. Lilienbaum A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int J Biochem Mol Biol*. 2013;4(1):1-26.
39. Dahlmann B. Role of proteasomes in disease. *BMC biochemistry* 2007;8(1):S3.
40. Das G, Shrivage BV, Baehrecke EH. Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(6).pii:a008813.
41. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 2014;20(3):460-73.
42. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: A Molecular Approach*. 4th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2006:344-54.

43. Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* 2012;69(7):1125-36.
44. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* 2008;445:77-88.
45. Brix K, Stöcker W. *Proteases: structure and function*. Heidelberg: Springer, 2013:1-36.
46. Schneider JL, Cuervo AM. Autophagy and human disease: emerging themes. *Curr Opin Genet Dev* 2014;26:16–23.
47. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009;43:67-93.
48. 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.
49. 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)pii:1191
50. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
51. Haider SR, Reid HJ, Sharp BL. Tricine-sds-page. *Methods Mol Biol* 2012;869:81-91.
52. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
53. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9(7):671-5.
54. Pennisi M, Malaguarnera G, Puglisi V, Vinciguerra L, Vacante M, Malaguarnera M. Neurotoxicity of acrylamide in exposed workers. *Int J Environ Res Public Health* 2013;10(9):3843-54.
55. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(6):670-84.
56. Chu Q, Zhao Y, Shi X, Han W, Zhang Y, Zheng X, Zhu J. In vivo-like 3-D model for sodium nitrite-and acrylamide-induced hepatotoxicity tests utilizing HepG2 cells entrapped in micro-hollow fibers. *Sci Rep* 2017;7(1):14837.
57. Saito K, Dai Y, Ohtsuka K. Enhanced expression of heat shock proteins in gradually dying cells and their release from necrotically dead cells. *Exp Cell Res* 2005;310(1):229-36.
58. Sumizawa T, Igisu H. Release of heat shock proteins from human neuroblastoma cells exposed to acrylamide. *J Toxicol Sci* 2008;33(1):117-22.
59. Menéndez-Benito V, Verhoef LG, Masucci MG, Dantuma NP. Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin–proteasome system. *Hum Mol Genet* 2005;14(19):2787-99.

60. Jahngen-Hodge J, Obin MS, Gong X, Shang F, Nowell TR Jr, Gong J, Abasi H, Blumberg J, Taylor A. Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272(45):28218-26.
61. Kurebayashi H, Ohno Y. Metabolism of acrylamide to glycidamide and their cytotoxicity in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors. *Arch Toxicol* 2006;80(12):820-8.
62. 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.
63. Song G, Liu Z, Wang L, Shi R, Chu C, Xiang M, Tian Q, Liu X. Protective effects of lipoic acid against acrylamide-induced neurotoxicity: involvement of mitochondrial energy metabolism and autophagy. *Food Funct* 2017;8(12):4657-67.



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller	Sayfa no
Şekil 1. Akrlamidin kimyasal yapısı ve metabolizması.	4
Şekil 2. Otofajinin ubikitin-proteazom sistemi tarafından düzenlenmesi	8
Şekil 3. Akrlamidin hücre canlılığına etkisi.	15
Şekil 4. Akrlamidin ısı şok proteini 70 düzeylerine etkisi	16
Şekil 5. Akrlamidin ubikitinlenmiş protein düzeylerine etkisi.....	17
Şekil 6. Akrlamidin mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3-II düzeylerine etkisi..	18

ÖZGEÇMİŞ

06.01.1993 tarihinde Babil-Irak'ta doğdum. İlköğrenimimi Irak El-Mekdad İlköğretim Okulu'nda tamamladım. Orta öğrenimimi Irak Al-Farouk Erkek Ortaokulu'nda tamamladım ve Suriye'de Al - Sham Özel Lisesi Fen Bölümü'nde okudum. Lisans eğitimimi ise Lübnan Jinan Üniversitesi Kamu Sağlığı Fakültesi Tıbbi Tahliller Bölümü'nde tamamladım. 2016 yılından bu yana Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Bölümünün yüksek lisans eğitimi almaktayım.

EKLER



Ek 1

Yerel Etik Kurul Onayı

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

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2018/298	
	PROTOKOL ADI	Akrilamidin İnsan Kaynaklı Hepatoma Hücrelerinde Protein yıkım Yolları Üzerine Etkileri	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Dr. Öğr. Üyesi Eray ÖZGÜN	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 15/01	Tarih: 17.09.2018	
	Fakültemiz Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Eray ÖZGÜN'ün sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Abdullah ALHAJM'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
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. Rugül KOŞE 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 TOZEL
Dekan a
Dekan Yrd.