



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

POLARİZE EDİLMİŞ MAKROFAJ HÜCRELERİ ÜZERİNE
HİSTON DEASETİLİZASYON İNHİBİTÖRÜ OLAN VORİNOSTAT'IN
MOLEKÜLER ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Samet TÜREL

Haziran 2018
DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLARİZE EDİLMİŞ MAKROFAJ HÜCRELERİ ÜZERİNE
HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRÜ OLAN VORİNOSTAT'IN
MOLEKÜLER ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Samet TÜREL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

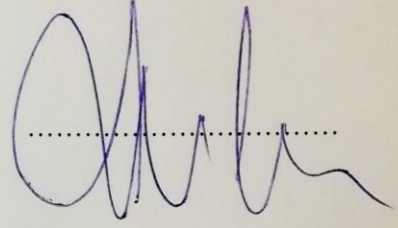
Denizli, 2018

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Samet TÜREL tarafından Prof. Dr. Gülseren BAĞCI yönetiminde hazırlanan "Polarize Edilmiş Makrofaj Hücreleri Üzerine Histon Deasetilaz İnhibitörü Olan Vorinostat'ın Moleküler Etki Mekanizmalarının Araştırılması" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

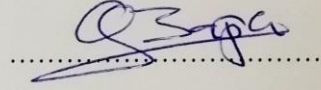
Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Feriye ÇİFTÇİ
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



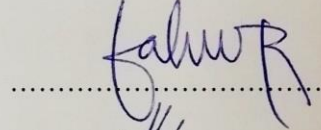
Danışman:

Prof. Dr. Gülseren Bağcı
Pamukkale Üniversitesi



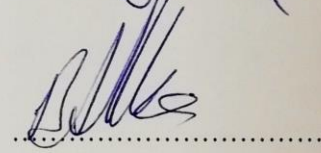
Üye:

Prof. Dr. Feriye ÇİFTÇİ
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



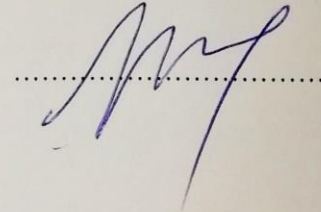
Üye:

Prof. Dr. İbrahim Akıncı
Pamukkale Üniversitesi

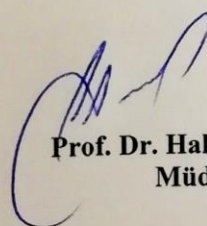


Üye:

Doc. Dr. Ayşe Gaye TOMATIK
Pamukkale Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08/06/18 tarih ve 15/10.... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Hakan AKÇA
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Samet TÜREL

İmza :



ÖZET
POLARİZE EDİLMİŞ MAKROFAJ HÜCRELERİ ÜZERİNE HİSTON DEASETİLAZ
İNHİBİTÖRÜ VORİNOSTAT'IN MOLEKÜLER ETKİ MEKANİZMALARININ
ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

Haziran 2018, 129 Sayfa

Fagositik hücrelerin heterojen bir ailesi olan makrofajlar, çevresel ortamlarında bulunan sitokinlere bağlı olarak değişik fenotip ve fizyolojilere sahip alt tiplere polarize olabilmektedirler. Bu değişim hücre populasyonlarının pro-enflamatuvar veya anti-enflamatuvar sitokin üretmeleri ile karakterize fenotiplerin oluşmasını sağlamaktadır. Ancak makrofaj polarizasyonunun nasıl düzenlendiği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Makrofaj polarizasyonunda epigenetik mekanizmaların önemli görevlerinin olduğunun bulunması histon deasetilaz inhibitörlerini de içeren epigenetik mekanizmalara etkisi bulunan ilaçların makrofaj polarizasyonunun kontrolünde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Polarize edilmiş makrofaj hücreleri üzerine Vorinostat'ın moleküler etki mekanizmalarının araştırılması amacıyla RAW264.7 fare makrofaj hücre hattı kullanarak yaptığımız çalışmada farklı fenotiplere polarize edilmiş makrofajlarda bir histon deasetilaz inhibitörü olan Vorinostatın, IL-10, IL-12, IL-1 β , TNF- α ve IL-6 sitokin salınımlarına farklı etkiler gösterdiği bulunmuştur. TNF- α , CXCL9, COX2, NOS2 ve Arg1 gen ekspresyonlarındaki değişimler incelendiğinde Vorinostat'ın sitokin salınımına benzer şekilde farklı fenotipteki hücrelerde farklı etkiler gösterdiği görülmüştür. Hücre yüzey belirteçlerine olan etkileri incelendiğinde CD86 ifadesini tüm hücrelerde arttırdığı veya yüksek CD86 ifadesine sahip hücrelerde değiştirmedeği M2 hücrelerinde ise CD206 ifadesini önemli ölçüde düşürdüğü gözlemlenmiştir. Vorinostat'ın polarize makrofaj hücrelerinde miRNA array yöntemi ile miRNA ekspresyonlarına olan etkileri incelenmiş ve tüm hücre gruplarında miRNA ekspresyonlarının önemli ölçüde değiştirdiği saptanmış olup, değişen bu miRNA ekspresyonlarının (up/down regüle) endositoz, MAPK, PI3K- AKT gibi makrofaj aktivasyonu için önemli hücre yolaklarında görev aldığı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Vorinostat, Makrofaj, Polarizasyon, miRNA, HDACi

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından Desteklenmiştir (Proje No: 2014SBE012).

ABSTRACT
INVESTIGATION OF MOLECULAR MECHANISMS OF HISTONE DEACETYLASE
INHIBITOR VORINOSTAT ON POLARIZED MACROPHAGE CELLS

Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

June 2018, 129 Pages

Macrophages, which are a heterogeneous family of phagocytic cells, are polarized to subtypes with different phenotypes and physiology depending on the cytokines in their environment. As a result of this alteration, cell populations produce pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokines and characterization of the phenotype is formed. However, the regulation of macrophage polarization has not yet been fully elucidated. The finding that the important role of epigenetic mechanisms in macrophage polarization is mediated by epigenetic mechanisms, including histone deacetylase inhibitors, may be used to control macrophage polarization.

In our study, by the aim of elucidating the molecular effect mechanisms of Vorinostat on polarized macrophage cells, RAW264.7 mouse macrophage cell line was used and it was found that Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor in different phenotypically polarized macrophages, showed different effects on IL-10, IL-12, IL-1 β , TNF- α and IL-6 cytokine secretion. When the changes in TNF- α , CXCL9, COX2, NOS2 and Arg1 gene expressions are examined, it has been shown that Vorinostat has different effects on cells in different phenotypes similar to cytokine release. When the effects on cell surface markers were examined, it was observed that CD86 expression was increased in all cells but there was a significant decreased in CD206 expression especially in M2 cells. The effects of Vorinostat on miRNA expressions were also examined in polarized macrophage cells by microarray and observed that it caused significant changes on miRNA expressions that are found to have functional roles in important yolaks for macrophage activation including endocytosis, MAPK, PI3K-AKT in all cell populations. These findings were the source for further studies to understand the epigenetic regulation of macrophage polarization.

Keywords. Vorinostat, Macrophage, Polarization, miRNA, HDACi

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through Project number 2014SBE012

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim süreci ve tez aşaması boyunca deneyimlerini benimle paylaşan, desteği ile akademik eğitimime ve gelişimime yön veren Danışman Hocam Prof. Dr. Gülseren BAĞCI'ya,

Çalışmalarımın sağlıklı bir şekilde devam etmesi için her türlü altyapı desteğini sunan, bilgisi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hakan AKÇA'ya,

Çalışmalarımda maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen Prof.Dr. Vildan CANER'e

Deney aşamalarında bilgisini ve deneyimlerini benimle paylaşan ve yardımını esirgemeyen Prof.Dr. Vedat BULUT'a,

Bilgi ve deneyimleri ile çalışmamama ve akademik eğitimime ışık tutan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ'a,

Tez projemin tüm aşamalarında kullandığım hücre hattının teminini sağlayan Doç.Dr. Tamer ÖNDER'e,

Çalışma hayatını verimli, keyifli hale getiren, iyi bir ekip çalışması ortaya koyan benden desteklerini esirgemeyen başta Nalan KAYA HAYTAN, Sevilay ATLI TEKİN, Halime ZIRH ve Pervin Elvan TOKGÜN olmak üzere tüm Tıbbi Genetik çalışanlarına ve değerli Hocalarına,

Akademik gelişimimiz için her zaman destek olan Pamukkale Üniversitesi ve PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimlerim boyunca her zaman bana destek olan Sevgili Eşim Yeliz Türel'e ve kızım Eda Türel'e

Hayatım boyunca sevgileri ve desteklerini hissettiğim değerli aileme

ve bu süreçte destek olan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER**Sayfa**

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç.....	2
2. KURAMSAL BİLGİLER LİTERATÜR TARAMASI.....	2
2.1. İmmün Sistem.....	2
2.1.1 Doğal bağışıklık.....	2
2.1.2. Monositler	3
2.1.3 Makrofaj hücreleri	3
2.2. Makrofaj Polarizasyonu.....	4
2.2.1.Makrofaj polarizasyonu teriminin tarihçesi.....	4
2.2.2.Klasik makrofaj (M1)aktivasyonu.....	5
2.2.3.Alternatif Aktive Makrofaj(M2) Aktivasyonu	5
2.2.4. M1-M2 makrofaj dengesi.....	7
2.2.5. Makrofaj Polarizasyonunun Moleküler Belirleyicileri	7
2.3. DNA Paketlenmesi.....	8
2.3.1 Histon Asetilasyonu	9
2.3.2 Histon Asetil Transferazlar(HAT).....	10
2.3.3 Histon Deasetilazlar(HDAC).....	10
2.4. Vorinostat	12
2.4.1. Vorinostat Etki mekanizması	12
2.5. miRNA'lar ve Biyogenezi	14
2.5.1. miRNA'lar ve Doğal Bağışıklık.....	15
2.5.2. Makrofaj polarizasyonu ve miRNA'lar	17
2.6. Hipotez.....	18
3. MATERYAL VE METOD	19
3.1. Hücre Kültürü.....	19

3.2. Vorinostatın hazırlanması	19
3.3. Hücre Canlılık Analizi	19
3.4. Vorinostat için etkin dozun belirlenebilmesi için HDAC aktivasyon analizinin gerçekleştirilmesi	20
3.5. Makrofaj Polarizasyonunun gerçekleştirilmesi	21
3.5.1.M1 Polarizasyonu	21
3.5.2. M2 polarizasyonu.....	22
3.6. Sitokin Salınımlarının Analizi.....	23
3.7. Akım Sitometrisi Analizi	23
3.8.Gen ekspresyonlarının Analizi için RNA İzolasyonu ve cDNA sentezi:.....	23
3.8.1. RNA izolasyonu:	24
3.8.2. cDNA sentezi:.....	24
3.8.3. qRT-PCR yöntemi kullanılarak gen ekspresyonlarındaki değişikliklerin tespiti.....	25
3.9. Mikroarray yöntemi ile miRNA ekspresyon analizi	25
3.10. İstatistiksel Analiz	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Hücre canlılığı.....	29
4.1.1. MTT hücre canlılık analizi.....	30
4.2. Vorinostat'ın etkin dozunun belirlenmesi.....	32
4.3. Makrofaj polarizasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü.....	32
4.3.1 Morfolojik İnceleme.....	32
4.3.2. Sitokin Seviyelerinin Tespiti (ELISA analizleri)	34
4.3.3. Hücre Yüzey Belirteçlerinin İncelenmesi (Akım Sitometrisi Analizi)	34
4.3.4. Gen ekspresyonlarının qRT-PCR analizi.....	35
4.4. Kontrol hücreleri üzerine SAHA'nın etkileri.....	36
4.4.1 SAHA'nın Kontrol Hücre Gruplarında Sitokin salınımları üzerine etkileri;.....	36
4.4.1.1. Kontrol hücrelerinde IL-12 sitokin salınımı üzerine etkileri	37
4.4.1.2 Kontrol hücrelerinde IL-10 sitokin salınımı üzerine etkileri	38
4.4.1.3 Kontrol hücrelerinde IL-1 β sitokin salınımı üzerine etkileri	39
4.4.1.4. Kontrol hücrelerinde TNF- α sitokin salınımı üzerine etkileri	39
4.4.1.5. Kontrol hücrelerinde IL-6 sitokin salınımı üzerine etkileri.....	40
4.4.2 SAHA'nın kontrol hücrelerinde CD 86 ve CD 206 hücre yüzey belirteçlerine olan etkileri	40
4.4.3. SAHA'nın kontrol hücrelerinde gen ekspresyonları üzerine etkileri.....	42

4.4.4 miRNA ekspresyon değişimleri.....	45
4.5. SAHA'nın Klasik aktive Makrofaj(M1) fenotipine olan etkileri	52
4.5.1 Sitokin salınımlarına olan etkileri.....	52
4.5.2.SAHA'nın M1 makrofajlarının hücre yüzey belirteçlerine olan etkisi	55
4.5.3. SAHA'nın M1 makrofajlarında gen ekspresyonları üzerine etkileri.....	57
4.5.4. miRNA ekspresyon değişimleri.....	59
4.6. SAHA'nın M2 makrofaj hücrelerine olan etkileri.....	65
4.6.1. SAHA'nın M2 makrofaj hücre gruplarında sitokin salınımlarına olan etkileri	65
4.6.2. SAHA'nın M2 makrofajlarının hücre yüzey belirteçlerine olan etkisi	68
4.6.3.M2 hücrelerinde SAHA'nın mRNA ekspresyonlarına olan etkileri	70
4.6.4. SAHA'nın M2 polarize makrofaj hücrelerinin miRNA ekspresyonlarına etkisi	73
4.7. miRNA EKSPRESYONLARININ KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ.....	79
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇ	102
7. KAYNAKLAR.	105
8. ÖZGEÇMİŞ	114

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Vorinostatın Kimyasal Yapısı.....	12
Şekil 2. miRNA biyogenezi(Goyvaerts ve ark, 2013).....	15
Şekil 3. Vorinostatın farklı doz ve sürelerde makrofaj hücrelerinin morfolojileri üzerine etkileri.....	30
Şekil 4. Süre ve farklı dozlara göre % canlılık analizi.....	31
Şekil 5. HDAC aktivasyonuna ait OD değerleri.....	32
Şekil 6. M1 makrofaj hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (20x).....	33
Şekil 7. M2 makrofaj hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (20x).....	33
Şekil 8. Polarize makrofajların sitokin salınımları.....	34
Şekil 9. Polarize makrofajların gen ekspresyon düzeyleri.....	36
Şekil 10. SAHA'nın kontrol grubu hücrelerinde IL-12 sitokin salınımına olan etkileri.....	37
Şekil 11. SAHA'nın kontrol grubu hücrelerinde IL-10 salınımı üzerine etkileri.....	38
Şekil 12. SAHA'nın kontrol grubu hücrelerinde IL-1 β salınımı üzerine etkileri.....	39
Şekil 13. SAHA'nın kontrol grubu hücrelerinde TNF- α salınımı üzerine etkileri.....	39
Şekil 14. SAHA'nın kontrol grubu hücrelerinde IL-6 sitokin salınımı üzerine etkileri.....	40
Şekil 15. SAHA'nın kontrol hücrelerinde COX2 mRNA ekspresyonuna etkileri.....	42
Şekil 16. SAHA'nın kontrol hücrelerinde CXCL9 mRNA ekspresyonuna etkileri.....	43
Şekil 17. SAHA'nın kontrol hücrelerinde TNF- α mRNA ekspresyonuna etkileri.....	43
Şekil 18. SAHA'nın kontrol hücrelerinde NOS2 mRNA ekspresyonuna etkileri.....	44
Şekil 19. SAHA'nın kontrol hücrelerinde Arg1 mRNA ekspresyonuna etkileri.....	44
Şekil 20. Kontrol ve Kontrol+SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonlarına ait Scatter plot ve Hierarchical Clustering analizleri.....	46
Şekil 21. Kontrol+LPS ve Kontrol+LPS+SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonlarına ait Scatter plot ve Hierarchical Clustering analizleri.....	50
Şekil 22. SAHA'nın M1 deney grubunda IL-12 sitokin salınımına olan etkisi.....	52
Şekil 23. SAHA'nın M1 deney grubunda IL-10 sitokin salınımına olan etkisi.....	53
Şekil 24. SAHA'nın M1 makrofaj hücrelerinde IL-1 β sitokin salınımına olan etkisi.....	54
Şekil 25. M1 makrofajlarında TNF- α sitokin salınım salınımına olan etkisi.....	54
Şekil 26. M1 makrofajlarında IL-6 sitokin salınımına etkisi.....	55
Şekil 27. M1 makrofajlarında Cox2 mRNA ekspresyon farkları.....	57
Şekil 28. M1 makrofajlarında CXCL9 mRNA ekspresyon farkları.....	57
Şekil 29. M1 makrofajlarında TNF- α mRNA ekspresyon farkları.....	58

Şekil 30. SAHA'nın M1 makrofajlarında NOS2 mRNA ekspresyonuna olan etkisi	58
Şekil 31. M1 makrofajlarında Arg1 mRNA relatif ekspresyon değerleri	59
Şekil 32. M1 ve M1+SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonlarına ait Scatter plot ve Hierarchical Clustering analizleri.....	61
Şekil 33. M1+LPS ve M1+LPS+ SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonlarına ait Scatter plot ve Hierarchical Clustering analizleri.	64
Şekil 34. SAHA'nın M2 makrofajlarında IL-12 salınımına olan etkileri.....	65
Şekil 35. SAHA'nın M2 makrofajlarında IL-10 salınımına olan etkileri.....	66
Şekil 36. SAHA'nın M2 makrofajlarında IL-1 β salınımına olan etkileri.....	67
Şekil 37. SAHA'nın M2 makrofajlarında TNF- α salınımına olan etkileri.....	67
Şekil 38. SAHA'nın M2 makrofajlarında IL-6 salınımına olan etkileri.....	68
Şekil 39. SAHA'nın M2 makrofajlarında COX2 mRNA ekspresyonuna olan etkisi	70
Şekil 40. SAHA'nın M2 makrofajlarında CXCL9 mRNA ekspresyonuna olan etkisi	71
Şekil 41. SAHA'nın M2 makrofajlarında TNF- α mRNA ekspresyonuna olan etkisi.....	71
Şekil 42. SAHA'nın M2 makrofajlarında NOS2 mRNA ekspresyonuna olan etkisi	72
Şekil 43. SAHA'nın M2 makrofajlarında Arg1 mRNA ekspresyonuna olan etkisi.....	72
Şekil 44. M2 ve M2+SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonlarına ait Scatter plot ve Hierarchical Clustering analizleri.....	75
Şekil 45. M2+LPS ve M2+LPS+ SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonlarına ait Scatter plot ve Hierarchical Clustering analizleri.	78
Şekil 46. Kontrol grubuna ait ortak miRNA'lara ait Kegg yolak heatmap analizi	81
Şekil 47. M1 makrofajlarında SAHA'nın ekspresyonunu değiştirdiği miRNA'ların rol oynaması muhtemel hücrel yolaklara ait Heatmap analizi.	83
Şekil 48. M2 makrofajlarında SAHA'nın ekspresyonunu değiştirdiği miRNA'ların rol oynaması muhtemel hücrel yolaklara ait Heatmap analizi.	85

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Deney grupları ve uyaran miktarları	22
Tablo 2.cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı ve ısı şartları.	24
Tablo 3. Gerçek-zamanlı PCR yöntemi için gerekli reaksiyon karışımı	25
Tablo 4. Poly(A) kuyruğu eklenmesinde kullanılan malzemeler ve miktarları	26
Tablo 5. Ligasyonda kullanılan malzemeler ve miktarları	27
Tablo 6. Hibridizasyonda kullanılan malzemeler ve miktarları.....	27
Tablo 7. Makrofaj hücrelerinin sahip oldukları hücre yüzey belirteçleri oranları.	35
Tablo 8. SAHA'nın kontrol hücrelerinde CD 86 ve CD 206 hücre yüzey belirteçlerine olan etkilerinin akım sitometrisi analiz sonuçları	41
Tablo 9. Kontrol – Kontrol+SAHA deney grupları arasında downregüle miRNA'lar ve değişim oranları	47
Tablo 10. Kontrol – Kontrol+SAHA deney grupları arasında upregüle olan miRNA'lar ve değişim oranları	48
Tablo 11. Kontrol ve Kontrol+SAHA grupları arasındaki miRNA farklılıklarına ait KEGG yolak analizi	49
Tablo 12. Kontrol + LPS – Kontrol+LPS+ SAHA deney grupları arasında downregüle miRNA'lar ve değişim oranları	51
Tablo 13. Kontrol +LPS– Kontrol+LPS+SAHA deney grupları arasında upregüle olan miRNA'lar ve değişim oranları	51
Tablo 14. Kontrol+LPS ve Kontrol+LPS+ SAHA grupları arasındaki miRNA farklılıklarına ait KEGG yolak analizi	52
Tablo 15. SAHA'nın M1 makrofajlarında CD86 ve CD206 hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonlarına etkisinin akım sitometrisi analiz sonuçları	56
Tablo 16. M1-M1+ SAHA deney grupları arasında downregüle miRNA'lar ve değişim oranları	60
Tablo 17. M1-M1+ SAHA deney grupları arasında upregüle miRNA'lar ve değişim oranları	60
Tablo 18. M1 ve M1+SAHA grupları arasındaki miRNA farklılıklarına ait KEGG yolak analizi.....	62
Tablo 19. M1+LPS-M1+LPS+ SAHA deney grupları arasında downregüle miRNA'lar ve değişim oranları	62
Tablo 20. M1+LPS-M1+ LPS+SAHA deney grupları arasında upregüle miRNA'lar ve değişim oranları	63

Tablo 21. M1+LPS ve M1+LPS +SAHA grupları arasındaki miRNA farklılıklarına ait KEGG yolak analizi	65
Tablo 22. M2 hücrelerinde SAHA'nın CD86 ve CD206 hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonlarına etkisinin akım sitometrisi analiz sonuçları	69
Tablo 23. M2-M2+ SAHA deney grupları arasında downregüle miRNA'lar ve değişim oranları	73
Tablo 24. M2-M2+ SAHA deney grupları arasında upregüle miRNA'lar ve değişim oranları	74
Tablo 25. M2 ve M2 +SAHA grubuna ait KEGG yolak analizi.....	76
Tablo 26. M2+LPS - M2+LPS+SAHA deney grupları arasında downregüle miRNA'lar ve değişim oranları	77
Tablo 27. M2+LPS - M2+LPS+SAHA deney grupları arasında upregüle miRNA'lar ve değişim oranları	77
Tablo 28. M2+LPS ve M2+LPS+SAHA deney gruplarına ait KEGG yolak analizi.....	79
Tablo 29. Kontrol grubu hücrelerinde karşılaştırmalı miRNA ekspresyon analizi.....	80
Tablo 30. Kontrol grubu hücrelerine ait KEGG yolak analizi.....	80
Tablo 31. M1 makrofajlarında SAHA'nın miRNA ekspresyonlarına olan etkilerinin karşılaştırmalı analizi.	82
Tablo 32. M1 makrofajlarında SAHA'nın ekspresyonunu değiştirdiği miRNA'ların rol oynaması muhtemel hücresel yolaklar.....	82
Tablo 33. M2 makrofajlarında SAHA'nın miRNA ekspresyonlarına olan etkilerinin karşılaştırmalı analizi.....	84
Tablo 34. M2 makrofajlarında SAHA'nın ekspresyonunu değiştirdiği miRNA'ların rol oynaması muhtemel hücresel yolaklar.....	84

KISALTMALAR DİZİNİ

SAHA(Vorinostat).....	suberoylanilide hydroxamic acid
IL-1 β	Interlökin 1 β
IL-6.....	Interlökin 6
IL-10.....	Interlökin 10
IL-12.....	Interlökin 12
TNF- α	Tümör nekrozu faktörü- α
VEGF.....	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
CD.....	Cluster of differentiation(Başkalaşım kümesi)
HAT.....	Histon asetiltransferaz
HDAC.....	Histon deasetilaz
HDACi.....	Histon deasetilaz inhibitörü
Th.....	T helper hücreleri
iNOS.....	İndüklenebilir nitrikoksit sentaz
CXCL9.....	Monosit interferon gamma indüklenen faktör
Arg1.....	Arjinaz 1
YM-2.....	Kitinaz benzeri 4
Cox2	Siklooksijenaz 2
MYD88.....	Miyeloid Diferansiye Edici Faktör 88
NF-kB.....	Nükleer Faktör kappa B
TSA.....	Trichostatin A
PAMPs.....	Patojen İlişkili Moleküler Patern
PRRs.....	Patern Tanıma Reseptörleri
TRAF6.....	Tümör nekroze edici faktör reseptörü ile ilişkili faktör 6

1. GİRİŞ

Monosit ve makrofajlar doğal bağışıklık sisteminin temel bileşenlerini oluşturan, patojenler ve ölü hücreleri tanıma ve temizlemeden sorumlu profesyonel fagositik hücrelerin heterojen bir ailesi olarak kabul görmektedir. Makrofajlar çevresel ortamlarında bulunan sitokinlere bağlı olarak değişik fenotip ve fizyolojilere sahip alt tiplere polarize olabilmektedirler. Bu değişim hücre popülasyonlarının pro-enflamatuvar veya anti-enflamatuvar sitokin üretmeleri ile karakterize fenotiplerin oluşmasını sağlamaktadır. Klasik olarak aktive olan makrofajlar (M1 makrofaj olarak isimlendirilir) IL-10 düşük, IL-12 yüksek fenotipe sahiptir. Alternatif olarak aktive olan makrofajlar (M2 makrofajlar olarak isimlendirilir) IL-10 yüksek ve IL-12 düşük sitokin fenotipine sahiptir. Vorinostat gibi histon deasetilaz inhibitörleri histon deasetilaz enzimlerinin aktivitesini engelleyerek gen ekspresyon durumlarını değiştirmektedir. Vorinostat ve bilinen diğer histon deasetilaz inhibitörleri genlerin %1-2 'lik kısmının ekspresyonunda değişiklik meydana getirmektedir. İnflamasyon malin mikroçevrenin kritik bir bileşenidir ve tümörle ilişkili makrofajlar kronik enflamasyon sırasında bu bölgelere infiltre olmaktadır.

Histon deasetilaz inhibitörlerinin anti kanser özelliklerinin yanında son yıllarda yapılan çalışmalar aynı zamanda anti enflamatuvar özelliklerinin de olduğu çeşitli hayvan modelleri üzerine yapılan deneylerde gösterilmiştir. Romatoid artrit, enflamatuvar bağırsak hastalığı ve fibrozis gibi kronik enflamatuvar hastalık modellerinde histon deasetilazların immün hücreler üzerine anti enflamatuvar etki gösterdikleri bulunmuştur. Enflamatuvar hücreler üzerine apoptozu indükleyerek anti enflamatuvar etkilerini gösterebildikleri gibi, 2011 yılında Roger ve arkadaşları tarafından insan ve fare makrofajları üzerine bir histon deasetilaz inhibitörü olan TSA'nın etkileri incelendiğinde bu etkinin sadece enflamatuvar hücrelerin apoptozu ile olmadığı doza bağımlı olarak makrofaj hücrelerinin pro-enflamatuvar sitokin salınımlarının düştüğü bunun yanında anti-enflamatuvar sitokin salınımlarında artış olduğu görülmüştür(Roger, 2011). Ancak histon deasetilaz inhibitörlerinin enflamatuvar hücreler üzerine etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar anti kanser tedavisinde umut vaat eden Histon Deasetilaz inhibitörlerinin anti-enflamatuvar özelliklerinin de olduğunu ve kronik veya akut enflamatuvar hastalıkların tedavisinde de kullanım açısından potansiyel taşıdıklarını göstermektedir.

Bu çalışmada M1 ve M2 fenotipine polarize edilmiş makrofaj hücrelerinde Vorinostat'ın sitokin salınımlarına, hücre yüzey belirteçlerine, mRNA ekspresyonlarına ve miRNA ekspresyonlarına olan etkileri incelenerek makrofaj polarizasyonuna etkileri araştırılmıştır.

1.1. Amaç

Bu çalışmadaki amacımız bir histon deasetilaz inhibitörü olan Vorinostat'ın polarize edilmiş fare makrofaj hücreleri üzerine yapabileceği fenotipik etkileri incelemek, ayrıca miRNA ekspresyonlarına olan etkilerini de inceleyerek makrofaj hücrelerinde oluşturduğu fenotipik değişiklikleri miRNA ekspresyon farklılıkları oluşturarak yapıp yapmayacağını araştırmaktır.

2. KURAMSAL BİLGİLER LİTERATÜR TARAMASI

2.1. İmmün Sistem

İmmün sistem yabancı ve zararlı olan her türlü maddeye(mikroorganizma, protein veya polisakkarit) karşı organizmanın verdiği tepki olarak tanımlanmaktadır (Düzgün, 2014). Yabancı maddelerin vücuda girmesinde bir bariyer olarak görev yapan epitelyum tabakasından özelleşmiş hücrelere kadar çeşitli bileşenler immün sistem içinde yer alır ve organizmayı korumayı hedefler. İmmün sistemi oluşturan birçok farklı özelliklere sahip bileşenlerden oluşsa da doğal ve edinsel immün sistem olarak başlıca iki büyük gruba ayrılabilir (Hoebe, 2004).

Bu iki büyük gruptan doğal immün sistem vücudun enfeksiyonlara karşı ilk koruyucu engelini oluşturmaktadır. Edinsel immün sistem ise daha sonra ve yavaş olarak devreye giren ancak vücudun savunmasında daha etkin bir görev alan immün sistemdir(Abbas, 2007)

Her ne kadar farklı iki sistem gibi görünse de iki sistemde sürekli iletişim halindedir ve patojenlere karşı savunmada birlikte çalışırlar.

2.1.1 Doğal bağışıklık

Doğal immün sistem, mikropların vücuda girmesini engelleyen epitelyum tabakası, mikropların dokulara veya dolaşıma girmeleri halinde ise onları tanıyıp yok etmeyi hedefleyen fagositler ve doğal öldürücü hücreler (natural killer-NK) denilen özelleşmiş hücrelerden oluşmaktadır. Doğal bağışıklık hücreleri birçok patojende ortak olarak bulunan Patojen İlişkili Moleküler Patern (PAMPs) adı verilen korunmuş tekrar motiflerini tanıyan Patern Tanıma Reseptörleri (PRRs) eksprese etmektedirler. PRRs aktivasyonu pro-enflamatuvar sitokinlerin salınımını, ligantların fagosite edilmelerini veya sitotoksik ajanların salınmasıyla patojenlerin yok edilmelerini sağlamaktadır (Akira, 2006). Bu yapılara örnek olarak bakterilerin yapılarında bulunan lipopolisakkarit (LPS) verilebilir, fagositik hücreler membranlarında bulunan reseptörler ile LPS'yi tanımakta ve aktive olarak mikro organizmayı yok etmeye çalışmaktadırlar (Abbas, 2007).

Doğal bağışıklık sistemi, mononükleer fagositik sistem olan, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler olmak üzere üç majör hücre tipinden oluşmaktadır. Monositler ve makrofajlar patojenlere karşı doğal immün sistemde; fagositoz, reaktif oksijen radikallerinin salınımı, enflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretimini de sağlayarak immün sistem içinde önemli rol oynamaktadırlar. Aynı zamanda bu hücreler enflamasyonun durdurulması ve hasarlı dokuların iyileştirilmesinde de kritik rol oynarlar (Gordon, 2004).

Doğal immün sistem hücrelerinin önemli bir grubunu monositler oluşturmaktadır.

2.1.2. Monositler

Doğal immün sistem hücrelerinden olan monositler dolaşımda bulunan fagositik hücrelerdir ve vücutta oluşan enfeksiyon bölgesine giderek orada mikroorganizmaları tanırlar ve içlerine alarak hücre içi yıkım işini gerçekleştirirler. Monositler kemik iliği kökenli miyeloid hücrelerden farklılaşmaktadır ve periferik kandaki beyaz kan hücrelerinin yaklaşık %10 luk kısmını oluştururlar. Periferik kanda bulunan monositler dolaşımdaki ve dokulardaki mikro organizmalara karşı etkilidirler ve damar dışındaki dokularda uzun süre yaşayabilirler (Gordon, 2004).

Monositler endotel hücreleri tarafından salınan adezyon molekülleri gibi uyarılarla dolaşımdan enfeksiyon olan bölgeye göç etme yeteneğine sahiptirler. Çevre dokulardan salınan pro-enflamatuvar veya metabolik uyarılarla dokulara giren monositler makrofaj hücrelerine farklılaşırlar. Monositler çevre dokulardan salınan Makrofaj Koloni Stimule Edici Faktör (M-CSF) veya Granülosit Makrofaj Koloni Stimule Edici Faktör (GM-CSF) gibi büyüme faktörleri ile doku makrofajlarına ya da dendritik hücre veya osteoklast gibi özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilmektedirler (Yona, 2013).

Monositlerden farklılaşan makrofaj hücreleri pro-enflamatuvar, anti enflamatuvar, doku tamiri, anti tümör gibi birbirinden farklı birçok görevi yerine getirmektedir. Bu fonksiyonların bozulması ise kanser progresyonunu da içeren çeşitli süreçlerde farklılaşmaya ve çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır. Makrofaj hücreleri farklı fenotiplerde farklı görevleri yerine getirmektedir ve bu fenotiplerin oluşum mekanizmalarının tamamen aydınlatılabilmesi için bilimsel çalışmalar devam etmektedir.

2.1.3 Makrofaj hücreleri

Makrofajlar doğal bağışıklık sistemde çevresel ve mikrobial ajanlara karşı immün yanıtın başlatılmasını ve sürdürülmesini ayrıca hasarlı dokuların tamirini düzenleyen doğal bağışıklık sisteminin heterojen hücre popülasyonudur. İlk defa biyolog Elie Metchnikoff tarafından 1884 yılında patojenleri fagosite ederek elimine eden hücreler olarak

keşfedilmiştir. Makrofaj ismi yunanca “makros” büyük ve “phagein” yeme kelimelerinin birleşiminden meydana gelmektedir (Das, 2015).

1905 yılında Hirsch ve arkadaşları bu fagositik hücreleri belirli bakteriyel enfeksiyonlara karşı direncin oluşturulmasını sağladığını göstermişlerdir (Hirsch 1959). İmmün sistem üzerine yapılan ileri çalışmalar sonucunda makrofajların antibakteriyel aktivitesinin immün sistemde hücrel immünitenin temelini oluşturduğu görüşü benimsenmiştir (David, 1972).

Vücutta bir enfeksiyon meydana geldiğinde ilk tepkiyi veren hücreler olan doğal öldürücü hücrelerden (Natural Killer, NK) sonra ortamda en çok bulunan hücreler makrofaj hücreleridir (Davies 2013). Makrofaj hücreleri reaktif oksijen radikalleri (ROS) ve pro-enflamatuvar sitokinler salarak antimikrobiyal aktivite gösterirler ve ortamda bulunan patojenleri ve apoptotik hücreleri fagosite ederek temizlerler. Önemli bir fonksiyon olarak makrofaj hücreleri sundukları antijenler ve sitokinler sayesinde edinsel immün sistemin aktivasyonunu da sağlamaktadırlar. Enflamasyonun ilerleyen süreçlerinde ise makrofajlar hasarlı dokuların onarılmasında rol oynamaktadırlar (Martinez, 2009).

Makrofaj fenotipleri ve fonksiyonları buldukları anatomik lokasyonlara göre farklılık göstermektedir (Das 2015). Makrofajlar lenfoid veya karaciğer (kupper hücreleri), akciğer (alveolar makrofajlar), sinir sistemi (microglia), üreme organları veya bağırsaklar gibi lenfoid olmayan organlarda da bulunabilmektedirler ve buldukları dokuya göre isimlendirilirler (Taylor, 2005).

2.2. Makrofaj Polarizasyonu

Makrofaj hücrelerinin aldığı farklı uyarılara göre farklı görevler üstlenecek olan çeşitli hücre tiplerine dönüşmesine makrofaj polarizasyonu denmektedir.

2.2.1. Makrofaj polarizasyonu teriminin tarihçesi

1990 yılında keşfedilen interlökin 4 (IL-4) sitokini makrofaj gen ekspresyonları üzerine Lipopolisakkarit (LPS) ve interferon gamma (IFN γ)’ dan farklı bir etki gösterdiği bulunmuştur. interferon gamma ile oluşan klasik aktivasyonun aksine IL-4 ile oluşan makrofaj aktivasyonu alternatif aktivasyon olarak tanımlanmıştır (Stein, 1992). Yaklaşık beş yıl sonra Mills ve arkadaşları makrofajları M1 ve M2 olmak üzere iki yeni grupta sınıflandırmayı önermişlerdir. Bu terminoloji çeşitli fare soylarında T helper tip1 (Th1)(C57BL/6 fareleri) ve T helper tip 2 (Th2)(Balb/c fareleri) kökenleriyle makrofajların sahip oldukları farklı arjinaz metabolizmaları gözlemlenerek oluşturulmuştur. Th1 fareler T hücrelerinden çoğunlukla IFN γ ürettikleri gösterilen farelerde makrofajların aktivasyonu arjininden nitrik oksit oluşturulduğu

gösterilmiştir. Bunun aksine Th2 farelerinde ise T hücreleri tarafından IL-4 ve TGFβ1 üretilmektedir (Mills, 2000).

Bu bulgular, klasik aktive olan makrofajların (M1) enflamatuvar fonksiyon sergilediği bununla beraber alternatif aktive olan makrofajların (M2) anti-enflamatuvar fonksiyon gösterdiği konusunda bilimsel olarak fikir birliği oluşturmuştur. 2004 yılında Mantovani ve arkadaşları M2 makofajları uygulanan uyarıcıya ve indüklenen transkripsiyonel değişime bağlı olarak M2a, M2b, M2c ve M2d alt tiplerine ayırmışlardır (Mantovani, 2004).

2.2.2.Klasik makrofaj (M1) aktivasyonu

Makrofajlar IFN-γ veya Lipopolisakkarit (LPS) gibi bir bakteri ürünüyle uyarıldığında klasik aktive veya M1 makrofajlar olarak isimlendirilmektedir. Klasik veya M1 polarizasyonunu ilk olarak 1960'lı yıllarda Mackaness ve arkadaşlarının yapmış oldukları mikobakteriumbovis basili, Calmette-Guerin (BCG) veya Listeria ile enfekte farelerdeki makrofajların anti microbial aktivitelerinin gösterilmesi çalışmalarıyla anlaşılmıştır (Mackaness, 1964). Daha sonra T hücrelerinin bir sınıfı olan T helper 1 (TH-1) hücreleri tarafından üretilen IFN-γ ve hücrel aktivitesi keşfedilmiş ve IFN-γ etkisinin makrofajların anti mikrobiyal, sitotoksik ve tümorisidal aktiviteleri uyardığı görülmüştür (Mosmann, 1986).

Knockout farelerde ve insanlarda yapılan çalışmalarda IFN-γ defektinin M1 polarizasyonu ve mikrobiyal enfeksiyonlara karşı savunma için kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir. Intraselüler patojenler, TNF-α, IFN-γ ve TLR4 ligantları ayrıca GM-CSF, radyasyon, ox-LDL ve yüksek tuz diyeti gibi faktörlerin makrofajları M1 polarizasyonuna yönlendirdiği ve proenflamatuvar sitokin salınımını uyardığı son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Zhang, 2015).

M1 makrofajları tipik olarak yüksek IL-12 ve düşük IL-10 sitokin salınımıyla karakterize bir fenotipe sahiptir (Mantovani 2004). Ayrıca patojenlerin yok edilmesi için indüklenbilir nitrikoksit sentetaz (iNOS) üretimi IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23, TNF-α gibi pro enflamatuvar sitokin salınımını gerçekleştirip, diğer immün hücrelerin bölgeye toplanmalarını sağlayacak kemokin ve kemoatraktan proteinleri üretirler (Murray, 2011). Tüm bu fenotipin oluşturulması bir dizi genin STAT1, NFκ-B ve MAPKs gibi yolların kontrolündeki transkripsiyon faktörleri tarafından aktive edilmesiyle düzenlenmektedir (Langrish, 2005) (Szekanecz, 2007).

2.2.3.Alternatif Aktive Makrofaj(M2) Aktivasyonu

M1 makrofaj polarizasyonunda IFN-γ tarafından indüklenen süperoksit üretiminin IL-4 tarafından inhibe edilmesinin bulunmasıyla makrofaj aktivasyonunun sadece konakçı

savunması ile ilişkili olmadığını göstermiştir. Alternatif polarizasyonun keşfinden günümüze kadar yapılan bir çok çalışma M2 makrofajların doku iyileşmesi, tumor gelişimi ve fibrosis gibi pekçok biyolojik olayda anahtar rol oynadığını göstermiştir (Wynn, 2004).

M2 makrofaj aktivasyonu karmaşık bir süreçtir ve günümüzde farklı uyaranlar sonucu oluşan üç farklı fenotipte sınıflandırılmaktadır. M2a, M2b, M2c ve M2d (Hirsch JG 1959). Her fenotip kendine özgü bir gen ekspresyon profiline sahip olmakla birlikte yüksek IL-10 ve IL-1 reseptör antagonisti ayrıca düşük IL-12 üretimi tüm gruplarda ortak fenotip olarak karşımıza çıkmaktadır (David, 1972). Bir diğer önemli M2 makrofaj belirteci de Arjinaz-1 enzimidir, bu enzim indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) enziminin supstratı olan L-arjinin miktarını düşürmektedir (Hirsch, 1959).

M2a fenotipi, Th2 hücreleri, eozinofiller, bazofiller ve makrofajlar tarafından üretilen IL-4 veya IL-13 uyarısı sonucu ortaya çıkmaktadır (Martinez, 2009). IL-4R α 1, IL-13R α 1 veya IL-13R α 2 resöptörlerine bağlanmayı takiben JAK1 ve JAK3 aktive olmakta ardından STAT6 ve IRF4 aktivasyonuna neden olmaktadır. IL-4 uyarısı sonucu oluşan makrofaj aktivasyonu fagositik aktivasyonu azaltmaktadır. IL-4 eksik farelerde makrofaj olgunlaşması ve sayısında herhangi bir değişiklik olmamakla birlikte nematodlara ve viral enfeksiyonlara karşı enflamatuvar cevap bozulmaktadır (Martinez, 2009).

M2b makrofaj aktivasyonu IL-1R ligantları veya immün komplekslerle birlikte LPS maruziyeti ile tetiklenmektedir. Ligantlar hücre membranında Fc γ R1 (CD64) ve inhibitör FC γ RIIA (CD32)'yi içeren Fc reseptör ailesi tarafından tanınmakta böylece spleen tyrosine kinase (Syc) ve phosphoinositide 3-kinase yoluyla IL-10 ve TNF α ekspresyonu artmaktadır (Martinez, 2009).

M2c fenotipinin oluşması için glukokortikoidler ve IL-10 maruziyeti uyarılmaktadır. Glukokortikoidler hücreye nüfuz ettiğinde reseptörüne bağlanarak kompleks oluşturur ve çekirdeğe transloke olur. Bu kompleks çekirdekte NF-kB ve AP-1 ile etkileşime geçerek enflamatuvar cevabın baskılanmasında rol oynar (Taylor, 2005).

Tümörle ilişkili makrofajlar (TİM) tümör mikroçevresinin ana enflamatuvar bileşenidir. M2 makrofaj fenotipinde olduğu gibi tümörle ilişkili makrofajlar da yüksek miktarda IL-10 ve düşük seviyede IL-12 sitokin salınım fenotipine sahiptir (Blusse, 1983). TİM'ler IL-6 ve makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) tarafından aktif edilebilir. TİM'ler diğer M2 alt grupları ile benzer sitokin salınımı profiline sahiptir olup, yüksek IL-10 ve TGF- β salınımı gerçekleşir. Bununla birlikte TİM'ler diğer M2 alt gruplarından farklı olarak yüksek miktarda CCL5, CXCL10 ve CXCL16 kemokin salınım profiline sahiptir. TİM'ler ayrıca M1 fenotipi

belirteçleri de ifade ederler ve LPS veya IFN- γ gibi uyarılarla M1 benzeri bir fenotipe dönüşebilirler (Martinez, 2014).

2.2.4. M1-M2 makrofaj dengesi

Enflamasyonun yapılandırılması ve doku tamiri enflamasyonun ilerlemesinde önemli bir süreçtir ve bu süreçte makrofajlar kritik roller üstlenmektedirler. M1 polarize makrofajlar enflamasyon yanıtının başlaması ve doku hasarının olduğu süreçte rol oynamaktadır (Gordon, 2010). Enflamasyonun başlangıcından itibaren oluşan doku hasarının iyileştirilmesi için bölgeye M2 fenotipine sahip makrofajlar da infiltre olmaya başlar. Vücut hemeostazının sağlanmasında bu sürecin sekteye uğraması enflamasyonun ilerleyişini değiştirmekte olup M1 / M2 makrofaj dengesinin önemli olduğu vurgulanmaktadır (Lucas, 2010).

Örneğin kronik venöz ülserde (KVÜ), kronik enflamasyonun söndürülmesi M1 ve M2 makrofaj polarizasyonundaki dengenin bozulmasına bir örnek olarak verilebilir. Demir metabolizması polarize makrofajlarda farklı düzenlenmektedir ve KVÜ'de aşırı demir yüklenmesi makrofajları sürekli M1 polarize fenotipte tutmakta böylece ROS aracılı DNA hasarına ve doku tamirinde kusurlara neden olmaktadır (Sindrilaru et al., 2011).

Makrofaj polarizasyonundaki dengenin bozulmasına bir diğer örnek olarak iskemik kalp hastalığı verilebilir. Oksijen algılayıcısı olan prolyl-hydroxylase PHD2 eksik farelerde oluşturulan iskemi modelinde makrofajların artan NF- κ B aktivasyonu ile pro-arteriogenik M2 makrofaj fenotipinin oluşumunu desteklediği görülmüştür (Takeda et al., 2011). 2011 yılında yapılan bu gözlem yaralarda ve tümörlerde de görülen oksijen yoksunluğu ile proarteriogenik M2 makrofaj polarizasyonu arasında fonksiyonel bir ilişki kurulması açısından önemlidir (Sica , 2012)

2.2.5. Makrofaj Polarizasyonunun Moleküler Belirleyicileri

Makrofajların farklı fenotiplere polarize olması, sinyal molekülleri, transkripsiyonel faktörler, epigenetik mekanizmalar ve posttranskripsiyonel mekanizmaları da içeren bir sinyal ağı tarafından düzenlenmektedir. IRF/STAT yolağının IFN ve TLR sinyalleriyle aktive olmasıyla STAT1 kullanılarak makrofaj fonksiyonları M1 fenotipine veya IL-4 veya IL-13 sinyallenmesiyle ise STAT6 kullanılarak M2 fenotipine dönüşmektedir (Sica ve Bronte, 2007).

M1 makrofajlarında Th1 ve TH17 ye yanıt olarak uyarılan IL-12, IL-23 ve TNF sitokin salınımları için gerekli olan IRF5'in artmış ekspresyonuna sahiptirler (Udalova,, 2012). IL-4 reseptörler aktivasyonu ise STAT 6 aktivasyonu ile mannoz reseptör (Mrc1), resistin-like α (Retnla, Fizz1) ve chitinase 3-like 3 (Chi3l3, Ym1) gibi M2 polarizasyonunu uyarmaktadır (Pauleau et al., 2004). IL-10 ise STAT3 aracılı (Il10, Tgfb1, Mrc1) gibi M2 benzeri fenotipin

oluşmasını uyarılmaktadır (1-15). STAT aracılı makrofaj aktivasyonu SOCS ailesi üyelerince düzenlenmektedir (Sica, 2012).

IRF/STAT/SOCS yolağı bir transkripsiyon faktör paneli olarak makrofaj polarizasyonunu yönetmektedir. PPAR γ nükleer reseptörü ve PPAR δ ise M2 makrofaj aktivasyonunda farklı alt tiplerin oluşmasıyla ilişkilidir. İlginç olarak STAT6 proteini PPAR γ ve Krüppel-like factor 4 (KLF4) ile koordine şekilde çalışmaktadır (Liao, 2011).

Yapılan çalışmalar KLF4 STAT6 ile koordine çalışarak Arg-1, Mrc1, Fizz1, PPAR γ gibi M2 polarize makrofajlarla ilişkili genlerin ekspresyonlarını uyarırken NF- κ B aktivasyonu için gerekli koaktivatörlerin engellenmesiyle TNF α , Cox-2, CCL5, iNOS gibi M1 polarize makrofaj aktivasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonlarını inhibe etmektedir (Sica, 2012). IL-4 ayrıca makrofajlarda c-Myc aktivitesini uyararak M2 aktivasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonlarını düzenlemektedir (Pello, 2012).

Toll benzeri reseptörlerin sinyallenmesi NF- κ B aktivasyonuna ve enflamatuvar faktörlerin üretimini uyararak M1 polarize makrofaj fenotipinin oluşumunu uyarılmaktadır (Bonizzi, 2004). Ancak NF- κ B aktivasyonu sadece enflamatuvar bir sürecin başlamasından sorumlu olmayıp ayrıca enflamasyonun söndürülmesi ve tümörle ilişkili makrofaj (TİM) polarizasyonunda da rol oynamaktadır (Hagemann, 2008).

P50 NF- κ B homodimer uyarımı in-vitro ve in vivo ortamda M2 polarizasyonun oluşmasında önemli rol oynamaktadır (Porta, 2009). Bu faktörlerle birlikte hipoksi ile indüklenen faktörler (HIF-1 α ve HIF-2 α) de M1 ve M2 makrofaj polarizasyonda farklı olarak eksprese edilmekte ve iNOS (M1 fenotipi ile ilişkili) ve Arjinaz1 (Arg1) ekspresyonlarını düzenlemektedir (Sica, 2012).

Epigenetik değişiklikler ve kodlamayan RNA'lar dolaylı olarak makrofaj polarizasyonunda rol oynamaktadır. Örneğin IL-4 aracılı upregüle olan histon demetilaz JMJD3 fare makrofajlarında kromatin modifikasyonunu değiştirdiği ve M2 makrofaj polarizasyonu ile ilişkili genlerin ekspresyonlarını artırırken M1 makrofaj polarizasyonu ile ilişkili genlerin ekspresyonunu ise baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca mir 155 IL-13R α 1 alt ünitesini hedefleyerek M2 polarizasyonu ile ilgili genleri baskıladığı görülmüştür (Sica, 2012).

2.3. DNA Paketlenmesi

Tezimizin temel unsurlarından olan HDAC ve inhibitörlerini etkilerini kavrayabilmek için DNA paketlenmesinin nasıl gerçekleştiğini açıklamak gerekirse;

Ökaryotik canlılarda DNA, histon ve histon olmayan proteinlerle paketlenmiş halde bulunmaktadır. Kromatin adı verilen bu kompleksin ana proteinleri histon proteinleridir. Histonlar özellikle lizin ve arjinin amino asitlerince zengin, 102-135 amino asitten oluşan küçük proteinlerdir, sahip oldukları pozitif yükleri sayesinde DNA'ya kolayca bağlanabilmektedirler. H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere beş tip histon proteini vardır (Cooper, 2004).

DNA'nın paketlenmesi birden fazla aşamada gerçekleşmektedir. DNA ilk olarak 200 nükleotide bir tekrarlayan birimler halinde histon proteinleri etrafında sarılarak nükleozom paketlenmesi meydana getirmektedir. Nükleozom, kor nükleozom ile bağlaç DNA'dan meydana gelmektedir. Kor nükleozom, 146 baz çiftlik DNA'nın 1,65 dönüş yaparak histon oktameri üzerine sarılmasıyla oluşan bir yapıdır. Histon oktameri ikişer adet H2A, H2B, H3 ve H4'ten oluşmaktadır. H1 ise yaklaşık 80 baz çiftinden oluşan bağlaç DNA ile oktamer arasında bulunmaktadır. Histon proteinleri histon katlanma (fold) motifi içeren globular yapıda karboksil ve amino kuyruk bölgelerini içermektedir (Khorasanizadeh, 2004).

Nükleozom oluşumu sırasında öncelikle H3-H4 ve H2A-H2B proteinleri birbirlerine bağlanarak dimerleri oluşturmakta, H3-H4 dimerlerinin tetramer formunu almasından sonra H2A-H2B tetramerleri ile birleşerek histon oktamerini oluşturmaktadır. Histon fold bölgesi diğer histonlarla ve DNA ile etkileşime giren kısımdır. Nükleozomu oluşturan histon proteinlerinin amino kuyruk bölgeleri diğer proteinler için etkileşim yüzeyi oluşturmakta ve çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar geçirerek biyolojik olaylarda görev almaktadır (Strahl, 2000).

Histonların amino kuyruk bölgelerinde Asetilasyon, Metilasyon, Fosforilasyon, Ubikütinasyon, Adpribozilasyon gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar bulunmaktadır. Bu modifikasyonlar birbirleriyle ilişkili olarak ve diziye özgül bir biçimde gerçekleşmektedir. Modifikasyonlar histonların elektrostatik yükünü etkileyerek kromatin yapısını değiştirmekte ve protein kompleksleri için tanıma bölgesi oluşturduğu düşünülmektedir. Böylece histon-DNA ve histon-histon ilişkisi etkilenmekte, DNA paketlenmesi, replikasyonu, tamiri ve gen ifadesinin kontrolü gibi birçok biyolojik olay kontrol edilebilmektedir (Strahl, 2000) .

2.3.1 Histon Asetilasyonu

Kromatin ve DNA modifikasyonları ile transkripsiyonel düzeydeki gen ifadesinin kontrolünde histon asetilasyonu en önemli epigenetik bir düzenlenme mekanizmalarından biridir. Amino kuyruk bölgesine negatif yüklü asetil grubunun takılması pozitif yüklü lizin amino asiti yükünü kısmen kaybetmesine neden olmakta böylece kromatinde gevşeme meydana gelerek, transkripsiyon faktörlerinin genlerin promotör bölgelerine ulaşmaları kolaylaşmakta ve bu sayede transkripsiyon gerçekleşmektedir (Küçüköğlü, 2013).

Asetilasyon geri dönüşümlü olarak gerçekleşen bir olaydır. Lizin amino asitinden asetil grubunun çıkartılmasıyla kromatin tekrar kondense olmakta ve transkripsiyon baskılanmaktadır. Kromatinin belli bir bölgesinde histonların asetile olması, o bölgenin transkripsiyonel açıdan aktif olduğunu gösterirken, deasetile olması transkripsiyonun baskılandığını göstermektedir. Histon asetilasyonu transkripsiyonel düzenlenmenin yanında epigenetik kalıtım ve DNA replikasyonu gibi biyolojik olaylarda da görev almaktadır (Strahl, 2000).

Histonların asetilasyonu histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzim aileleri tarafından düzenlenmektedir. Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu arasındaki denge normal hücre büyümesi ve fonksiyonu için gereklidir.

2.3.2 Histon Asetil Transferazlar(HAT)

Histon asetil transferazlar; asetil koenzim A'daki asetil grubunun, histonların amino kuyruklarındaki lizinin -amino grubuna transferini katalizleyen enzimlerdir. Günümüze kadar HAT aktivitesine sahip, substrat özgüllüğü olan en az 30 protein gösterilmiştir (Marmorstein, 2001).

2.3.3 Histon Deasetilazlar(HDAC)

Histon deasetilazlar, histonların amino kuyruklarındaki lizin amino asitlerinden ve histon olmayan proteinlerden asetil gruplarını çıkartan enzimlerdir. Histonların deasetilasyonu kromatinin kondense olmasını, böylece gen ifadesinin baskılanmasını sağlarken, histon olmayan proteinlerin deasetilasyonu DNA replikasyonu, hücre döngüsü ve apoptozun düzenlenmesinde görevlidir (Dokmanovic, 2005). Bugüne kadar 18 insan HDAC enzimi tanımlanmıştır.

HDAC ailesi üyeleri maya HDAC homologilerine göre dört guruba ayrılmışlardır. Sınıf I, II ve IV çinko bağımlı enzimleri içermektedir, sınıf III üyeleri ise NAD⁺ bağımlı enzimlerdir. Sınıf I HDACs nükleer enzimlerdir ve tüm dokularda eksprese edilmektedir ve birçok tümör tipinde aşırı eksprese durumdadır. Bu enzimler histonların ve diğer DNA'ya bağlanan proteinlerin deasetilasyonu ile transkripsiyonel korepressör olarak hareket eder ve birçok geni etkileyerek hücre farklılaşması, hücre büyümesi ve anjiogenesi transkripsiyonel düzenlenmesinde iş görürler. Sınıf II deasetilazların daha çok hücre olgunlaşması ve farklılaşması ile ilgili olduğu görünmesine karşın, sınıf II deasetilazlardan biri olan HDAC6'nın son zamanlarda sitoplazmik bir protein olan beta-tubulinin deasetilasyonunu katalizlediği gösterilmiştir (Hubbert, 2002).

HDACI'lar, birçok transforme ya da kanser hücre tipinde nükleozomal histonların hiperasetilasyonunu tetikleyerek, baskılanmış genlerin yeniden aktif hale gelmesini sağlar. Birçok kanser tipinde baskılanmış olan bu genler fizyolojik şartlarda apoptozu ve farklılaşmayı tetikleyerek, hücre döngüsünün G1 ve G2 fazında durmasına neden olup, hücre çoğalmasını inhibe ederler. Antitümör aktiviteye sahip HDACI'ların en çok dikkat çeken özelliklerinden birisi, HDAC inhibisyonu ile oluşan asetilasyonun sadece belli genlerin transkripsiyonunu aktive etmesi ve bu yolla tümör büyümesini inhibe etmesidir (Marks, 2000).

HDACI'ların antitümöral özellikleri arasında, tümöre kan sağlama, metastatik potansiyel ve konak immun cevabı gibi daha sistemik etkiler de bulunur. HDACI'lar VEGF (vaskuloendotelial büyüme faktörü) gibi pro-anjiogenik faktörlerin ekspresyonunu baskılayarak ve endotelial hücrelerin anjiogenik teşvike duyarlılığını azaltarak anjiyogenezi engellemektedir (Deroanne 2002).

HDACI'lar, tümör büyümesi için önemli olan yeni kan damarlarının oluşumunun engellenmesine ek olarak matriks metalloproteinaz enzimlerinin ekspresyonunu da inhibe eder. Matriks metalloproteinazlar tümörlerin etrafını saran bazal membranı yıkar, bu da metastazın başlamasında oldukça önemli bir adımdır. Bununla beraber HDACI'ların konak immun cevabını teşvik etmesiyle, tümör hücreleri immun sistem tarafından yıkılmaya daha duyarlı hale gelebilir (Johnstone, 2002). Tüm bu veriler göz önüne alındığında, HDACI'ların kanserin başlangıcı ve gelişimindeki çeşitli hücrel ve fizyolojik süreçlerde etkin bir role sahip olduğu görülmektedir.

Histon deasetilaz inhibitörleri anti kanser özelliklerinin yanında son yıllarda yapılan çalışmalar aynı zamanda anti enflamatuvar özelliklerinin de olduğu çeşitli hayvan modelleri üzerine yapılan deneylerde gösterilmiştir (Dominik, 2015). Romatoid artrit, enflamatuvar bağırsak hastalığı ve fibrozis gibi kronik enflamatuvar hastalık modellerinde histon deasetilazların immün hücreler üzerine anti enflamatuvar etki gösterdikleri bulunmuştur (Halili, 2010).

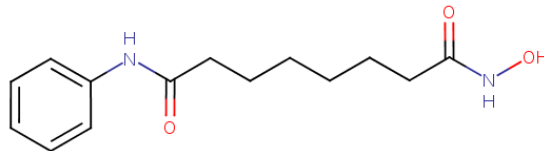
Enflamatuvar hücreler üzerine apoptozu indükleyerek anti enflamatuvar etkilerini gösterebildikleri gibi, 2011 yılında Roger ve arkadaşları tarafından insan ve fare makrofajları üzerine bir histon deasetilaz inhibitörü olan TSA'nın etkileri incelendiğinde bu etkinin sadece enflamatuvar hücrelerin apoptozu ile olmadığı doza bağımlı olarak makrofaj hücrelerinin pro-enflamatuvar sitokin salınımlarının düştüğü bunun yanında anti-enflamatuvar sitokin salınımlarında artış olduğu görülmüştür (Roger, 2011). Ancak histon deasetilaz inhibitörlerinin enflamatuvar hücreler üzerine etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Çok çeşitli HDACi bulunmakta olup tezimizde kullandığımız Vorinostat hakkında bilgi vermek gerekirse;

2.4. Vorinostat

Bir histondeasetilaz inhibitörü olan Vorinostat Givinostat, Abexinostat, Panobinostat, Belinostat ve Trichostatin gibi kimyasalların dahil olduğu hydroxamate grubu bir kimyasaldır. Bu ilaçlar hastalıkların oluşmasında genetik mutasyonların yanı sıra HDAC enzimlerinin aktivasyonundaki farklılıklar, hücrelerde gen ekspresyonlarını değiştirmekte ve sonuçta fenotipik farklılıkların oluşabileceği öngörüsü ile üretilmişlerdir (Sophia ve ark, 2012). HDAC inhibitörleri özel hücre tiplerinde hem in-vitro hemde in-vivo koşullarda etkilerini gösterebilmekte ve hücre farklılaşması ve hücreleri apoptoza yönlendirebilmektedirler. HDAC inhibitörlerinin anti kanser ajanı olarak kabul edilmesine karşın bu ilaçların etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır.

Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA, Zolinza®) oral olarak da kullanılabilen bir HDAC inhibitörüdür. Yarılanma ömrü 2 saat olan Vorinostatın, kutanöz T hücre lenfomaları için tedavi amaçlı kullanımına 2006 yılında FDA tarafından onay verilmiştir. Formülü $C_{14}H_{20}N_2O_3$ moleküler ağırlığı 264.32 g/mol dür. (Sophia, 2012) Vorinostatın kimyasal yapısı Şekil 1 de görülmektedir.



Şekil 1. Vorinostatın Kimyasal Yapısı

2.4.1. Vorinostat Etki mekanizması

Vorinostat Histon Deasetilaz aktivasyonu için geniş spektrumlu bir inhibitördür. Sınıf I ve sınıf II Histon Deasetilaz enzimleri için inhibitör etkisi göstermekle beraber sınıf III histon deasetilaz enzimleri için bu etkisini gösteremez. Kristalografik çalışmalar Vorinostatın histon deasetilaz enzimlerinin katalitik bölgelerindeki çinko atomlarına fenil halkasıyla bağlanarak etkisini gösterdiği bulunmuştur. HDAC enzimlerine bu bağlanma sonucunda histonları da içeren asetillenmiş protein seviyesinde bir artış meydana gelmekte ve bu durum birçok

hücresel etki meydana getirmektedir. Meydana gelen bu etkiler hem transkripsiyonel hem de transkripsiyonel olmayan yollarla iki şekilde meydana gelebilmektedir (Sophia, 2012).

Transkripsiyonel etkiler:

Transkripsiyonel etkiler ya Vorinostatın direk olarak HDAC'lara bağlanmasıyla ya da indirek olarak E2F-1, YY-1, Smad 7, P53, Bcl-6 ve GATA-1 gibi transkripsiyonel faktörleri etkileyerek meydana gelmektedir. Bu etkiler bazı genlerin ekspresyonlarında farklılıklar meydana getirebilmektedir. Örneğin Bcl-6 transkripsiyonel aktivatörün asetilasyonu Bcl-6'nın transkripsiyonel baskılanmasının inhibisyonuna neden olmaktadır. Diğer indirek transkripsiyonel etkiye HSP-90 ve alfa tubulin proteinlerinin lizin bölgelerinin asetillenmesi örnek olarak verilebilir. Bu durum Bcr-Abl, mutant FLT-3, c-raf ve AKT gibi insan lösemik hücrelerindeki sağkalım ve büyüme protein aktivasyonlarında azalma meydana getirebilmektedir (Sophia, 2012).

Vorinostatın Transkripsiyonel olmayan etkileri incelendiğinde:

Vorinostatın transkripsiyonel olmayan etkileri başlıca üç fonksiyon altında gerçekleşmektedir;

- Hücre döngüsünün durdurulması

Vorinostat siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21'i upregüle ederek malin hücre hatlarında siklin/CDK kompleksiyle yarışarak hücre döngüsünün G1 fazında durmasına neden olur. Ayrıca Vorinostat siklin bağımlı kinaz aktivasyonunu siklinlerin down regülasyonu ile azaltmakta ve buda Rb defosforilasyonuna neden olarak E2F transkripsiyonel aktivasyonuna indirek etki etmesine neden olmaktadır (Sophia, 2012).

- Apoptoz

Vorinostat hem transkripsiyonel hem de transkripsiyonel olmayan mekanizmalarla hematolojik malignansilerde ve solid tümörlerde apoptozu uyarmaktadır. Histon deasetilaz enzimlerinin inhibisyonu apoptotik ve anti apoptotik proteinler arasındaki dengeyi bozarak hücreyi apoptoza yönlendirebilmektedir.

Ekstrinsik apoptotik yolakta ölüm reseptörleri ve ligantları Vorinostat ile açılabilir. Ayrıca TRAIL dirençli malin hücrelerde TRAIL tekrar restore edilebilmektedir. Bunlarla birlikte Vorinostat Bcl-1 ve Bcl-2 sağkalım proteinlerinin down regülasyonu ile mitokondriyal bütünlüğü düzenleyebilmekte ve Bim, Bak, Bax gibi apoptotik

proteinleri upregüle ederek intrinsik yolda da iş görebilmektedir. Ayrıca malin hücre hatlarında P53 stabilitesini sağlayabilmektedir (Sophia, 2012).

- **Anjiogenezin inhibisyonu**

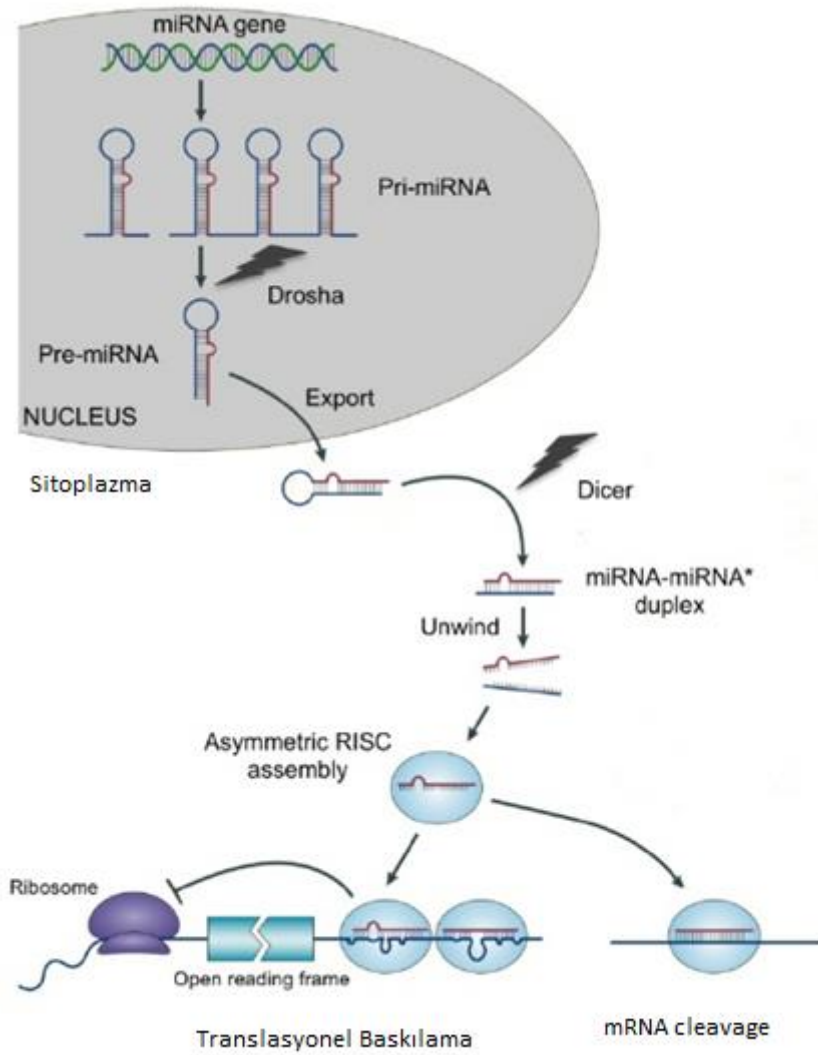
Yeni kan damarlarının oluşumu olarak bilinen anjiogenezin inhibisyonunda Vorinostat hipoksik koşullarda HIF-1 ve VEGF üretimini baskılayarak indirekt olarak anjiogenezini durdurmaktadır (Duvic, 2007).

Enflamasyonun epigenetik kontrolünde henüz tam olarak aydınlatılmamış bir başlık miRNA'lardır.

2.5. miRNA'lar ve Biyogenez

miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda, küçük kodlamayan RNA molekülleridir ve metazoanları ve bitkileri içeren birçok canlıda gen ifadesinin transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenlenmesinde fonksiyonel rol oynarlar. miRNA'ların memelilerde protein kodlayan genlerin yaklaşık %50'sinin aktivasyonunu kontrol ettiği düşünülmektedir.

Fonksiyonel çalışmalar, miRNA'ların şimdiye kadar araştırılan hemen her hücresel sürecin düzenlenmesine katıldığını ve bunların ekspresyonundaki değişiklikler birçok insan patolojisi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Olgun miRNA'lar pri-miRNA denilen öncül moleküllerden üretilmektedir. Pri-miRNA'lar RNA polimeraz II tarafından bağımsız genlerden veya protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinden transkribe edilmektedir. Pri-miRNA'lar saç tokası formundadır ve Drosha ve Dicer adı verilen RNase III ailesi üyesi için substrat olarak davranır. Drosha pri-miRNA'ları yaklaşık 70 nükleotit boyutunda keserek pre-miRNA'ları oluşturur. Stoplazmaya geçen pre-miRNA'ları ise Dicer yaklaşık 20 bp miRNA/miRNA formuna dönüştürür. Bu çift zincirli RNA'nın bir zinciri olgun miRNA olarak miRISC (miRNA-induced silencing kompleks)'e katılır. miRISC'inin bir üyesi olarak miRNA'lar mRNA'ları hedefleyerek bunların translasyonel baskılanmasında veya deadenilasyonunda ve degradasyonunda rol alırlar(Şekil 2) (Krol, 2010)



Şekil 2. miRNA biyogenezi (Goyvaerts ve ark, 2013)

Son yıllarda miRNA'lar üzerine yapılan fonksiyonel çalışmalar bağışıklık ve enflamatuvar yanıtın gelişmesinde miRNA'ların önemli düzenleyiciler olduklarını ortaya çıkarmıştır (O'Connell 2012). Ayrıca bozulmuş miRNA düzenlenmesinin artmış veya kontrol edilemeyen enflamasyona neden olduğunun bulunması miRNA'ların normal ve patolojik bağışıklık sistemi fonksiyonlarını düzenlemede ne kadar önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Alam, 2011)

2.5.1. miRNA'lar ve Doğal Bağışıklık

Doğal bağışık sisteminin düzenlenme mekanizmalarında rol oynan faktörlerden biri de miRNA'lardır. miRNA'ların enflamatuvar cevapta rol oynayan bağışıklık hücrelerinin farklı miRNA'ları eksprese etmesiyle sürece katılmaktadırlar. Aktive olmuş bağışıklık hücrelerinde

bir düzineden fazla miRNA'nın ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir. Bu miRNA'lara örnek olarak miR-146a verilebilir, bu miRNA'nın ifadesi TLR4 ligantı lipopolisakkaritle uyarıldığında monositik hücrelerde hızlı bir şekilde artmakta ve Tümör nekroze edici faktör reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TRAF6) ve interleukin (IL)-1 reseptör ilişkili kinaz-1'i hedefleyerek TLR sinyallenmesinin negatif düzenleyicisi olarak davranmaktadır (Taganov, 2006). Bu özelliği göz önüne alındığında miR-146 ifadesinin artışının endotoksin toleransı için doğal bağışıklıkta vazgeçilmez bir faktör olduğu söylenebilir. Bu bulgular miR-146a'nın yetersiz uyarılması aşırı aktive veya uzamış enflamasyona neden olabileceği düşünülebilir (Nahid, 2009).

mir-146a ayrıca makrofajlarda veziküler stomatit virüs tarafından uyarılan interferon yanıtı için de negatif düzenleyicidir (An, 2017). Bu miR146a'nın doğal bağışıklıkta hem bakteriyel hem de viral enfeksiyonlarda immün yanıt için önemli rol bir rol oynayabileceğini göstermiştir. 2011 yılında Boldin ve arkadaşları tarafından miR-146a ifade etmeyen farelerde yapılan çalışmada bu farelerde otoimmün bozuklukların geliştiği ayrıca bu farelerin LPS uyarımına aşırı hassas oldukları gösterilmiştir (Boldin, 2011).

Doğal bağışıklıkta rol oynayan bir diğer miRNA LPS uyarımı sonucu monositik miR-21 dir. miR-21'in artmış ifadesine LPS ile uyarılmış nükleer faktör-kB aktivasyonunun ve IL-6 ifadesinin azaldığı durumlarda ve artmış IL-10 ifadesinin olduğu durumlarda bulunmuştur. miR-21 anti-enflamatuvar etkisini proenflamatuvar protein olan tumor suppressor programlanmış hücre ölüm proteini 4'ü hedefleyerek gerçekleştirmektedir (Sheedy, 2010).

miR-155 doğal immün sistemin düzenlenmesinde kritik rol oynayan bir diğer miRNA dır. miR-155 makrofajlarda hem viral hem de viral kaynaklı antijenlere yanıt olarak uyarılmaktadır. Yapılan çalışmalar miR-155'in dentritik hücrelerde ise enflamatuvar yanıtın bir negatif düzenleyicisi olarak işlev gördüğü bulunmuştur (Ceppi, 2009). Dentritik hücrelerdeki negatif düzenleyici etkisine karşın birçok bulgu mir-155'in proenflamatuvar bir miRNA olduğunu göstermiştir.

Farklı miRNA lar enflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde beraber çalışmaktadırlar. Bağışıklık sistemi hücrelerinde TLR uyarımı sonucu miR155 ve miR-21'in ekspresyonları verilebilir. TLR aktivasyonu sonucu miR-155 suppressor of cytokine signaling 1 ve phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1'i hedef alarak enflamatuvar yanıtı desteklemektedir (Androulidaki, 2009). Ancak miR-155'in bu etkisi miR-21 tarafından uyarılan IL-10 yanıtı ile sınırlandırılmaktadır. IL-10 miR-155 inbisyonuna neden olarak TLR sinyallenmesi sonucu oluşan enflamatuvar yanıtın baskılanmasını sağlamakta böylece enflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar (McCoy, 2010).

Birçok miRNA enflamatuvar süreçte görev alan sinyal moleküllerini hedef olarak enflamatuvar süreci düzenlemektedir. Örneğin miR-223, miR-105, miR-19 ve let-7 ailesi üyeleri direkt olarak TLR2, TLR3 veya TLR4'ü hedefleyerek bu etkilerini göstermektedirler (Liu, 2013). Bu miRNA'lar bağışıklık sistemi hücrelerinin TLR'ye özgü ekstrasellüler ligantlarla etkileşime girme yeteneklerini etkileyerek bu etkilerini gösterebilir (Chen, 2007). Makrofajlarda miR-147 ekspresyonu TLR2, TLR3 veya TLR4'ün hem MyD88 hem de TIR-domain containing adapter-inducing interferon- β 'ye bağımlı olarak aktivasyonundan sonra indüklenmektedir ve aşırı enflamatuvar cevabı engellemek için negatif düzenleyici olarak görev almaktadır (Liu, 2009). miR-9 ise nötrofil ve monositlerde LPS uyarımından sonra ekspresyonu indüklenmekte ve NF- κ B bağımlı enflamatuvar yanıtı nuclear factor- κ B1 transkriptlerin ekspresyonlarını baskılayarak negatif düzenleyici olarak çalışmaktadır (Bazzoni, 2009).

Let-7i ve miR-125b gibi bazı miRNA lar mikrobiyal enfeksiyonlar ve LPS uyarımında ekspresyonları azalmaktadır. Bu miRNA'ların azalmış ekspresyonları da enflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Tüm bu kanıtlar miRNA ekspresyonlarının enflamatuvar cevabın düzenlenmesinde kritik rol oynadığını göstermiştir (Liu, 2013).

2.5.2. Makrofaj polarizasyonu ve miRNA'lar

Yakın zamanlı yapılan çalışmalar makrofaj polarizasyonunda özellikle transkripsiyonel düzenlemenin görev aldığını göstermiştir. Nuclear factor- κ B, activator protein-1, CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP- α), PU.1 ve IFN-regulatory factor 5 transkripsiyon faktörleri M1 aktivasyonunda rol oynarken, peroxisome proliferator-activated receptor- γ , IFN regulatory factor 4, C/EBP- β ve Kruppel-like factor 4 gibi transkripsiyon faktörleri ise M2 aktivasyonunda rol oynamaktadırlar (Lawrence, 2011). Ayrıca histon deasetilaz 3'ü içeren epigenetik düzenleyici enzimler de M2 makrofaj polarizasyonunda önemli roller oynamaktadır (Takeuchi, 2011).

Birçok miRNA enflamatuvar cevabın oluşmasında rol alan sinyal ağında görevli düzenleyici molekülleri hedef olarak cevabın güçlendirilmesinde veya azaltılmasında görev almaktadır. TLR aktivasyonunun klasik aktive olarak adlandırılan M1 makrofaj fenotipinin oluşmasını uyardığı göz önüne alındığında enflamasyonda rol oynayan miRNA'ların M1 makrofaj polarizasyonunda da rol oynadığı düşünülebilir. Ancak bu miRNA'ların M2 makrofaj fenotipinin oluşmasına katılımı veya görevi konusunda yeterli bilgi yoktur. Makrofaj polarizasyonuna katılan miRNA'ların belirlenmesi günümüzde aktif olarak çalışılan bir

konudur. Ancak yapılan çalışmalarda M1 ve M2 makrofajları arasında az sayıda miRNA ekspresyonunun iki kattan fazla bir değişim gösterdiği görülmektedir (Graff, 2012).

2.6. Hipotez

Yapmış olduğumuz çalışmanın hipotezi bir histon deasetilaz inhibitörü olan Vorinostat'ın polarize makrofajlarda farklı fenotipik özelliklerin oluşmasını sağlayabileceği ve bu etkisini makrofaj aktivasyonunda rol alan miRNA ekspresyon profillerini değiştirerek gerçekleştirebileceğidir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hücre Kültürü

Tüm deneylerimizde Raw 264.7 fare makrofaj hücre hattını kullanmış olup, bu hücre hattı Koç Üniversitesi öğretim üyesi Doç.Dr. Tamer Önder'den temin edilmiştir. Raw264.7 fare makofaj hücre hattının kültüre edilmesinin optimizasyonu Tıbbi Genetik Anabilim Dalı bünyesinde bulunan hücre araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Raw 264.7 fare makrofaj hücreleri %10 FBS içeren DMEM F12 besi ortamında ve %5 CO₂ atmosferine sahip nemli etüvde inkübe edilerek kültüre edilmiştir.

3.2. Vorinostatın hazırlanması

Üretici firma tarafından liyofilize halde sunulan Vorinostat (Cayman) , firmanın önerdiği şekilde 50 mM konsantrasyon olacak şekilde DMSO içerisinde çözdürülmüş, filtreden geçirilerek steril hale getirilmiş ve alikotlanarak -20 C° de stoklanmıştır. Deney sürecinde kullanılacak konsantrasyonlar besi ortamı kullanılarak hazırlanmıştır.

3.3. Hücre Canlılık Analizi

12 kuyucuklu plate içerisinde her kuyuya 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve üzerine toplam hacim 1 ml olacak şekilde %10 FBS ve %1 Penisilin Streptomisin içeren DMEM F12 besi yeri ilave edilmiştir. 24 saat hücreler kuyucukların tabanına yapışması için %5 CO₂ ve %95 nemli hava şartlarına sahip etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra hücrelerin genel durumları mikroskop altında incelenmiş ve hücrelerin kuyucuk tabanına yapıştıkları teyit edildikten sonra Vorinostatın farklı dozlarda uygulanması aşamasına geçilmiştir.

Yaptığımız literatür taramaları da göz önüne alınarak denenen dozlar 0,01 µM, 0,05 µM, 0,1 µM, 0,2 µM,0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM ve 30 µM şeklindedir. Uygulanan her doz için 3 tekrar şeklinde ve 24, 48 ve 72 saat olmak üzere 3 farklı zamana bağlı olarak kültür planlanmıştır. Belirlenen zaman dilimleri sonrasında hücrelerin mikroskop altında görüntüleri çekilmiş ve sayımları yapılarak değerlendirilmiştir.

Sitotoksik doz aralığının belirlenebilmesi için MTT (Boster, ABD) kiti kullanılarak hücre canlılık analizi gerçekleştirilmiştir.

MTT analizinde kullanılan protokol;

- 1- 25 cm² flask içinde kültüre edilmiş Raw 264.7 fare makrofaj hücrelerinin besi ortamı uzaklaştırılarak taze besi ortamı eklendi.
- 2- Hücreler taze besi ortamı içinde kazınarak kaldırıldı ve pipetaj yapılarak homojenize olmaları sağlandı.
- 3- Kuyucuk başına 10.000/100µl hücre olacak şekilde hücreler alınarak 96 kuyucuklu hücre kültür kabına ekim yapıldı ve 24 saat inkübasyona bırakılarak hücrelerin kuyucuk tabanına yapışmaları sağlandı.
- 4- 24 saat sonunda hücrelerin yapışıklıkları mikroskop altında teyit edildi.
- 5- Kuyucuklar sırasıyla kontrol, DMSO, 20, 15, 10, 7.5, 5, 3.75, 2.5, 1.875, 1.25, 0.625 µM Vorinostat şeklinde işaretlendi ve belirlenen konsantrasyonlar hücrelere uygulandı.
- 6- Belirlenen her konsantrasyondan 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı ve 24, 48 ve 72 saat olmak üzere 3 farklı deney kuruldu ayrıca bir kuyucuğa ölçümde körleme olarak kullanılmak üzere sadece besi ortamı kondu.
- 7- Belirlenen süre kültüre edilen hücrelerin bulunduğu kuyucuklara üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda 10µl MTT solüsyonu eklendi ve 4 saat etüvde inkübasyona bırakıldı.
- 8- İnkübasyon sonunda oluşan formazan kristallerinin çözünmesini sağlayan formazan çözücü solüsyonundan 100 µl eklendi ve yavaşça pipetaj yapıldı ve 10 dakika beklenildi.
- 9- 10 dakika sonunda kültür kabı ELISA ölçüm cihazında 570nm'de ölçülerek değerler tabloya aktarıldı.

Örneklere ait okunan değerlerden körleme amacıyla hazırlanan kuyucuğa ait değer çıkartılarak elde edilen sonuçlar grafiğe aktarılmış ve değerlendirilmiştir.

3.4. Vorinostat için etkin dozun belirlenebilmesi için HDAC aktivasyon analizinin gerçekleştirilmesi

Araştırmamızda kullanacağımız Vorinostat'ın Raw 264.7 fare makrofaj hücreleri üzerine olan sitotoksik doz aralığının belirlenmesinin ardından tespit edeceğimiz dozun gerçekten Histon deasetilaz aktivasyonunu inhibe edip edemeyeceğini anlamak amacıyla etkin dozunun belirlenebilmesi için HDAC aktivasyon analizi gerçekleştirilmiş ve HDAC aktivasyonunun olup olmadığı tespit edilmiştir.

HDAC aktivasyon analizi HDAC activity colorimetric assay kit (BioVision) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Test prosedürü;

- 1- Hücreler her kuyuya 500.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür plaklarına ekilmiştir. 24 saat inkübasyonun ardından tüm besi ortamı uzaklaştırılarak yeni besi ortamı ilave edilmiştir.
- 2- Besi ortamlarının içine 4 – 2 – 1 - 0,5 ve 0,25 µM olacak şekilde Vorinostat eklenmiş ve 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kontrol için HeLa Nükleer ekstraktı, negatif kontrol için Vorinostat uygulanmamış hücre lizatı 1mM TSA ile muamele edilip kullanılmıştır.
- 3- Hücreler toplanarak üzerlerine 1000 µl proteaz inhibitör kokteyl içeren lizis tamponu eklenerek karıştırılmış ve 30 dakika buz üzerinde arada pipetaj yapılarak inkübe edilmiştir. Lizat 15 dakika 15.000g hızda santrifüj edilerek üst faz alınmış ve protein miktarı Nanodrop 2000c cihazında protein A 280 programında ölçülmüştür. Daha sonra örnekler deney yapılana kadar -80 C⁰ de bekletilmiştir.
- 4- Her kuyuya 200µg protein gelecek şekilde hücre lizatı eklenmiş ve 85 µl su ile sulandırılıp üzerine HDAC assay buffer ve HDAC Kolorimetric substrat eklenerek 1 saat 37 C⁰ de inkübe edilmiştir.
- 5- Lysine developer eklenerek 30 dakika 37 C⁰ de inkübe edilmiş ve Rayto RT-4000 ELISA cihazında 400 nm dalga boyunda OD değerleri okunmuştur.

3.5. Makrofaj Polarizasyonunun gerçekleştirilmesi

25 cm² hücre kültür flasklarında kültüre edilen hücreler flask tabanından kazınarak toplanmış ve 20 µl hücre süspansiyonu 20 µl Trypan Blue boyası ile boyanarak 5 dakika beklenmiş ve daha sonra thoma lamında hücre sayımı ve canlılık analizi gerçekleştirilmiştir.

6 kuyucuklu hücre kültür plaklarına her kuyucuğa 500.000 hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiş ve %10 FBS için DMEM F12 besi ortamında 24 saat hücrelerin plak tabanına yapışmaları beklenmiştir.

Hücrelerin plak tabanına yapıştıkları mikroskop altında kontrol edildikten sonra tüm ortam çekilerek istenilen makrofaj polarizasyonuna uygun besi ortamı eklenmiştir.

3.5.1.M1 Polarizasyonu

Hücreler M1 (klasik aktivasyon) polarizasyonunun gerçekleştirilebilmesi amacıyla besi ortamı içine 20 ng/ml IFN-gamma (Biological Industries, İsrail) ve 10 ng/ml LPS (sigma) ilave edildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.5.2. M2 polarizasyonu

Hücreler M2 (alternatif aktivasyon) polarizasyonunun gerçekleştirilebilmesi amacıyla besi ortamı içine 20 ng/ml IL-4 ilave edilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakıldı.

M1 ve M2 hücreleri 24 saat süreyle serumlu besi ortamında uyarımlar gerçekleştirildikten sonra hücreler serumsuz ortamda polarizasyonda kullanılan uyarıcılarla kültüre edilmiş ve bundan sonraki deneylerde ve ölçümlerde bu hücreler kullanılmıştır.

Makrofaj polarizasyonun kontrolü sitokin salınımlarının analizi, hücre yüzey belirteçlerinin akım sitometresiyle analizi ve gen ekspresyonlarının analizlerinin gerçekleştirilmesiyle yapılmıştır.

3.5.3 Deney Gruplarının Oluşturulması

Polarize edilmiş makrofaj hücreleri ve kontrol grubu olarak uyarı verilmemiş makrofaj hücreleri üzerine Vorinostat'ın etkilerinin araştırılabilmesi için deney grupları oluşturulmuş ve gruplar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Deney grupları ve uyarı miktarları

M1 hücreleri	M1
	M1 + 1 μ M Vorinostat
	M1 + 100 ng/ml LPS
	M1 + 1 μ M Vorinostat + 100 ng/ml LPS
M2 hücreleri	M2
	M2 + 1 μ M Vorinostat
	M2 + 100 ng/ml LPS
	M2 + 1 μ M Vorinostat + 100 ng/ml LPS
Kontrol hücreleri	Kontrol
	Kontrol + 1 μ M Vorinostat
	Kontrol + 100 ng/ml LPS
	Kontrol + 1 μ M Vorinostat + 100 ng/ml LPS

3.6. Sitokin Salınımlarının Analizi

Sitokin salınımları araştırılan sitokine özgün ELISA (Boster, USA) kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

ELISA analizi için uygulanan protokol;

- 1- Toplanan hücre kültür ortamlarından 100 µl tabanına araştırılan sitokin antikoruna sabitlenmiş plak içine eklenmiş ve 37 C⁰ de 90 dakika inkübe edilmiştir.
- 2- İnkübasyonun ardından plaka içindeki besi ortamı dökülmüş ve araştırılan sitokine ait biyotinli antikor 99:1 oranında seyreltilerek 100 µl olacak şekilde kuyucuklara dağıtılmış ve 37 C⁰ de bir saat inkübe edilmiştir.
- 3- Plakların içeriği dökülmüş ve üç kez PBS ile yıkanmış daha sonra 99:1 oranında seyreltilmiş konjugat 100 µl olacak şekilde eklenmiş ve yarım saat de inkübe edilmiştir.
Plakların içeriği dökülmüş ve beş kez plaklar PBS ile yıkanmış ve her kuyucuğa 90 µl renklendirici eklenerek 25 dakika 37 C⁰ de inkübe edilmiştir.
- 4- İnkübasyonun ardından sitokin seviyesine göre mavi tonlarında bir renklenmenin olduğu görülmüştür. Reaksiyonun durdurulması amacıyla durdurma solüsyonu eklenmiştir. Durdurma solüsyonu eklendiğinde sarının tonları şeklinde bir renklenme görülmüştür.
- 5- Oluşan renklenme değerleri 470 nm dalga boyunda ELISA cihazında ölçülmüştür.

3.7. Akım Sitometrisi Analizi

Makrofajlara ait hücre yüzey belirteçleri akım sitometrisi kullanılarak araştırılmıştır. Akım sitometri analizleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez laboratuvarında kurulu akım sitometrisinde (BD, USA) gerçekleştirilmiştir. Akım sitometrisi analizinde izlenen protokol;

- 1- Toplanan hücrelerin sayıları belirlenmiş ve süspansiyondan ortalama 1000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu bir tüp içine alınmıştır.
- 2- Farklı boylarla işaretlenmiş CD86 ve CD206 antikorları herbirinden 2 µl olacak şekilde hücrelerle karıştırılmış ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 3- Hücreler akım sitometrisinde analiz edilerek hücre yüzey belirteçleri analiz edilmiştir.

3.8.Gen ekspresyonlarının Analizi için RNA İzolasyonu ve cDNA sentezi:

Makrofaj polarizasyonunun gen ekspresyonu düzeyinde kontrolü amacıyla hücre hatlarından RNA izolasyonu yapılarak cDNA çevrimi gerçekleştirilmiştir.

3.8.1. RNA izolasyonu:

Düzenlenmiş deney gruplarından ayrı ayrı RNA izolasyonu Trizol kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

-Hücreler kültüre edildikleri plate üzerinden kazınarak toplanmıştır.

-Toplanan hücreler 1500 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz uzaklaştırılarak pellet üzerine 1 ml Trizol eklenmiş ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

-200 µl kloroform ilave edilerek oda sıcaklığında 3 dk inkübasyonu takiben örnekler 12000xg'de 10 dk +4°C de santrifüj edilmiştir.

-Santrifüj sonrası ortaya çıkan 3 fazdan RNA'nin bulunduğu en üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve 500 µl isopropanol ilave edilerek RNA presipite edilmiş ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır.

-Örnekler 12000xg'de 10 dk +4°C de santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı.

-Pelletin üzerine 1 ml %75'lik EtOH ilave edilerek 7500xg'de 5 dk +40C de santrifüj edilmiştir.

-Üst faz uzaklaştırılmış örnekler 5 dk oda sıcaklığında kurutmaya bırakılmıştır.

-Pellet RNase-free su da çözülmüş ardından 60 °C 10 dk inkübe edilmiştir.

3.8.2. cDNA sentezi:

Elde edilen RNA örnekleri ABM, High Capacity cDNA RT(ABD) kit kullanarak cDNA'ya çevrilmiştir.

Tablo 2.cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı ve ısı şartları.

Materyal	Miktar
10X RT buffer	2µl
25X dNTP	0,8 µl
10X Random primer	2 µl
Multiscribe RT	1 µl
dH ₂ O	4,2 µl
RNA	2 µg
Toplam	20 µl

Sıcaklık	Süre
25°C	10 dk
37°C	120 dk
85°C	5 dk

3.8.3. qRT-PCR yöntemi kullanılarak gen ekspresyonlarındaki değişikliklerin tespiti

ABM Eva Green SyBR Mix kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. Gerçek-zamanlı PCR yöntemi için gerekli reaksiyon karışımı

SyBR Green Master mix	10 µl
dH ₂ O	7 µl
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl
cDNA	1 µl
Toplam Hacim	20 µl

Reaksiyon koşulları:

95°C 10 dk
 95°C 10 sn
 60°C 60 sn

} 40 Döngü

3.9. Mikroarray yöntemi ile miRNA ekspresyon analizi

miRNA mikroarray çalışmasında izlenen basamaklar sırasıyla;

1-RNA Hazırlanması

2-Poly(A) Kuyruklama

3-Ligasyon

4-Hibridizasyon

5-Yıkama-Boyama-Tarama

1-RNA HAZIRLANMASI

İzole edilmiş RNA örnekleri agaroz jelde yürütülüp konsantrasyonlar ölçülerek çalışmaya uygun olması teyit edildi. RNA başlangıç konsantrasyonu 0,1 µg - 3 µg arasında olan örnekler çalışmaya dahil edildi. Hazırlanan RNA 8 µl'ye nükleaz içermeyen su ile tamamlandı ve diğer aşamaya geçildi.

2-Poly(A) Kuyruğu Eklenmesi

Bu aşama RNA molekülüne 3' ucundan Poly(A) kuyruğu ekleme aşamasıdır. Kuyruklama için gerekli enzim ve tamponlar hazırken, bu aşamada özel olarak ATP karışımı 1 mM'lık Tris ile dilüe edildi.

Dilüsyon için kullanılan formül:

1000/ µg başlangıç total RNA

ÖRNEK: Başlangıç miktarı 2 µg olan RNA örneği için;

$1000/2=500$ bu durumda bu örnek için ATP karışımı 1'e 500 oranında dilüe edildi.

RNA örneği üzerine dilüe edilen ATP ve diğer enzim ve tamponlarda eklendi ve 15 dakika 37 de inkübasyona bırakıldı.

Tablo 4. Poly(A) kuyruğu eklenmesinde kullanılan malzemeler ve miktarları

KULLANILAN MALZEMELER	MİKTARLAR
RNA spike control oligos	2,0 µl
ATP karışımı(dilüe edilmiş)	1,0 µl
PAP enzimi	1,0 µl
10x reaksiyon tamponu	1,5 µl
25 mm mncl ₂	1,5 µl
Toplam hacim	15 µl

3-Ligasyon

İnkübe edilen örnek alınıp buz üzerine konuldu. Biotin karışımı ve T4 DNA ligaz enzimi eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresi dolduktan sonra reaksiyonu durdurmak için son olarak durdurucu solüsyon eklendi ve ligasyon evresi tamamlandı.

Tablo 5. Ligasyonda kullanılan malzemeler ve miktarları

KULLANILAN MALZEMELER	MİKTARLAR
5x flash tag ligation mix biotin	4,0 µl
T4 DNA ligase	2,0 µl
Stop solüsyonu	2,5 µl
Toplam hacim	23,5 µl

Diğer aşamada toplam 23,5 µl'lik hacmin 21,5 µl'i alındı.

4-Hibridizasyon

Hibridizasyon karışımı hazırlanıp örnek üzerine eklendi, 99°C'de 5 dakika, 45°C'de 5 dakika inkübe edildi. Bu sırada hibridizasyon fırını 48°C 'ye ısıtıldı. Örnek array içine yüklendi ve 16 saat boyunca hibridize olması beklendi.

Tablo 6. Hibridizasyonda kullanılan malzemeler ve miktarları

KULLANILAN MALZEMELER	MİKTARLAR
2x hybridization mix	66 µl
Nuclease free water	3.7 µl
Deionized formamide	19.2 µl
DMSO	12.8 µl
20x eukaryotic hybridization controls	6.6 µl
kontrol oligonucleotide b ₂ , 3nm	2.2 µl
TOPLAM HACİM	110,5 µl

20x eukaryotic hybridization kontrol'ü karışım hazırlanmadan önce 5 dakika 65°C'de inkübe edildi.

5-Yıkama, Boyama ve Tarama

16 saat sonunda Array hibridizasyon fırınından alındı ve bilgisayara bağlı olan yıkama istasyonunda array için uygun protokol seçildi. Gerekli tampon ve solüsyonlarla yıkama ve boyama işlemi yapıldı.

Yıkama-boyama protokolü tamamlanan Array alındı ve tarayıcıya koyuldu. Tarama sonucunda analiz için gerekli olan data elde edildi ve analizleri Affymetrix Transcriptome Analysis Console programı kullanılarak yapıldı.

3.10. İstatistiksel Analiz

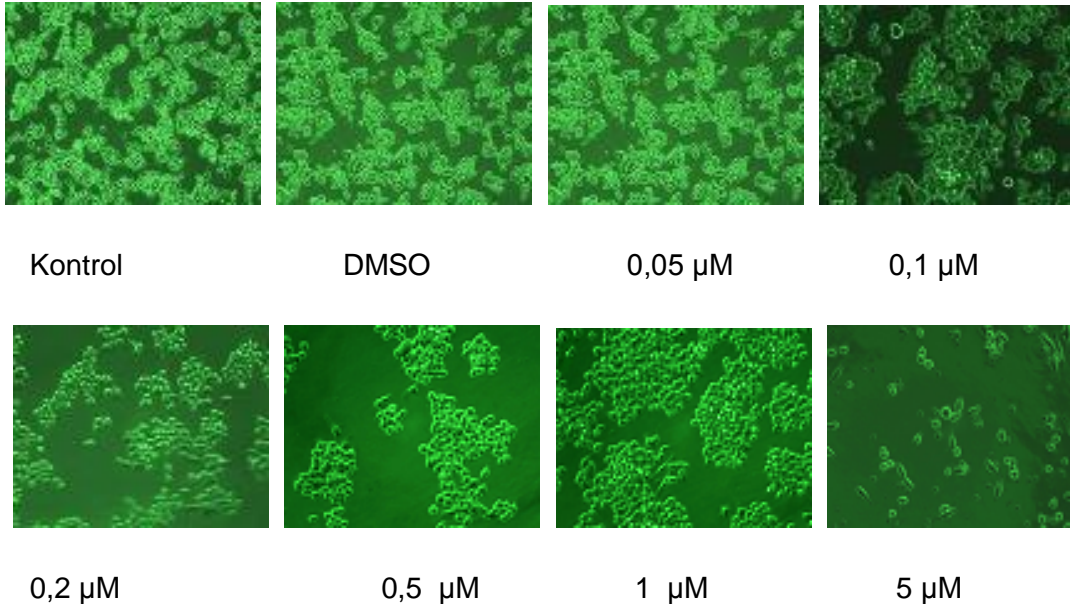
Elde edilen veriler SPSS versiyon 22.0 programı ile bağımsız 2 gruplu student T test istatistiksel yöntem kullanılarak analiz edilmiştir. P değeri 0,05'ten küçük olduğunda veriler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

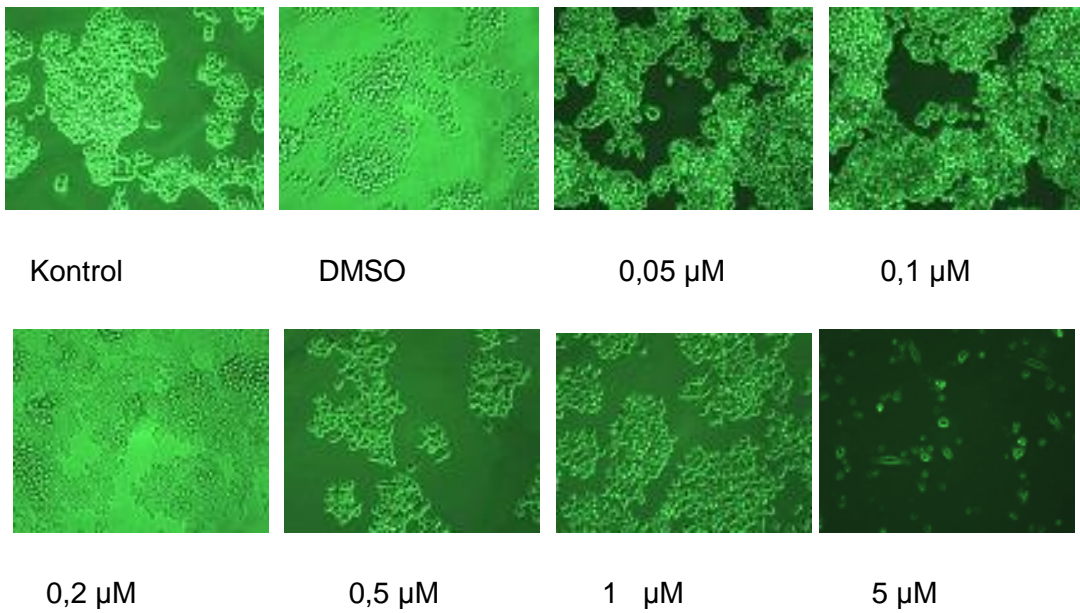
4.1. Hücre canlılığı

Hücrelerin belirlenen süreler (24, 48 ve 72 saat) boyunca Vorinostatla (0,05-5 μ M) muamelesinden sonra mikroskop altında incelenerek morfolojilerindeki değişimler gözlemlenmiştir. Konsantrasyona bağlı bu morfolojik değişimler şekil-3'de görülmektedir.

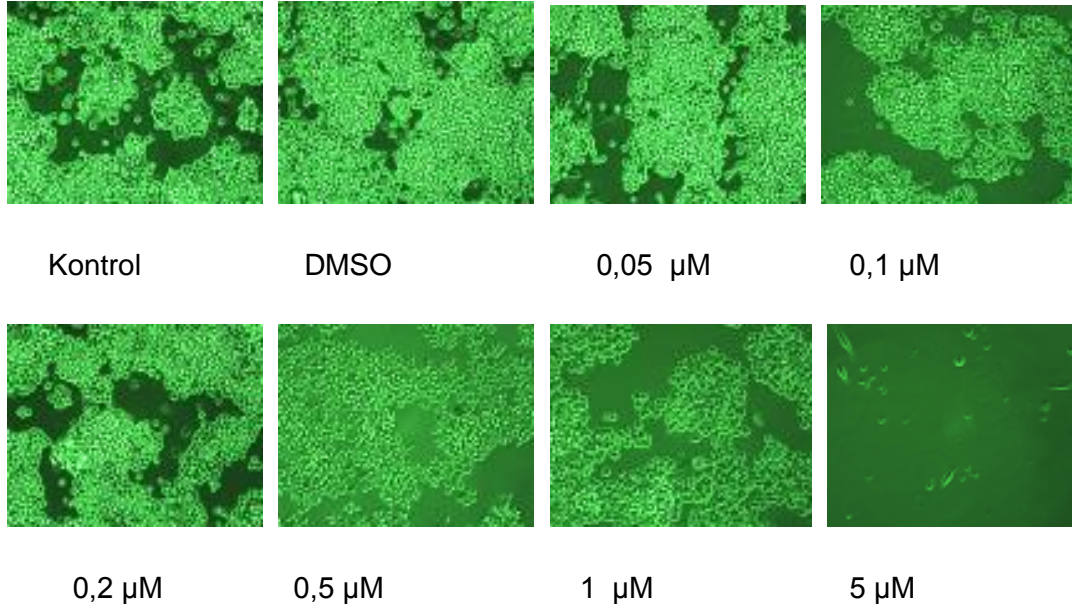
A) 24. saatte dozların hücreler üzerindeki etkileri



B) 48. saatte dozların hücreler üzerindeki etkileri.



C) 72. saatte dozların hücreler üzerindeki etkileri.



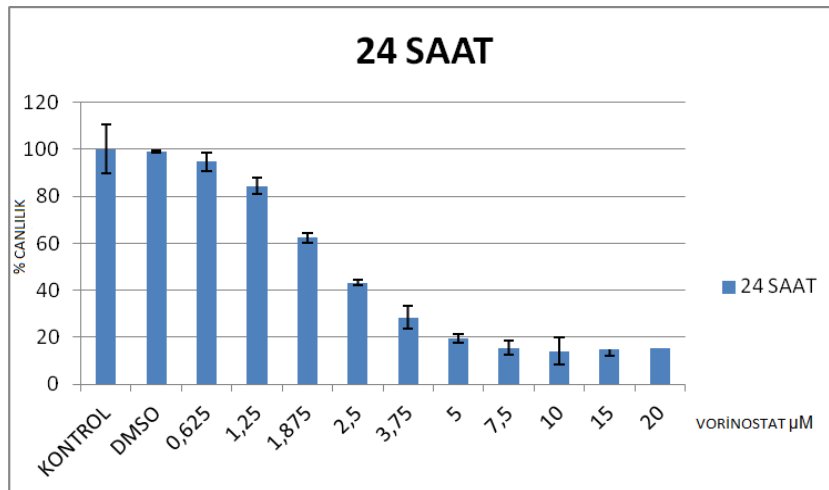
Şekil 3. Vorinostatın farklı doz ve sürelerde makrofaj hücrelerinin morfolojileri üzerine etkileri (A-24, B-48, C-72 saat) (20 x)

Yapılan incelemede tüm gruplarda 1 µM Vorinostat konsantrasyonunun üzerinde hücre morfolojilerinin bozulduğu 5 µM konsantrasyonunun üstünde ise, bu dozun sitotoksik etkisinden dolayı hücrelerin belirgin bir şekilde öldükleri görülmüştür.

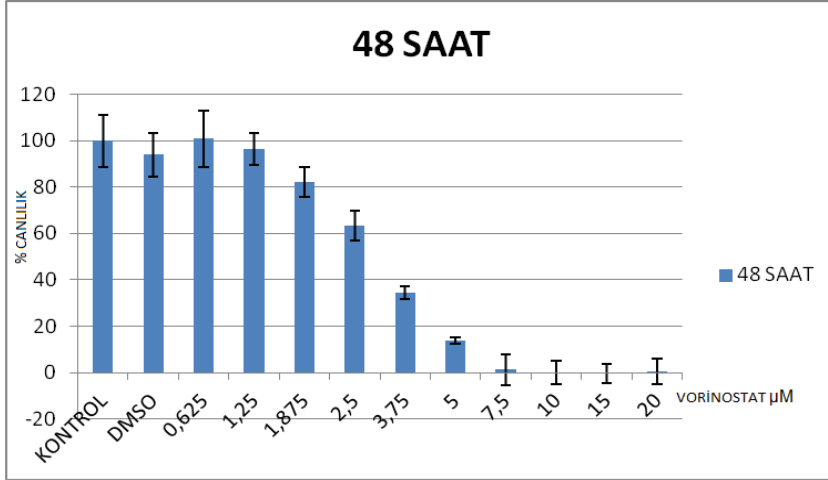
4.1.1. MTT hücre canlılık analizi

Vorinostat'ın 0,05-5 µM aralığındaki morfolojik değişimleri gözlemledikten sonra, daha geniş bir konsantrasyon aralığında MTT analizi gerçekleştirilmiştir. MTT analizi sonucu 570 nm dalga boyunda okunan değerlere göre oluşturulan (24, 48 ve 72. Saatlik kültürler) bulgular şekil 4'te verilmiştir.

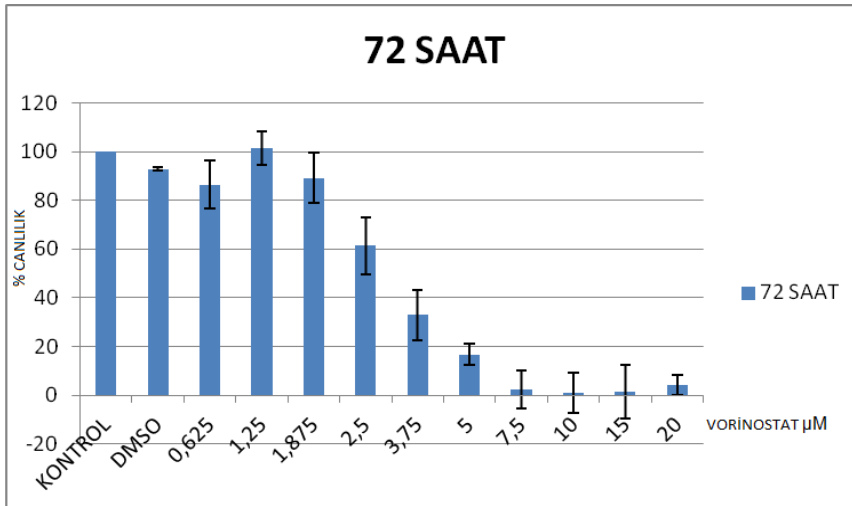
24. saate ait MTT analiz sonucu



48. saate ait MTT analiz sonucu



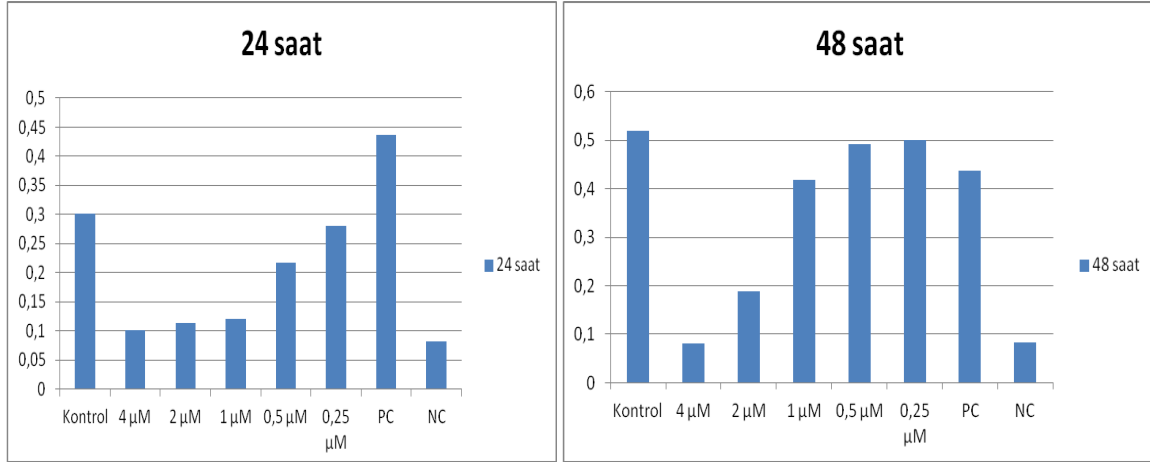
72. saate ait MTT sonucu

**Şekil 4. Süre ve farklı dozlara göre % canlılık analizi (MTT)**

Yapılan MTT analizi sonuçlarına göre Vorinostatın Raw 264.7 fare makrofaj hücre hattı üzerine farklı süre ve konsantrasyonlardaki etkisine bakıldığında grafiklerde de görüldüğü gibi 1 μM konsantrasyonun üzerinde hücre canlılığında belirgin bir azalmanın olduğu görülmekte olup bu bulgu, şekil'4 te görüldüğü gibi hücrelerin morfolojileri üzerine olan etkilerini de desteklemektedir. Burada 24 saatlik muamelede IC50 dozu yaklaşık olarak 2,32 μM olarak hesaplanmıştır.

4.2. Vorinostat'ın etkin dozunun belirlenmesi

Uzun süreli kültürde(72h) hücrelerin aynı besi ortamında devam etmesi hücreleri olumsuz etkilediğinden dolayı deneylere 24 ve 48 saat olarak devam edilmiştir. Kolorimetrik HDAC aktivasyon analizi sonucunda spektrofotometre cihazında okunan OD. değerlerine göre oluşturulan grafikler şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. HDAC aktivasyonuna ait OD değerleri.

Yapılan incelemede Vorinostat'ın 24 saatlik muamelesinde 1 µM konsantrasyonun HDAC aktivasyonunu negatif kontrol seviyesine indirdiği görülmüştür. 48 saatlik muamele sonucunda ise aktivasyonun yeterli olmadığı 1 µM konsantrasyonda HDAC aktivasyonunun olduğu görülmüştür. Çünkü 48 saat boyunca önceden kalan canlı hücreler çoğalmaya devam ederken, şekil 4 deki değişimlerde dikkate alındığında Vorinostatın bu dozu yeterli olmamıştır.

Bu nedenlerle hem MTT analizleri hem de HDAC aktivasyon analizi birlikte değerlendirildiğinde, araştırmanın diğer basamaklarında 1 µM Vorinostat konsantrasyonunun 24 saat süreyle kullanılmasına karar verilmiştir.

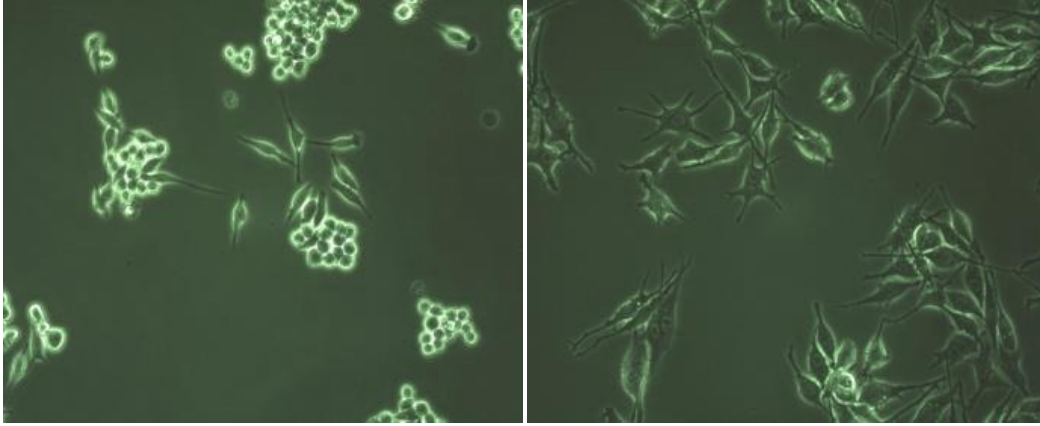
4.3. Makrofaj polarizasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü

Makrofaj polarizasyonunun kontrolü 1- morfolojik olarak, 2-Sitokin seviyeleri, 3- hücre yüzey belirteçleri, 4-Gen ekspresyon seviyeleri olmak üzere dört basamakta gerçekleştirilmiştir.

4.3.1 Morfolojik İnceleme

Makrofaj hücreleri dönüştürülmek istendikleri fenotiplere ait koşullarda inkübe edildikten sonra morfolojik değişimleri mikroskop altında değerlendirilmiştir.

M1 polarize hücrelerin uyarı verilmemiş makrofaj hücrelerine oranla hücre yüzey alanlarının arttığı ayrıca çevrelerine iğsi uzantılar oluşturdukları görüldü (Şekil6) .

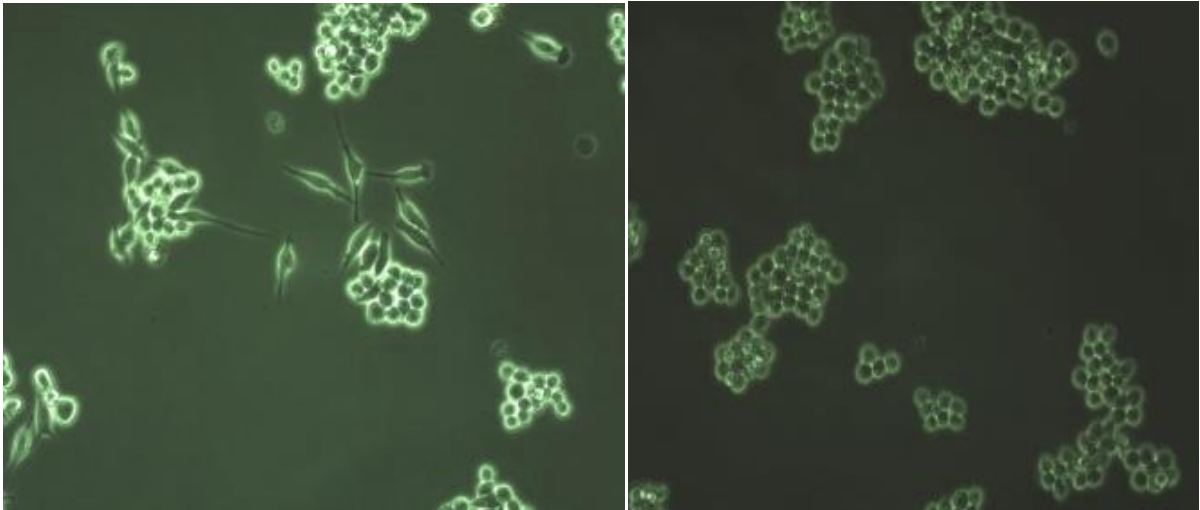


Uyarı verilmemiş hücreler

M1 hücreleri

Şekil 6. M1 makrofaj hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (20x)

M2 hücrelerinin morfolojik olarak uyarı almamış makrofaj hücreleri ile benzer morfolojide oldukları görülmüştür (şekil 7).



Uyarı verilmemiş hücreler

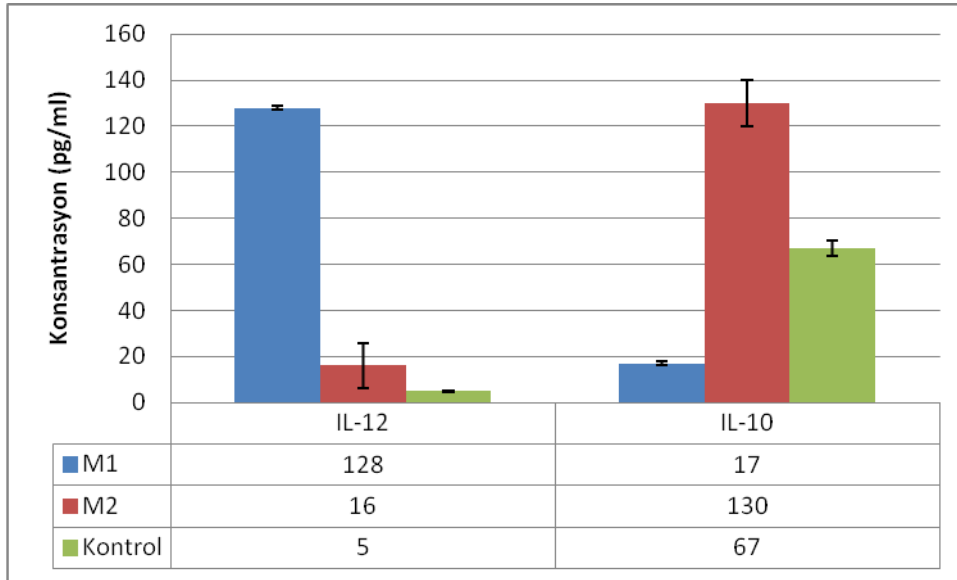
M2 hücreleri

Şekil 7. M2 makrofaj hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (20x)

Şekil 6 ve 7'de görüldüğü gibi hücrelerin morfolojik olarak incelenmesinde uyarılara cevap oluşturdukları tespit edilmiştir.

4.3.2. Sitokin Seviyelerinin Tespiti (ELISA analizleri)

Makrofaj polarizasyonunun kontrolünde iki önemli belirteç olan IL-10 ve IL-12 sitokin seviyeleri ELISA (Bosteri Amerika) kiti ile analiz edilmiştir. Yapılan literatür taramalarına göre, M1 fenotipine sahip makrofajların **yüksek IL-12, düşük IL-10 sitokin salınımı**, M2 fenotipine sahip makrofajların ise **yüksek IL-10 ve düşük IL-12 sitokin salınımına** sahip olmaları beklenmektedir. Sitokin salınımlarıyla ilgili yapılan deneylerin sonucu şekil 8’ de görüldüğü gibi olup, yapılan ELISA analizleri sonucunda hücrelerin beklenen sitokin seviyelerine sahip oldukları **şekil 8’de** görüldüğü gibi M1 hücrelerinde IL-12 seviyesinin yüksek, IL-10 seviyesinin düşük ve M2 hücrelerinde ise IL-12’nin düşük IL-10’nun yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç polarizasyonun gerçekleştiğini sitokin salınımına göre de teyit etmektedir.



Şekil 8. Polarize makrofajların sitokin salınımları

4.3.3. Hücre Yüzey Belirteçlerinin İncelenmesi (Akım Sitometrisi Analizi)

Literatür bilgisi gereği M1 makrofajlarında CD86 hücre yüzey belirtecini daha fazla, M2 makrofajlarında ise CD206 hücre yüzey belirtecini daha fazla ifade edilmesi beklenmiştir. Uyarı almayan makrofaj hücrelerinde ise her iki belirtecin düşük seviyede ifade edilmesi beklenmektedir. Tablo 7’ de görüldüğü gibi, beklenene uygun oranda M1 makrofajlarında CD86 %85, M2 makrofajlarında CD206 %80 oranında ifade ettikleri tespit edilmiş olup, hücre yüzey belirteçleri açısından da polarizasyonun gerçekleştiği teyit edilmiştir.

Tablo 7. Makrofaj hücrelerinin sahip oldukları hücre yüzey belirteçleri oranları.

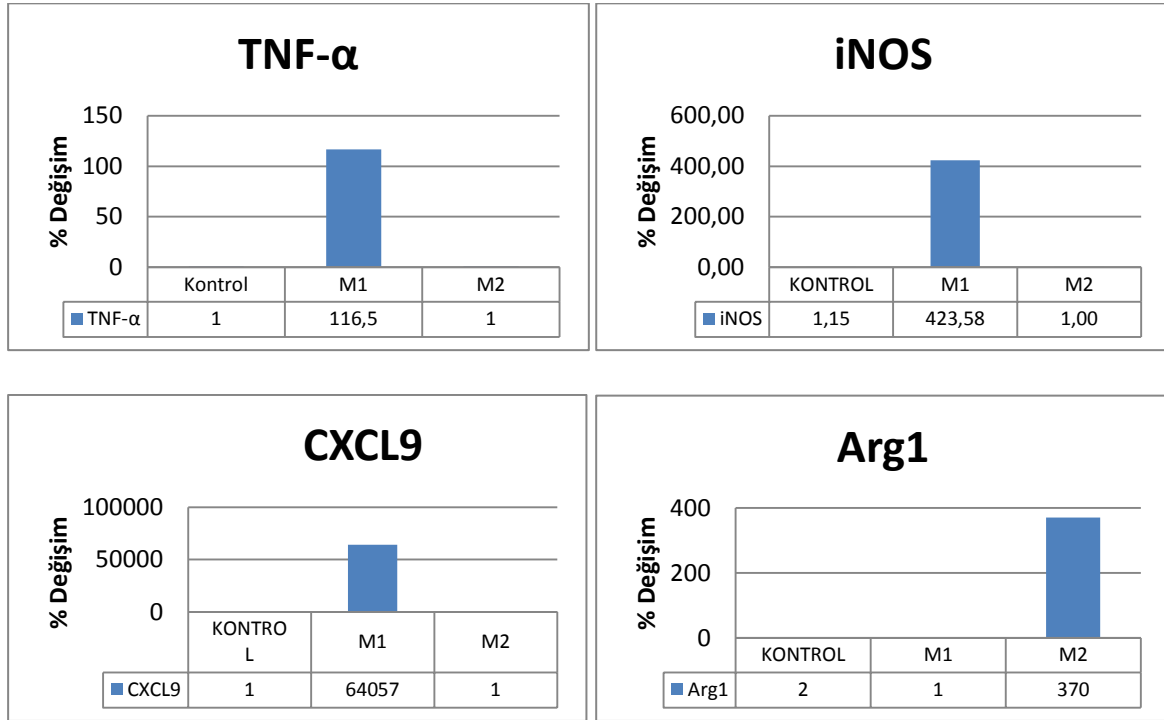
	CD86	CD206
Kontrol hücreleri	%35	%7
M1 hücreleri	%85	%15
M2 hücreleri	%12	%80

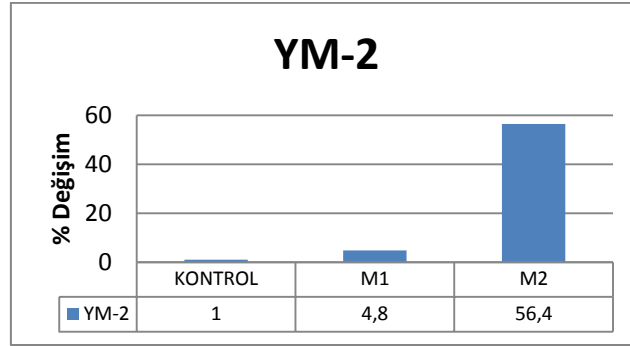
4.3.4. Gen ekspresyonlarının qRT-PCR analizi

Polarizasyonu gerçekleştirilen hücrelere ait özgün gen ekspresyonlarının belirlenebilmesi amacıyla RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir.

M1 makrofajları için incelenen özgün genler TNF- α , iNOS ve CXCL9

M2 makrofajları için incelenen özgün genler Arg-2, Ym2 genleridir.





Şekil 9. Polarize makrofajların gen ekspresyon düzeyleri.

Şekil 9'da görüldüğü gibi iNOS, TNF-a ve CXCL9 sadece M1 hücrelerinde yüksek oranda ifade olurken, Arg1, Ym2 nin ise sadece M2 hücrelerinde yüksek oranda ifade oldukları tespit edilerek polarizasyonun gen ekspresyonu düzeyinde de tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; Yapılan morfolojik inceleme, ELISA akım sitometrisi ile sitokin salınımı ve RT-PCR analizleri ile ilgili genlerin ekspresyon düzeyleri dikkate alındığında hücrelerin istenilen fenotiplere dönüştürüldükleri teyit edilmiştir.

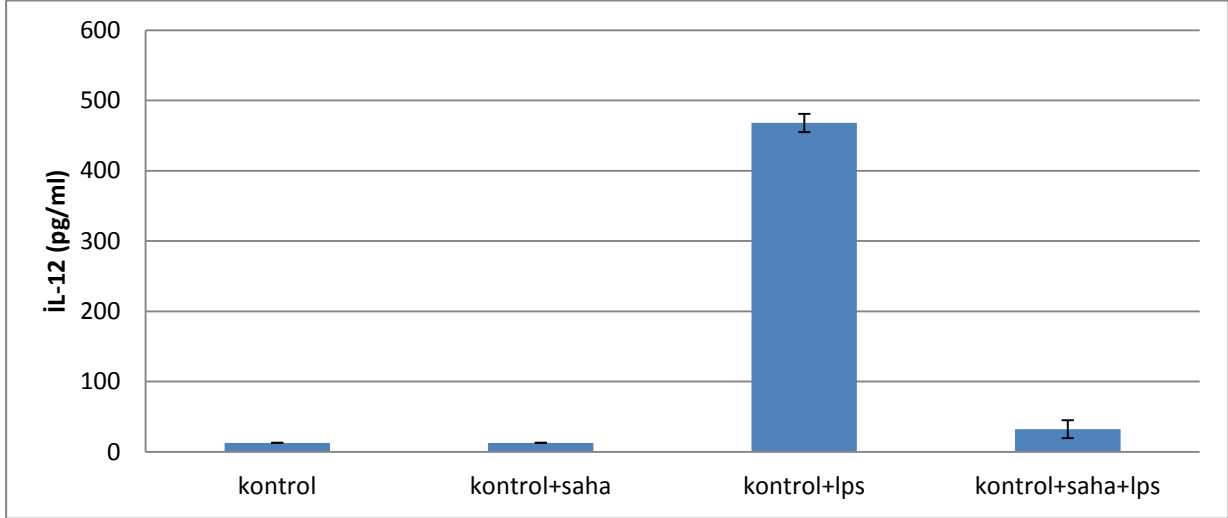
SAHA'nın makrofaj hücreleri üzerine etkileri, sitokin salınımı, hücre yüzey belirteçleri, gen ekspresyonu ve miRNA ekspresyonlarına etkileri tablo 1'de gösterildiği üzere kontrol, M1 ve M2 makrofajları ve alt grupları kullanılarak araştırılmıştır.

4.4. Kontrol hücreleri üzerine SAHA'nın etkileri

4.4.1 SAHA'nın Kontrol Hücre Gruplarında Sitokin salınımları üzerine etkileri;

Kontrol grubu hücreleri üzerine SAHA'nın sitokin (IL-12, IL-10, IL-1 β , TNF- α ve IL-6) salınımlarına olan etkileri incelendiğinde, sırasıyla şekil 10-14'de gösterilmiştir.

4.4.1.1. Kontrol hücrelerinde IL-12 sitokin salınımı üzerine etkileri

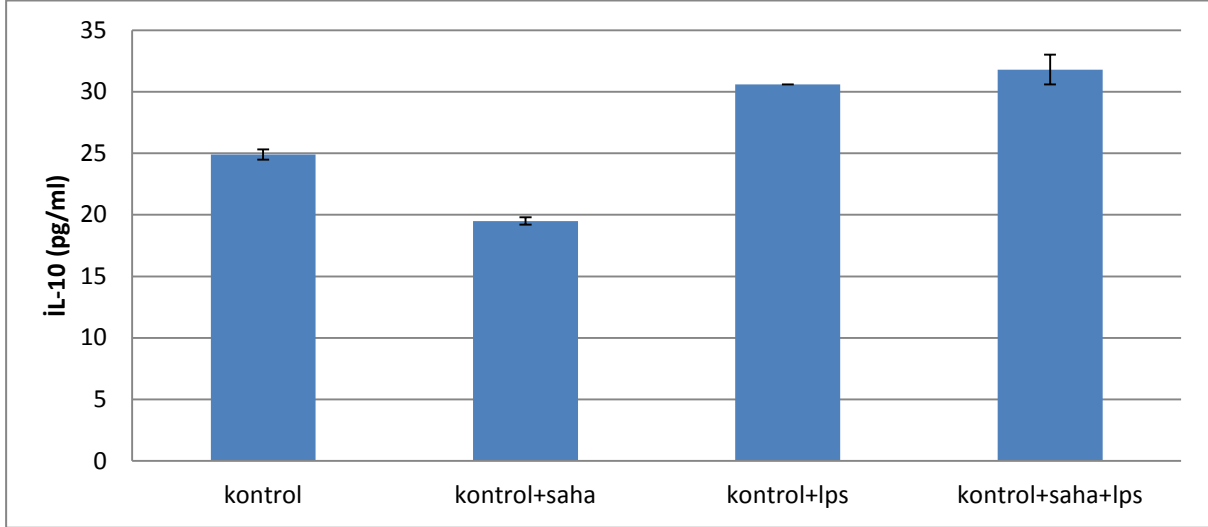


Şekil 10. SAHA'ın kontrol grubu hücrelerinde IL-12 sitokin salınımına olan etkileri

ELISA yöntemi ile herhangi bir uyarı almamış olan kontrol grubu hücrelerinde IL-12 salınımı incelendiğinde, kontrol grubu hücrelerinin IL-12 salınımını çok düşük seviyede gerçekleştirdiği görülmüştür. Hücreler Vorinostat ile muamele edildiğinde sitokin salınımında kontrol grubu ile önemli bir farklılık göstermemiştir.

Hücreler 100 ng/ml LPS ile muamele edildiğinde IL-12 sitokin salınımı anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuş ve üç tekrarlı deney grubu ortalamasında 468 pg/ml olarak ölçülmüştür. LPS ve SAHA'nın aynı anda verildiğinde ise hücrelerin IL-12 sitokin salınımları anlamlı bir şekilde azalmış ve üç tekrarlı deney grubu ortalamasında 32,4 pg/ml olarak ölçülmüştür (Şekil 10). Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$).

4.4.1.2 Kontrol hücrelerinde IL-10 sitokin salınımı üzerine etkileri

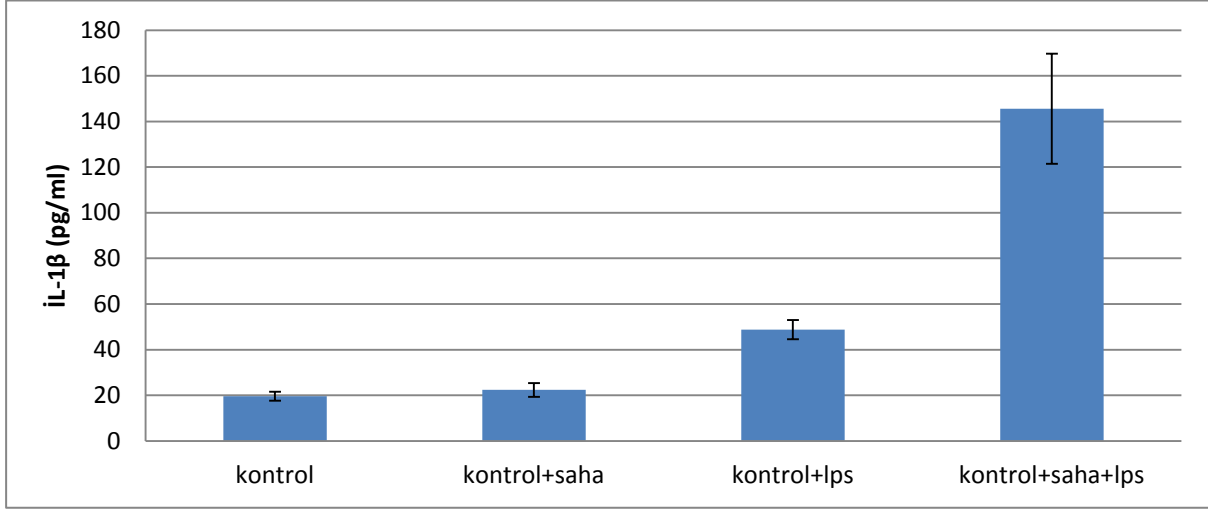


Şekil 11. SAHA'nın kontrol grubu hücrelerinde IL-10 salınımı üzerine etkileri

Şekil 11'de gösterildiği gibi kontrol grubu hücrelerinin IL-10 sitokin salınımları incelendiğinde üç tekrarlı deney grubunda yapılan ölçümde ortalama 24,9 pg/ml IL-10 sitokin salınımı gerçekleştiği bulunmuştur. Kontrol hücreleri tek başına Vorinostat ile muamele edildiğinde IL-10 sitokin salınımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğin olmadığı görülmüştür($p=0,4$).

Kontrol hücreleri tek başına LPS ile muamele edildiğinde ve SAHA varlığında LPS ile muamele edildiğinde IL-10 sitokin salınımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir($p=0,2$).

4.4.1.3 Kontrol hücrelerinde IL-1 β sitokin salınımı üzerine etkileri

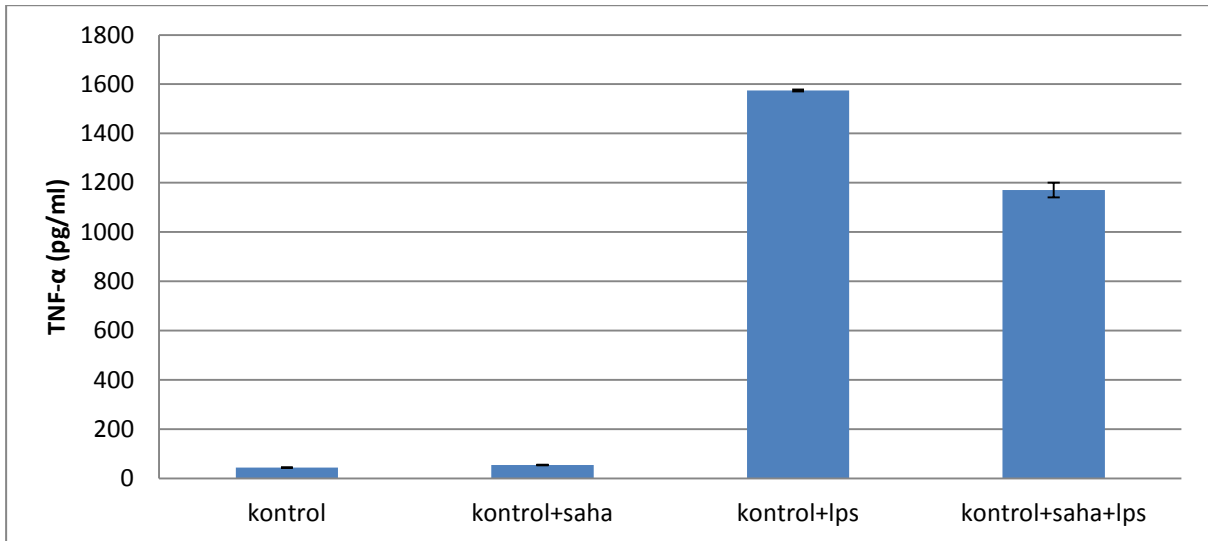


Şekil 12. SAHA'nın kontrol grubu hücrelerinde IL-1 β salınımı üzerine etkileri

Kontrol hücreleri üzerine SAHA'nın IL-1 β salınımı üzerine etkileri incelendiğinde; SAHA tek başına makrofaj hücrelerine uygulandığında IL-1 β sitokin salınımında kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Ancak şekil 12'de görüldüğü gibi LPS tek başına hücrelere uygulandığında sitokin salınımına önemli bir farklılık yaratmazken, makrofaj hücrelerine SAHA, LPS ile birlikte verildiğinde IL-1 β sitokin salınımının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür ($p=0,01$).

4.4.1.4. Kontrol hücrelerinde TNF- α sitokin salınımı üzerine etkileri

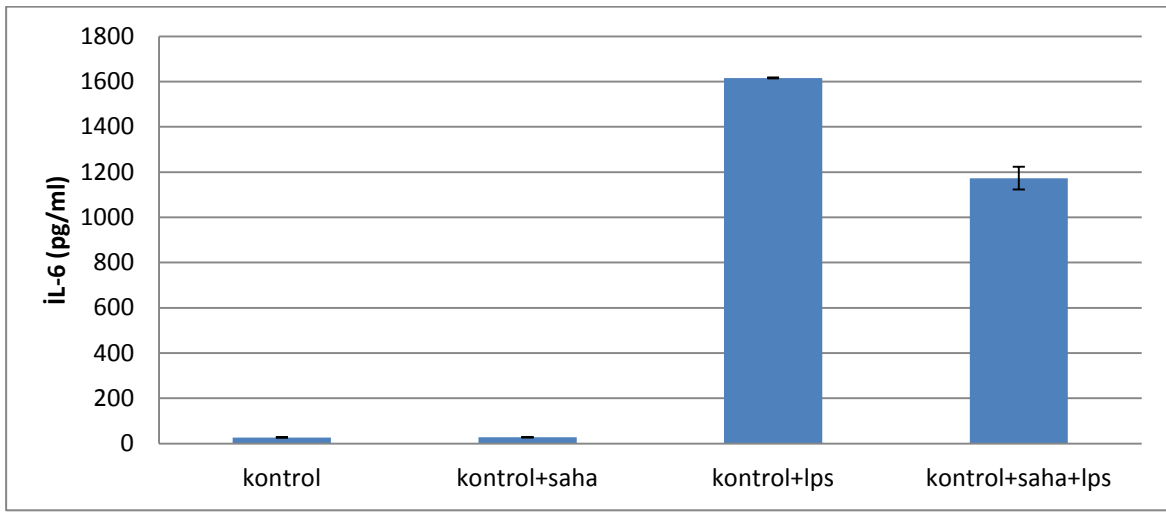


Şekil 13. SAHA'nın kontrol grubu hücrelerinde TNF- α salınımı üzerine etkileri

Kontrol grubu hücrelerde TNF- α sitokin salınımı incelendiğinde Şekil 13’de gösterildiği gibi kontrol ve SAHA muamelesi yapılan kontrol hücrelerinde TNF- α salınımı olmadığı görülmüştür.

Kontrol hücreleri tek başına LPS ile muamele edildiğinde TNF- α sitokin salınımı önemli ölçüde arttığı görülmüşken, kontrol hücreleri SAHA varlığında LPS ile muamele edildiğinde ise TNF- α sitokin miktarının %24 oranında düştüğü görülmüş ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı hesaplanmıştır ($p=0,08$).

4.4.1.5. Kontrol hücrelerinde IL-6 sitokin salınımı üzerine etkileri



Şekil 14. SAHA'nın kontrol grubu hücrelerinde IL-6 sitokin salınımı üzerine etkileri

IL-6 sitokin salınımı incelendiğinde, herhangi bir uyarı almamış olan kontrol grubu hücrelerinin bir pro enflamatuvar sitokin olan IL-6 salınımını çok düşük seviyede gerçekleştirdiği görülmektedir. Ayrıca bu hücelere tek başına SAHA uygulandığında IL-6 salınımında kontrol hücreleri ile herhangi bir fark olmadığı görülmüştür.

Kontrol grubu hücreleri LPS ile muamele edildiğinde hücrelerin önemli bir miktarda IL-6 sitokin salınımı gerçekleştirdikleri görülmüştür. Hücreler SAHA varlığında LPS ile muamele edildiklerinde ise IL-6 cevaplarında %28 oranında (üç tekrarlı) bir azalma meydana gelmiş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,04$) (Şekil 14).

4.4.2 SAHA'nın kontrol hücrelerinde CD 86 ve CD 206 hücre yüzey belirteçlerine olan etkileri

SAHA'nın kontrol grubu makrofaj hücrelerinin hücre yüzey belirteçlerine olan etkileri flow sitometri yöntemi ile incelendiğinde;

Tablo 8. SAHA'nın kontrol hücrelerinde CD 86 ve CD 206 hücre yüzey belirteçlerine olan etkilerinin akım sitometrisi analiz sonuçları

	<p>[Ungated] CD206 FITC / CD86 PE</p> <p>B-+ : 22.80% B++ : 3.92% B-- : 71.40% B+- : 1.88%</p>	<p>[Ungated] CD206 FITC / CD86 PE</p> <p>B-+ : 96.76% B++ : 0.67% B-- : 2.57% B+- : 0.00%</p>
CD86 %	26	96
CD206 %	5	1
Deney Grubu	Kontrol	Kontrol + SAHA

	<p>[Ungated] CD206 FITC / CD86 PE</p> <p>B-+ : 96.76% B++ : 0.67% B-- : 2.57% B+- : 0.00%</p>	<p>[Ungated] CD206 FITC / CD86 PE</p> <p>B-+ : 82.28% B++ : 0.18% B-- : 17.53% B+- : 0.01%</p>
CD86 %	96	82
CD206 %	1	1
Deney Grubu	Kontrol +LPS	Kontrol+LPS+SAHA

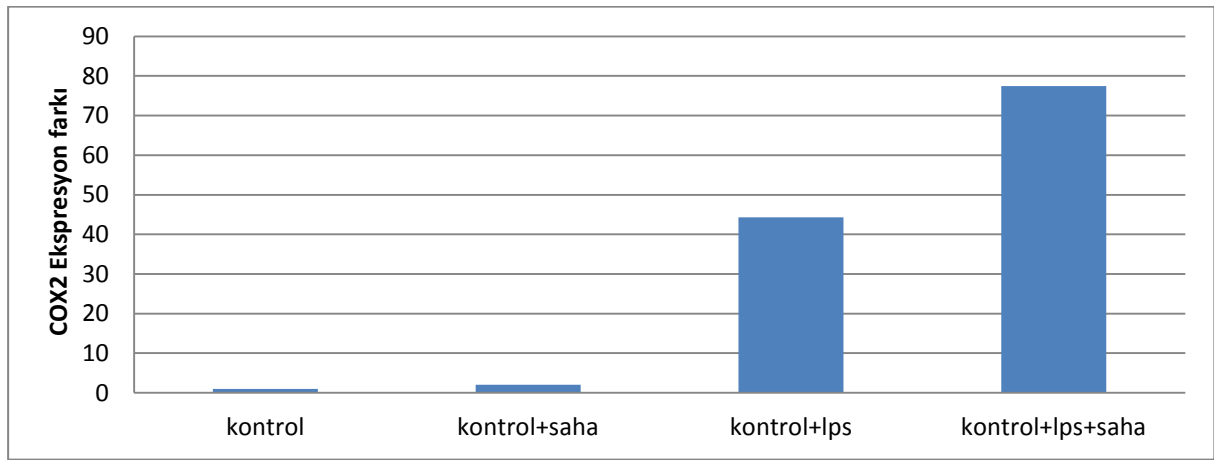
Yapmış olduğumuz 3 tekrarlı hücre yüzey belirteci deneylerinde kontrol grubu hücrelerinin düşük seviyede CD86 ifadesine sahip olduğu görülmüştür. LPS ile uyarılan hücrelerin ise CD 86 hücre yüzey belirtecini yüksek seviyede ifade ettikleri, benzer şekilde

tek başına SAHA ve LPS+SAHA deney gruplarında da CD 86 ifadesinin yüksek seviyede ifade ettikleri görülmüştür. CD 206 seviyesi açısından tüm deney grupları değerlendirildiğinde ise gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı ve düşük seviyede ekspresyonun olduğu görülmüştür(Tablo 8).

4.4.3. SAHA'nın kontrol hücrelerinde gen ekspresyonları üzerine etkileri

SAHA'nın kontrol grubu hücrelerinde COX2, CXCL9, TNF- α , NOS2, Arg1 genlerinin mRNA ekspresyonlarına olan etkileri incelendiğinde;

4.4.3.1. COX2 mRNA ekspresyon değişimi



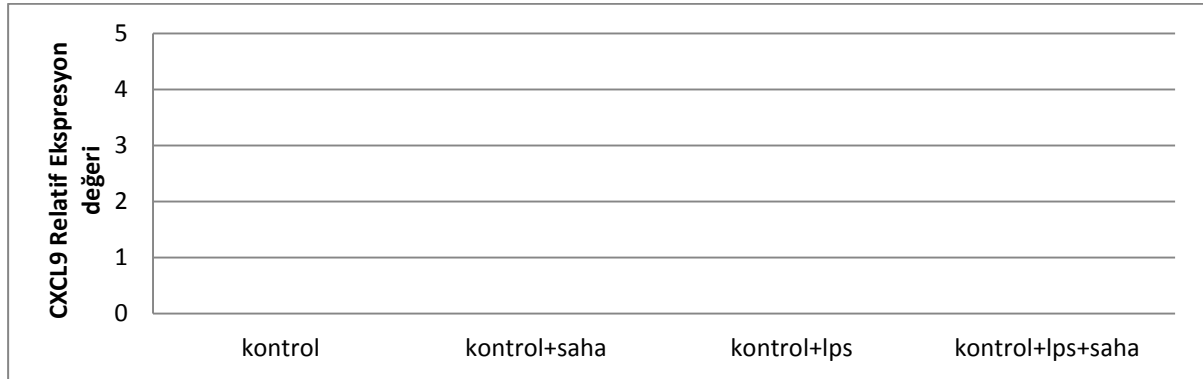
Şekil 15. SAHA'nın kontrol hücrelerinde COX2 mRNA ekspresyonuna etkileri

Şekil 15'te görüldüğü gibi, Kontrol hücrelerinde COX2 ekspresyon seviyeleri incelendiğinde uyarı almamış kontrol hücreleri ve tek başına SAHA muamelesi yapılan hücrelerde LPS muamelesi yapılan deney gruplarına göre çok düşük seviyede COX2 ekspresyonunun olduğu görülmüştür.

Kontrol hücrelerine tek başına SAHA muamelesinin yapılması COX2 ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmüştür($p=0,15$)

Tek başına kontrol hücrelerine LPS uygulandığında COX2 ekspresyonunun arttığı görülmüş, SAHA varlığında LPS uygulanan makrofaj hücrelerinde ise bu artışın daha da fazla olduğu görülmüş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır($p=0,09$).

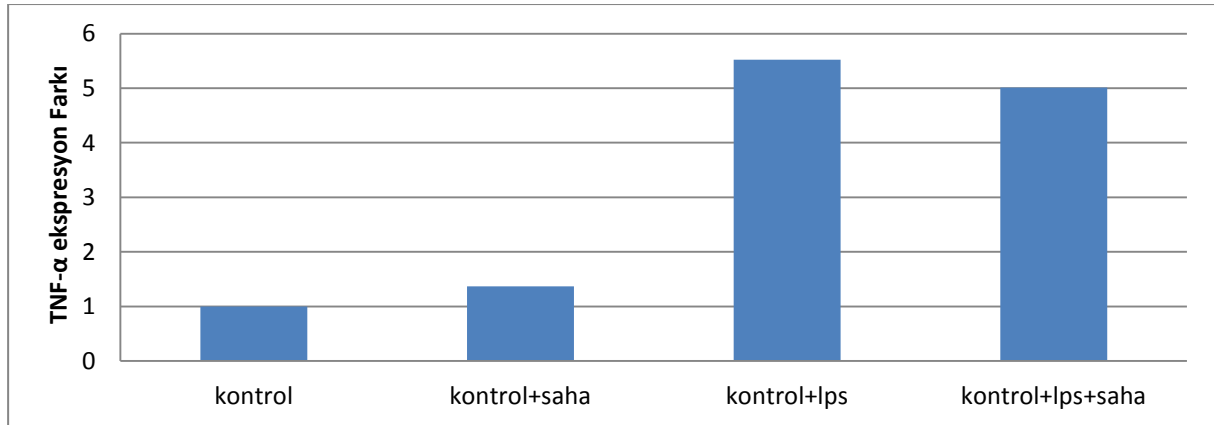
4.4.3.2 CXCL9 mRNA ekspresyon değişimi



şekil 16. SAHA'nın kontrol hücrelerinde CXCL9 mRNA ekspresyonuna etkileri

şekil 16'da görüldüğü gibi, CXCL9 mRNA ifade düzeyine bakıldığında tüm kontrol grubu hücrelerinde CXCL9 ekspresyonunun olmadığı görülmüştür ve bunu görselleştirmek için şekil relatif ekspresyon olarak verilmiştir.

4.4.3.3 TNF- α mRNA ekspresyon değişimi

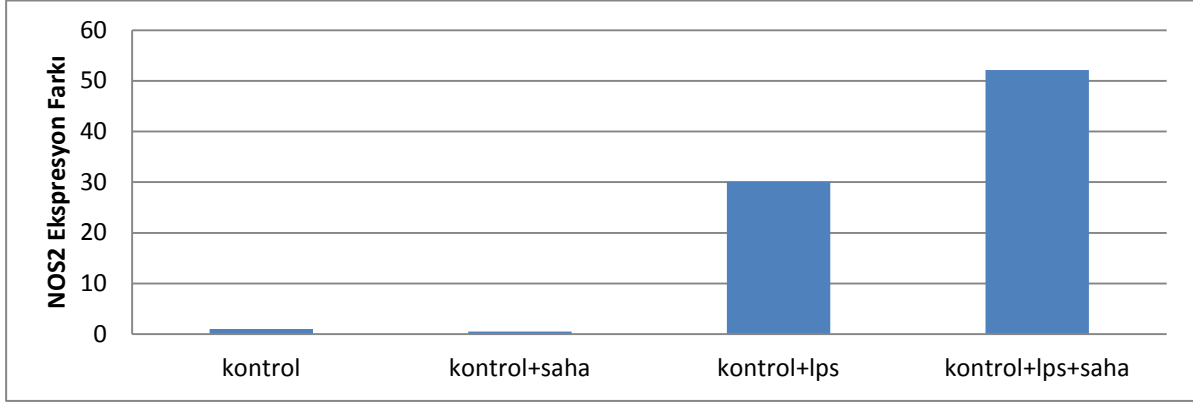


şekil 17. SAHA'nın kontrol hücrelerinde TNF- α mRNA ekspresyonuna etkileri

şekil 17'de görüldüğü gibi, Kontrol grubu hücreleri üzerine SAHA'nın TNF- α mRNA ekspresyonu üzerine etkisi incelendiğinde tek başına SAHA muamelesinin TNF- α ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür.

Tek başına LPS muamelesi kontrol hücrelerinde TNF- α ekspresyon istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde($p=0,04$) arttırdığı görülmüştür, SAHA valığında LPS muamelesi yapıldığında TNF- α ekspresyonunda düşüş olduğu görülmüş ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır($p=0,46$).

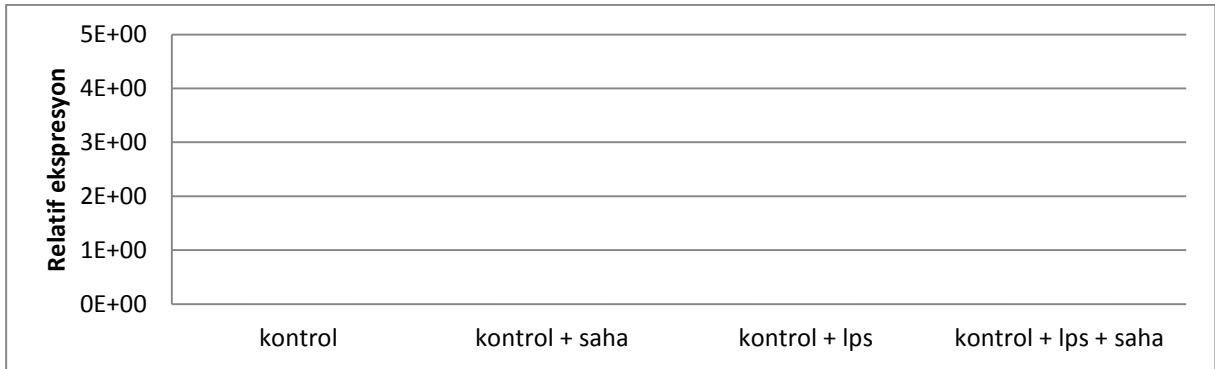
4.4.3.4. NOS2 mRNA ekspresyon değişimi



Şekil 18. SAHA'nın kontrol hücrelerinde NOS2 mRNA ekspresyonuna etkileri

Şekil 18'de görüldüğü gibi, Kontrol grubu hücreleri üzerine SAHA'nın NOS2 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi incelendiğinde tek başına SAHA muamelesinin NOS2 ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Tek başına LPS muamelesi NOS2 ekspresyonunu literatür ile uyumlu şekilde istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde arttırmıştır. Ancak ilginç bir biçimde SAHA varlığında LPS muamelesi sonucunda NOS2 ekspresyonu yaklaşık iki kat arttığı görülmüş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,15$).

4.4.3.5 Arg1 mRNA ekspresyon değişimi



Şekil 19. SAHA'nın kontrol hücrelerinde Arg1 mRNA ekspresyonuna etkileri

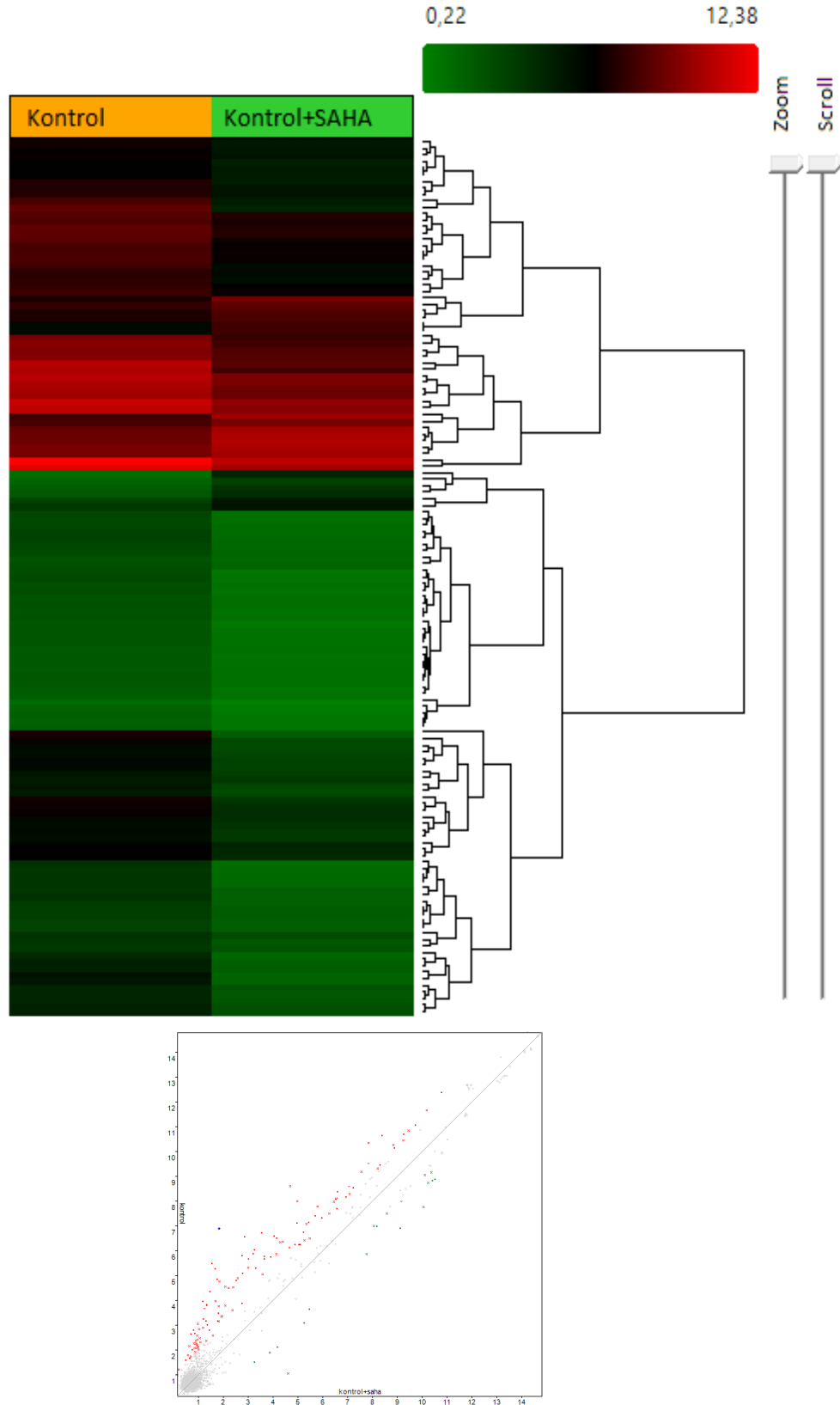
Şekil 19'da görüldüğü gibi, kontrol hücrelerinde Arg1 mRNA ekspresyonu incelendiğinde kontrol deney grubuna ait serilerin hiç birinde Arg1 ekspresyonunun gerçekleşmediği görülmüş ve verilerin görselleştirilmesi için sonuçlar relatif ekspresyon olarak verilmiştir.

4.4.4 miRNA ekspresyon değişimleri

Araştırmamızın önemli bir bulgusu olan miRNA ekspresyon değişimlerini incelediğimizde,

4.4.4 1 Kontrol - Kontrol+SAHA hücre grupları arasındaki miRNA ekspresyon farklılıkları.

Herhangi bir uyarı verilmemiş Kontrol deney grubu ile 24 saat 1 µM SAHA muamelesi yapılmış makrofaj hücreleri arasında miRNA ekspresyon farklılıkları Affymetrix transcriptome analysis Console programı ile değerlendirilmiş olup analize ait scatter plot ve Hierarchical Clustering analizleri Şekil 20' de gösterilmiştir.



Şekil 20. Kontrol ve Kontrol+SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonlarına ait Scatter plot ve Hierarchical Clustering analizleri (kırmızı renk tonları yüksek ekspresyonu, yeşil renk tonları ise düşük ekspresyonu ifade etmektedir).

Yaptığımız analiz sonucunda, kontrol ve kontrol+SAHA gruplarının karşılaştırıldığında, 132 adet miRNA ekspresyonunun 2 kat ve üzeri oranda değiştiği (artış/azalış) görülmüştür. SAHA muamelesi uyarı verilmemiş kontrol hücrelerine oranla ekspresyonu değişen 132 miRNA'dan 116 miRNA'nın ekspresyonunu düşürmüş (Tablo 9), 15 miRNA'nın ekspresyonunu ise arttırmıştır (Tablo 10). Ekspresyonu düşen miRNA'lardan en yüksek değişim 33,72 katlık düşüşle mmu-miR-20b-5p de olurken ekspresyonu artan miRNA'lardan en yüksek değişim 11,7 katlık artışla mmu-miR7666-3p olduğu görülmüştür.

Tablo 9. Kontrol – Kontrol+SAHA deney grupları arasında downregüle miRNA'lar ve değişim oranları

No	miRNA ismi	FARK	No	miRNA ismi	FARK
1	mmu-miR-20b-5p	33,72	30	mmu-miR-425-5p	4,47
2	mmu-miR-100-5p	15,36	31	mmu-miR-1198-5p	4,41
3	mmu-miR-106a-5p	15,06	32	mmu-miR-25-3p	4,4
4	mmu-miR-3535	13,16	33	mmu-miR-503-5p	4,21
5	mmu-let-7g-5p	12,15	34	mmu-miR-139-5p	4,17
6	mmu-miR-652-3p	9,15	35	mmu-miR-671-5p	4,17
7	mmu-miR-5107-5p	8,65	36	mmu-miR-30a-5p	4,03
8	mmu-miR-378d	8,3	37	mmu-miR-21a-5p	4,01
9	mmu-miR-106b-5p	8,09	38	mmu-mir-677	3,98
10	mmu-let-7f-5p	7,52	39	mmu-miR-18a-5p	3,97
11	mmu-miR-30b-5p	7,4	40	mmu-miR-5099	3,91
12	mmu-miR-7686-5p	6,94	41	mmu-miR-10a-5p	3,86
13	mmu-miR-351-5p	6,92	42	mmu-miR-3072-5p	3,86
14	mmu-miR-7082-5p	6,47	43	mmu-miR-301a-3p	3,62
15	mmu-miR-181b-5p	6,3	44	mmu-miR-378b	3,59
16	mmu-miR-17-3p	5,88	45	mmu-miR-93-3p	3,5
17	mmu-miR-20a-5p	5,62	46	mmu-miR-1895	3,49
18	mmu-miR-6923-5p	5,61	47	mmu-miR-19b-3p	3,45
19	mmu-miR-1946b	5,59	48	mmu-miR-677-3p	3,36
20	mmu-miR-5121	5,55	49	mmu-miR-151-3p	3,32
21	mmu-miR-712-5p	5,38	50	mmu-miR-421-3p	3,29
22	mmu-miR-342-3p	5,18	51	mmu-miR-1931	3,28
23	mmu-miR-361-5p	4,98	52	mmu-miR-27b-3p	3,27
24	mmu-miR-106b-3p	4,96	53	mmu-miR-146a-5p	3,26
25	mmu-miR-532-5p	4,96	54	mmu-miR-494-3p	3,22
26	mmu-miR-423-3p	4,91	55	mmu-miR-99a-5p	3,15
27	mmu-miR-1946a	4,91	56	mmu-miR-1839-5p	3,13
28	mmu-miR-30d-5p	4,86	57	mmu-miR-6984-5p	3,13
29	mmu-miR-17-5p	4,78	58	mmu-miR-93-5p	3,1

No	miRNA ismi	FARK
59	mmu-miR-709	3,03
60	mmu-miR-15b-5p	2,92
61	mmu-miR-674-5p	2,92
62	mmu-miR-99b-5p	2,91
63	mmu-miR-1949	2,89
64	mmu-miR-27a-3p	2,88
65	mmu-miR-484	2,87
66	mmu-let-7c-5p	2,8
67	mmu-miR-30c-5p	2,79
68	mmu-miR-7044-5p	2,77
69	mmu-miR-140-5p	2,76
70	mmu-miR-301b-3p	2,75
71	mmu-miR-5110	2,75
72	mmu-miR-23a-3p	2,72
73	mmu-let-7b-5p	2,7
74	mmu-miR-500-3p	2,7
75	mmu-miR-183-5p	2,69
76	mmu-miR-362-5p	2,66
77	mmu-miR-24-3p	2,61
78	mmu-miR-23a-5p	2,61
79	mmu-miR-423-5p	2,61
80	mmu-miR-151-5p	2,6
81	mmu-miR-185-5p	2,57
82	mmu-miR-200c-3p	2,57
83	mmu-miR-339-5p	2,55
84	mmu-miR-16-5p	2,54
85	mmu-let-7i-5p	2,48
86	mmu-miR-194-5p	2,47
87	mmu-miR-191-5p	2,41

No	miRNA ismi	FARK
88	mmu-miR-7056-5p	2,4
89	mmu-miR-140-3p	2,38
90	mmu-miR-1981-5p	2,36
91	mmu-miR-378a-5p	2,35
92	mmu-miR-425-3p	2,35
93	mmu-miR-324-5p	2,34
94	mmu-miR-7011-5p	2,34
95	mmu-miR-15a-5p	2,33
96	mmu-miR-378a-3p	2,33
97	mmu-let-7e-5p	2,32
98	mmu-let-7d-5p	2,3
99	mmu-miR-6937-5p	2,26
100	mmu-miR-7007-5p	2,26
101	mmu-miR-7047-5p	2,26
102	mmu-miR-23b-3p	2,22
103	mmu-miR-345-5p	2,2
104	mmu-miR-29a-3p	2,19
105	mmu-miR-674-3p	2,18
106	mmu-miR-6970-5p	2,17
107	mmu-miR-3084-3p	2,16
108	mmu-miR-221-3p	2,15
109	mmu-miR-132-3p	2,1
110	mmu-miR-183-3p	2,09
111	mmu-mir-6516	2,08
112	mmu-mir-3069	2,04
113	mmu-miR-99b-3p	2,02
114	mmu-miR-1934-3p	2,02
115	mmu-miR-378c	2,02
116	mmu-miR-505-5p	2,01

Tablo 10. Kontrol – Kontrol+SAHA deney grupları arasında upregüle olan miRNA'lar ve değişim oranları

No	miRNA ismi	FARK
1	mmu-miR-7666-3p	-11,7
2	mmu-miR-6968-5p	-4,83
3	mmu-miR-5130	-4,67
4	mmu-miR-7116-5p	-4,46
5	mmu-miR-7025-5p	-4,17
6	mmu-miR-7085-5p	-3,93
7	mmu-mir-465c-2	-3,73
8	mmu-mir-465c-1	-3,73

No	miRNA ismi	FARK
9	mmu-miR-6944-5p	-3,53
10	mmu-miR-7671-3p	-3,33
11	mmu-miR-8101	-2,29
12	mmu-miR-5128	-2,26
13	mmu-miR-762	-2,1
14	mmu-miR-3547-5p	-2,08
15	mmu-miR-2861	-2,06

4.4.4.1.2. Kontrol-Kontrol+SAHA gruplarına ait KEGG Yolak analizi

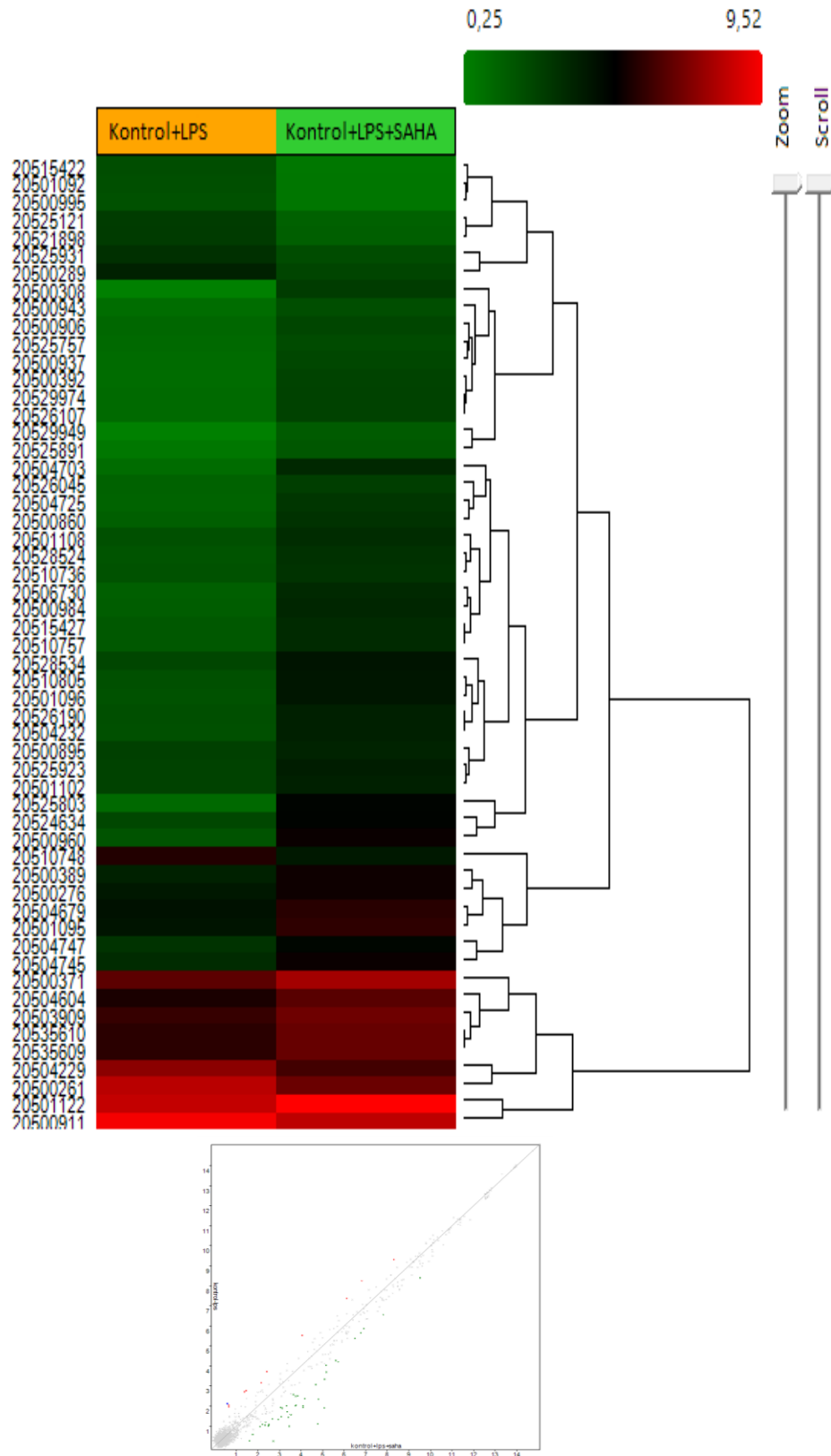
Gruplar arasında miRNA ekspresyon farklılıklarına Scatter plot analizi ile bakıldığında genel olarak miRNA ekspresyonlarının düştüğü görülmektedir. Bu sonuçların hücrelerdeki olası etkilerinin araştırılabilmesi için KEGG analizi gerçekleştirilmiştir(Diana Tools). Yaptığımız analiz sonuçlarında gösterildiği üzere, ekspresyonu değişen miRNA'ların görev alabilecekleri hücresel yolaklar, bu yolda etkileyebilecekleri gen sayısı ve yolda rol oynayabilecek miRNA sayısı Tablo 11'de belirtilmiştir.

Tablo 11. Kontrol ve Kontrol+SAHA grupları arasındaki miRNA farklılıklarına ait KEGG yolak analizi(p≤0,05)

No	KEGG yolak	p-value	Gen Sayısı	miRNA sayısı
1	Wnt Sinyal Yolu	8,86E+04	86	69
2	Adherens junction	2,11E+05	49	60
3	Phosphatidylinositol Sinyal Yolağı	2,76E+05	52	58
4	ECM-Reseptör Etkileşimi	5,28E+05	44	52
5	MAPK Sinyal Yolağı	6,82E+05	138	74
6	Mucin type O-Glycan Biyosentezi	1,32E+06	17	26
7	Endoplazmik Retikulumda Protein İşlenmesi	2,06E+05	96	67
8	Aktin iskeleti işlenmesi	4,06E+06	119	72
9	Endositoz	0.000140546452213	114	66
10	Yağ Asiti Metabolizması	0.000236622579921	18	32
11	PI3K-Akt Sinyal Yolağı	0.000265822555954	174	76
12	TGF-beta Sinyal Yolağı	0.000604134087773	47	59

4.4.4.2 Kontrol+LPS ve Kontrol+LPS+SAHA deney grupları arasındaki miRNA ekspresyon farkları

LPS uyarımı yapılan makrofaj hücreleri ile LPS ile birlikte SAHA muamelesi yapılan makrofaj hücrelerindeki miRNA ekspresyon farklılıkları incelendiğinde 55 miRNA ekspresyonunun 2 kat veya üzeri oranla değiştiği görülmüş ve bu değişimlere ait scatter plot ve hierarchical clustering analizleri şekil 21'de gösterilmiştir.



Şekil 21. Kontrol+LPS ve Kontrol+LPS+SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonlarına ait Scatter plot ve Hierarchical Clustering analizleri.(kırmızı renk tonları yüksek ekspresyonu, yeşil renk tonları ise düşük ekspresyonu ifade etmektedir).

LPS muamelesi yapılmış hücrelere oranla SAHA ile birlikte LPS muamelesi yapılan hücrelerde 11 miRNA ekspresyonu düşmüş (Tablo 12), buna karşı 44 miRNA ekspresyonu ise artmıştır (Tablo13). Kontrol+LPS ve Kontrol+LPS+SAHA deney grupları arasında ekspresyonu değişen miRNA'lar incelendiğinde miR-3084-3p'nin 2,92 katlık azalmayla ekspresyonu en çok düşen miRNA olduğu miR-6921-5p nin ise -12,57 katlık değişimle ekspresyonu en fazla artan miRNA olduğu görülmüştür.

Tablo 12. Kontrol + LPS – Kontrol+LPS+ SAHA deney grupları arasında downregüle miRNA'lar ve değişim oranları

No	miRNA ismi	FARK
1	mmu-miR-3084-3p	2,92
2	mmu-miR-1946a	2,79
3	mmu-miR-125a-5p	2,68
4	mmu-miR-19a-3p	2,64
5	mmu-let-7k	2,55
6	mmu-miR-342-5p	2,5

No	miRNA ismi	FARK
7	mmu-miR-140-5p	2,48
8	mmu-miR-1231-5p	2,47
9	mmu-miR-20b-5p	2,41
10	mmu-miR-6984-5p	2,02
11	mmu-miR-92a-3p	2,01

Tablo 13. Kontrol +LPS– Kontrol+LPS+SAHA deney grupları arasında upregüle olan miRNA'lar ve değişim oranları

No	miRNA ismi	FARK
		-
1	mmu-miR-6921-5p	12,57
2	mmu-miR-330-3p	-8,98
3	mmu-miR-152-3p	-5,54
4	mmu-miR-6349	-5,52
5	mmu-miR-146b-3p	-5,44
6	mmu-miR-28a-3p	-4,47
7	mmu-miR-1981-5p	-4,22
8	mmu-miR-339-5p	-3,96
9	mmu-miR-669f-5p	-3,89
10	mmu-miR-7658-5p	-3,53
11	mmu-miR-500-3p	-3,38
12	mmu-miR-503-5p	-3,31
13	mmu-miR-7116-5p	-3,27
14	mmu-miR-466m-5p	-3,13
15	mmu-miR-669m-5p	-3,13
16	mmu-miR-700-3p	-3,05
17	mmu-miR-192-5p	-3,04
18	mmu-miR-501-3p	-3,03
19	mmu-miR-28a-5p	-2,91
20	mmu-miR-195a-3p	-2,77
21	mmu-miR-194-5p	-2,77
22	mmu-miR-8109	-2,75

No	miRNA ismi	FARK
23	mmu-miR-7070-5p	-2,69
24	mmu-miR-3473f	-2,54
25	mmu-miR-423-5p	-2,54
26	mmu-miR-6980-5p	-2,52
27	mmu-miR-212-3p	-2,48
28	mmu-miR-7040-5p	-2,47
29	mmu-miR-324-3p	-2,42
30	mmu-miR-185-5p	-2,4
31	mmu-miR-139-3p	-2,38
32	mmu-miR-7653-5p	-2,36
33	mmu-miR-6965-5p	-2,26
34	mmu-miR-27a-5p	-2,26
35	mmu-miR-1934-3p	-2,19
36	mmu-miR-744-5p	-2,18
37	mmu-miR-326-3p	-2,18
38	mmu-mir-465c-2	-2,16
39	mmu-mir-465c-1	-2,16
40	mmu-miR-6898-5p	-2,16
41	mmu-miR-320-3p	-2,16
42	mmu-miR-132-3p	-2,15
43	mmu-miR-23a-5p	-2,09
44	mmu-miR-532-5p	-2,05

miRNA değişimlerinin hücrelerdeki olası etkilerinin incelenebilmesi amacıyla yapılan KEGG analizine göre belirlenen miRNA'ların rol oynayabilecekleri hücresel yollar bulunmuştur. Yaptığımız analiz sonuçlarında gösterildiği üzere, ekspresyonu değişen miRNA'ların görev alabilecekleri hücresel yollar, bu yolda etkileyebilecekleri gen sayısı ve yolda rol oynayabilecek miRNA sayısı tablo 14'te belirtilmiştir.

Tablo 14. Kontrol+LPS ve Kontrol+LPS+ SAHA grupları arasındaki miRNA farklılıklarına ait KEGG yolaç analizi ($p \leq 0,05$)

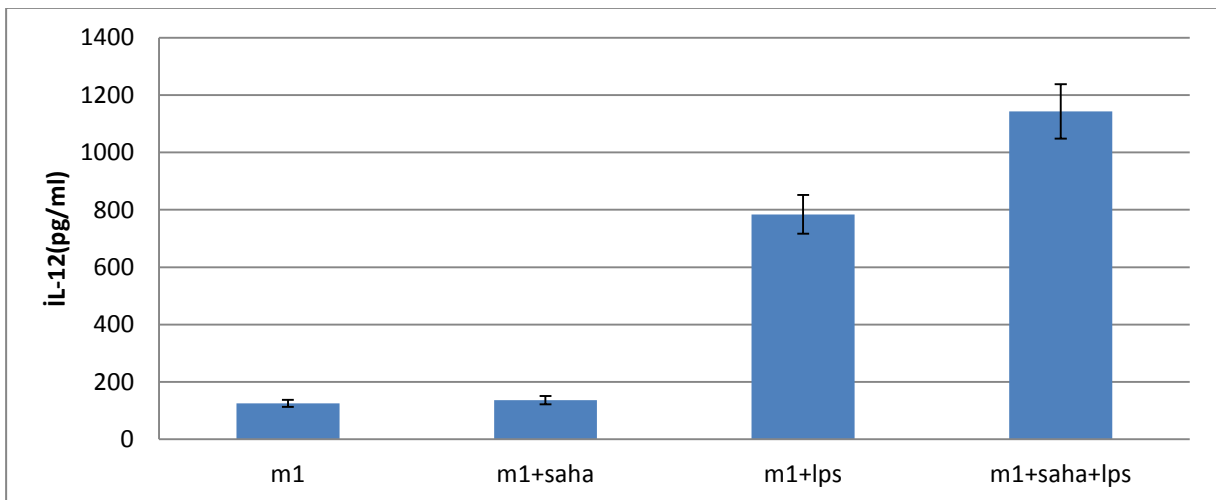
No	KEGG yolaç	p-value	Gen Sayısı	miRNA sayısı
1	ECM-Reseptör Etkileşimi	4,90E+02	38	27
2	MAPK Sinyal Yolağı	8,04E+03	123	48
3	Doymamış Yağ asitlerinin Biyosentezi	9,03E+04	13	16
4	Endositoz	3,43E+05	103	41
5	Mucin type O-Glycan Biyosentezi	1,86E+06	13	12
6	TGF-beta Sinyal Yolağı	5,30E+06	42	34
7	PI3K-Akt Sinyal Yolağı	7,59E+06	148	44
8	Aktin İskeletinin Düzenlenmesi	0.0002643855	96	38
9	Focal adhesion	0.0004544868	93	42
10	AMPK Sinyal Yolağı	0.0005254098	61	35

4.5. SAHA'nın Klasik aktive Makrofaj (M1) fenotipine olan etkileri

Herhangi bir uyarı almamış olan kontrol grubu makrofaj hücrelerine SAHA'nın etkileri incelendikten sonra, daha önce M1 fenotipine polarize edilmiş makrofaj hücrelerine olan etkileri incelenmiştir.

4.5.1 Sitokin salınımlarına olan etkileri

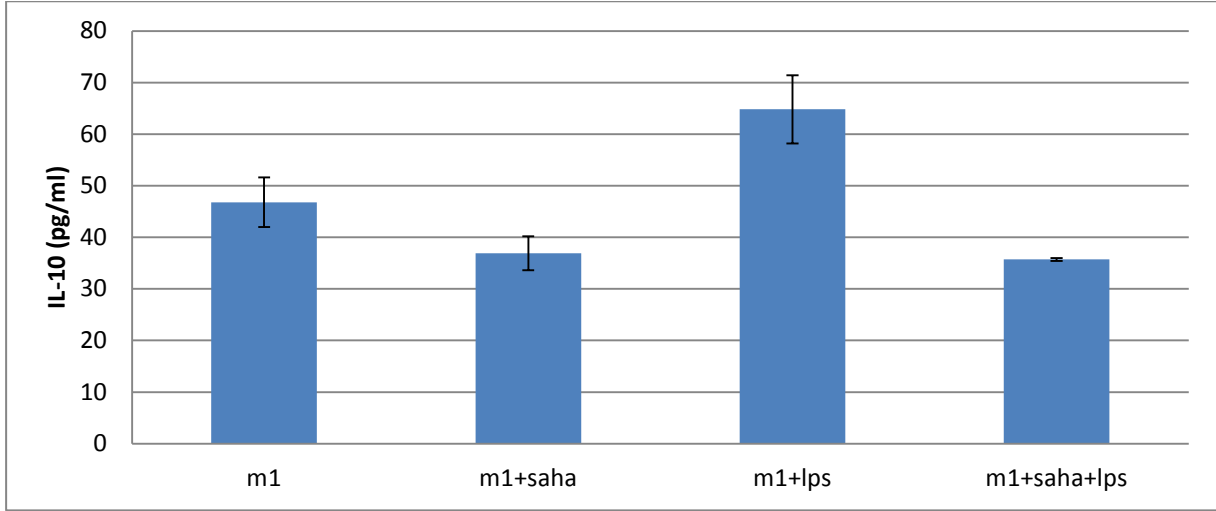
4.5.1.1 IL-12 sitokin salınımına olan etkisi



Şekil 22. SAHA'nın M1 deney grubunda IL-12 sitokin salınımına olan etkisi

M1 fenotipine polarize edilmiş makrofajlarda SAHA'nın IL-12 salınımına olan etkisi incelendiğinde, Şekil 22'de gösterildiği gibi tek başına SAHA muamelesi IL-12 sitokin salınımında önemli bir değişikliğe neden olmazken, LPS ile birlikte SAHA ile muamele edilen makrofaj hücrelerinde IL-12 sitokin salınımının kontrol hücrelerinin aksine arttığı görülmüştür ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,17$).

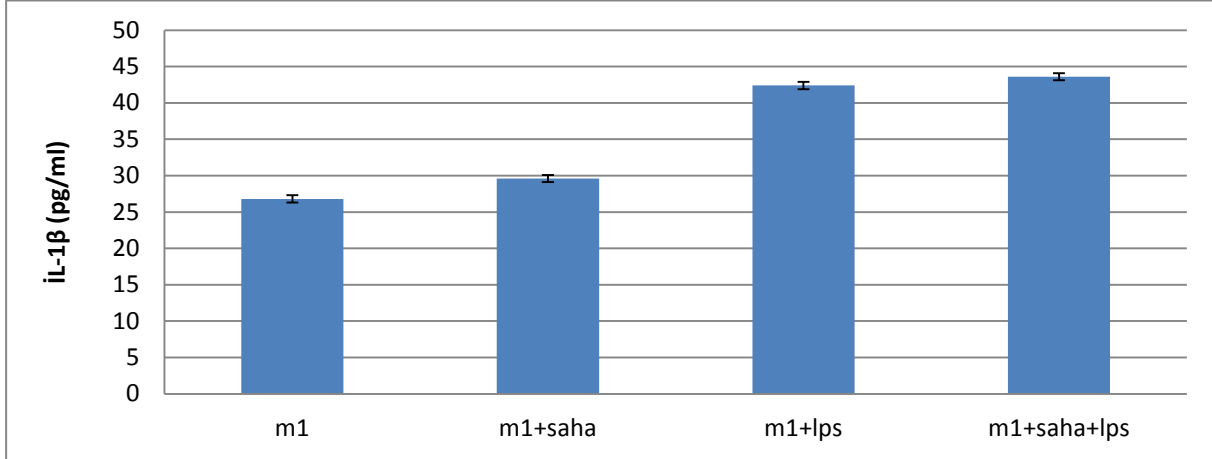
4.5.1.2. IL-10 sitokin salınımına olan etkisi



Şekil 23. SAHA'nın M1 deney grubunda IL-10 sitokin salınımına olan etkisi

M1 fenotipine polarize edilmiş makrofajlarda SAHA'nın IL-10 sitokin salınımına olan etkileri incelendiğinde, Şekil 23'de gösterildiği gibi M1 hücreleri tek başına SAHA ile muamele edildiğinde IL-10 sitokin salınımında düşüş olduğu görülmüş ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,21$). Hücreler LPS ve LPS+SAHA ile muamele edildiğinde benzer şekilde IL-10 salınımı düşmüş ancak bu azalma da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,25$).

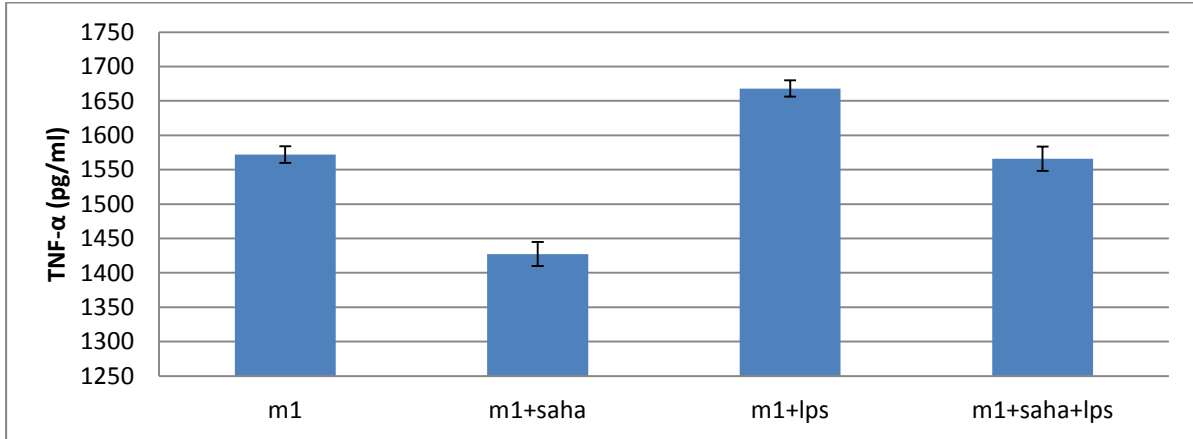
4.5.1.3 SAHA'nın M1 makrofaj hücrelerinde IL-1 β salınımına olan etkisi



Şekil 24. SAHA'nın M1 makrofaj hücrelerinde IL-1 β sitokin salınımına olan etkisi

SAHA'nın M1 polarize makrofaj hücrelerinde IL-1 β sitokin salınımına olan etkileri incelendiğinde Şekil 24'de görüldüğü gibi tek başına SAHA muamelesinin IL-1 β sitokin salınımını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedikleri görülmüştür ($p=0,13$). Benzer şekilde LPS ile muamele edilen M1 makrofajları ile LPS ve SAHA birlikte muamele edilen makrofajlardaki IL-1 β sitokin salınımı karşılaştırıldığında da anlamlı bir değişikliğin olmadığı saptanmıştır ($p=0,18$).

4.5.1.4 SAHA'nın M1 makrofaj hücrelerinde TNF- α salınımına olan etkisi



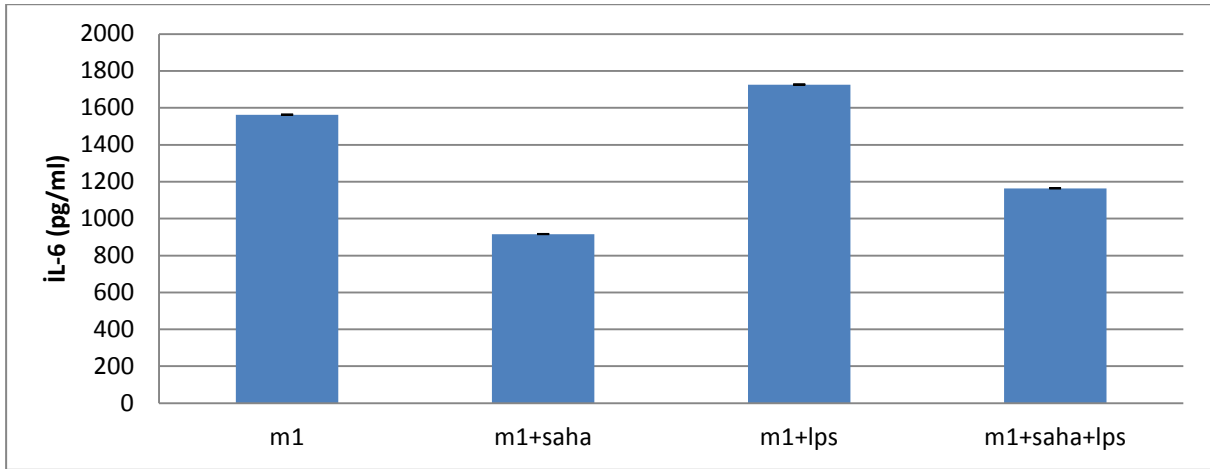
Şekil 25. M1 makrofajlarında TNF- α sitokin salınım salınımına olan etkisi

SAHA'nın M1 polarize makrofaj hücrelerinde TNF- α sitokin salınımına olan etkileri incelendiğinde Şekil 25'de gösterildiği gibi M1 makrofajlarının tek başına SAHA ile muamele edildiğinde M1 makrofajlarına oranla TNF- α sitokin salınımının düştüğü görülmektedir, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,08$).

Tek başına LPS ile muamele edilen M1 makrofajları ile LPS ve SAHA ile birlikte muamele edilen M1 makrofajlarındaki TNF- α sitokin salınımı karşılaştırıldığında benzer şekilde sitokin salınımının düştüğü ancak istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşün olmadığı görülmüştür($p=0,1$)

4.5.1.5 SAHA'nın M1 makrofaj hücrelerinde IL-6 salınımına olan etkisi

M1 makrofajları üzerine SAHA'nın IL-6 sitokin salınımına olan etkisi incelendiğinde,



Şekil 26. M1 makrofajlarında IL-6 sitokin salınımına etkisi

SAHA'nın M1 polarize makrofaj hücrelerinde IL-6 sitokin salınımına olan etkileri incelendiğinde şekil 26'da görüldüğü gibi tek başına SAHA uygulanan M1 makrofajları ile M1 makrofajlarının IL-6 salınımları karşılaştırıldığında sitokin salınımında yaklaşık % 40 oranında bir azalmanın olduğu görülmüştür. Yaptığımız istatistiksel analiz sonucunda bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur($p=0,001$). Benzer bir şekilde tek başına LPS ile muamele edilen M1 makrofaj hücreleri ile LPS ile birlikte SAHA uygulanan hücrelerin IL-6 salınımları karşılaştırıldığında yaklaşık %30 oranında bir azalmanın meydana geldiği görülmüş ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur($p=0,001$).

4.5.2.SAHA'nın M1 makrofajlarının hücre yüzey belirteçlerine olan etkisi

SAHA'nın M1 makrofajlarında CD86 ve CD206 hücre yüzey belirteçlerine olan etkileri incelendiğinde;

Tablo 15. SAHA'nın M1 makrofajlarında CD86 ve CD206 hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonlarına etkisinin akım sitometrisi analiz sonuçları

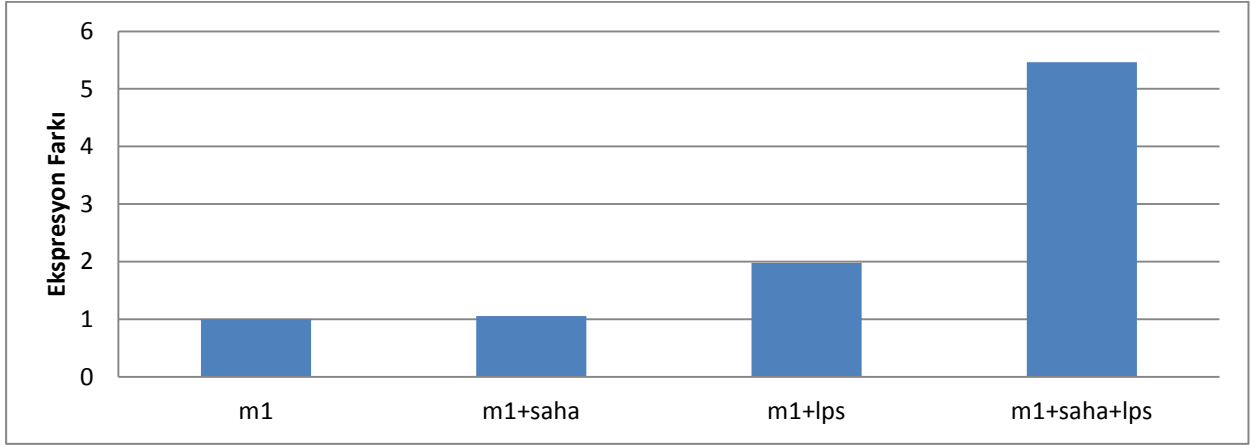
CD86 %	79	86
CD206 %	10	1
Deney Grubu	M1	M1 + SAHA
CD86 %	87	81
CD206 %	1	1
Deney Grubu	M1+LPS	M1 + LPS+ SAHA

M1 makrofajları hücre yüzeylerinde yüksek miktarda CD86 ve düşük seviyede CD206 ifade etmektedirler. M1 hücrelerine tek başına SAHA muamelesinin yapılması hücrelerdeki yüksek CD86 ifadesine herhangi bir etki yapmamış, aynı şekilde CD206 seviyesini de değiştirmemiştir.

M1 makrofajlarına tek başına LPS verilmesi ve LPS ile birlikte SAHA muamelesinin yapılması M1 makrofajlarında yüksek CD86 seviyesini değiştirmemiş, aynı şekilde CD 206 seviyesinin de değişmeyerek düşük seviyede ekspresyona devam ettiği görülmüştür (Tablo 15).

4.5.3. SAHA'nın M1 makrofajlarında gen ekspresyonları üzerine etkileri

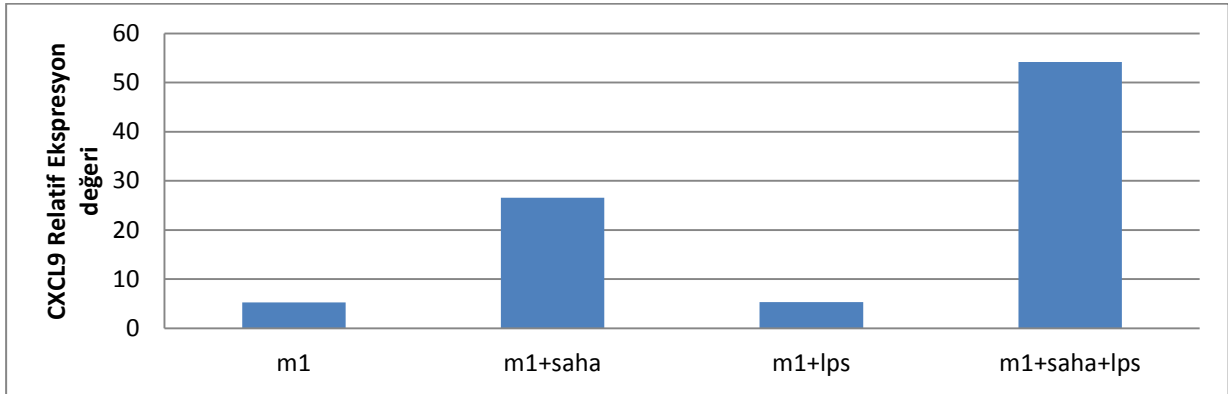
4.5.3.1. M1 makrofajlarında COX2 mRNA ekspresyon farkları



Şekil 27. M1 makrofajlarında Cox2 mRNA ekspresyon farkları

Şekil 27'da görüldüğü gibi M1 fenotipine polarize edilen makrofajlara tek başına SAHA verilmesi COX2 mRNA ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. M1 hücrelerine tek başına LPS ilave edilmesi COX2 mRNA ekspresyonunda yaklaşık iki katlık bir artışa neden olmuş, ancak LPS SAHA ile birlikte verildiğinde bu artışın yaklaşık beş buçuk katlık bir oranda arttığı görülmüştür. Yaptığımız istatistiksel analiz sonucunda bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p=0,04$)

4.5.3.2. M1 makrofajlarında CXCL9 mRNA ekspresyon farkları

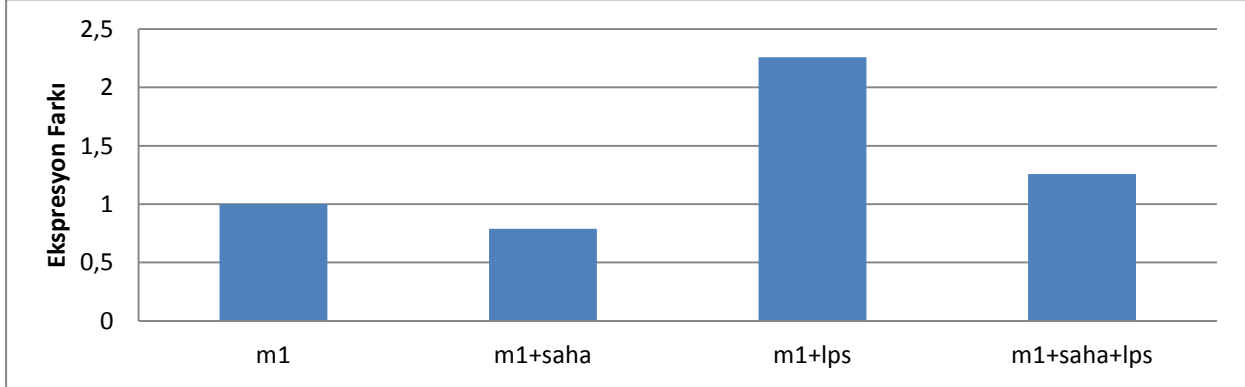


Şekil 28. M1 makrofajlarında CXCL9 mRNA ekspresyon farkları

Şekil 28'de görüldüğü gibi M1 makrofaj fenotipi için belirleyici olan CXCL9 kemokini için yapılan mRNA ekspresyon analizi sonucunda M1 makrofajlarına tek başına SAHA uygulanması CXCL9 mRNA ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmüştür ($p=0,011$). M1 makrofajlarına tek başına LPS muamele edilmesi ekspresyonda

anamlı bir değişikliğe neden olmazken, SAHA ile birlikte LPS uygulanması yine CXCL9 mRNA ekspresyonunu anlamlı bir şekilde arttırmıştır($p=0,0001$).

4.5.3.3. M1 makrofajlarında TNF- α mRNA ekspresyon farkları

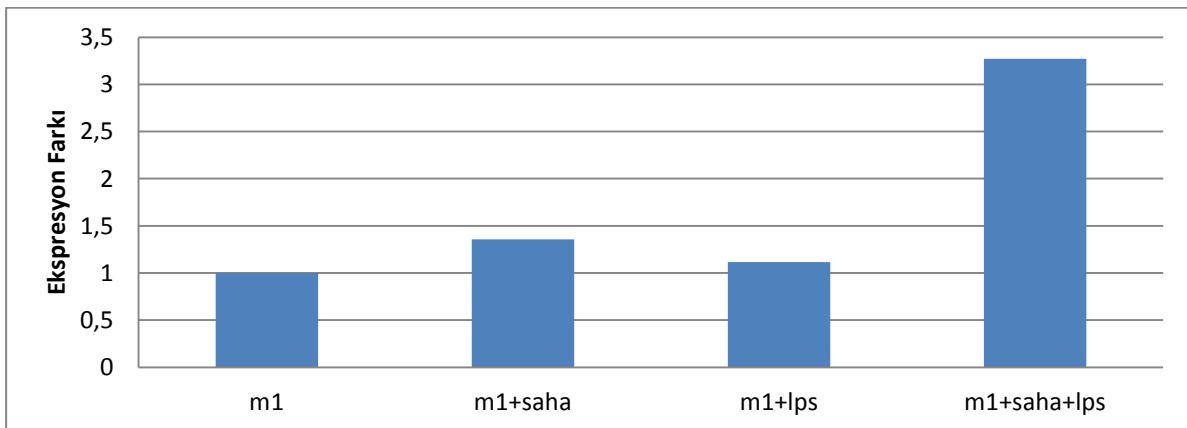


şekil 29. M1 makrofajlarında TNF- α mRNA ekspresyon farkları

şekil 29'de görüldüğü gibi M1 makrofajlarında TNF- α mRNA ekspresyon farklılıkları incelendiğinde tek başına SAHA muamelesinin M1 makrofajlarında TNF- α ekspresyonunu yaklaşık %25 oranında düşürdüğü görülmüştür. Yaptığımız istatistiksel analiz sonucunda bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p=0,21$).

M1 makrofajlarının tek başına LPS ile muamele edilmesi sonucunda TNF- α ekspresyonu iki kattan fazla bir artış meydana geldiği görülmüştür. M1 makrofajları SAHA varlığında LPS ile muamele edildiğinde TNF- α mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşmüştür ($p=0,005$).

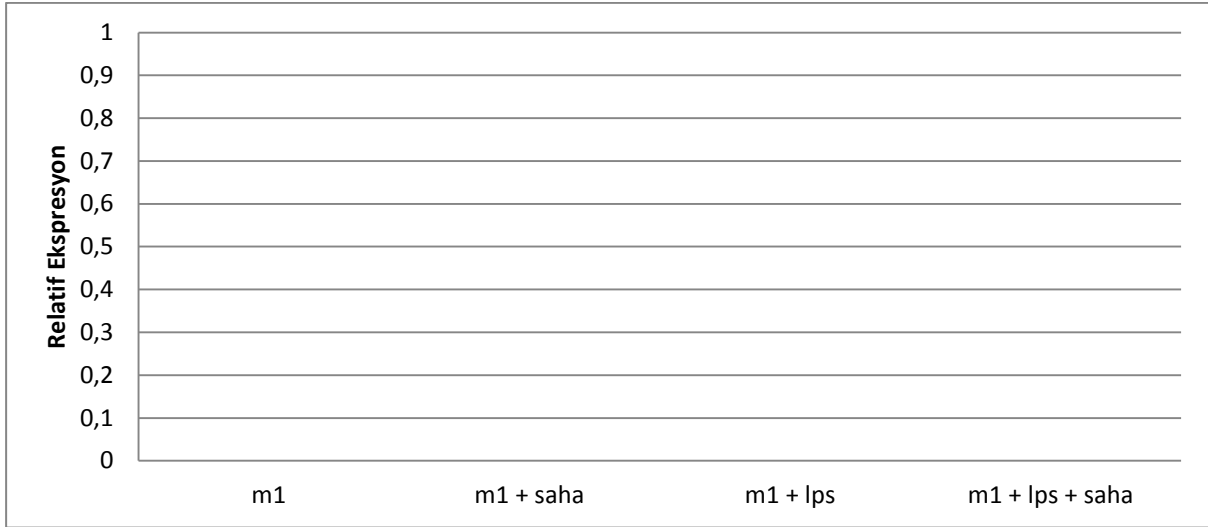
4.5.3.4. M1 makrofajlarında SAHA'nın NOS2 ekspresyonuna etkisi



şekil 30. SAHA'nın M1 makrofajlarında NOS2 mRNA ekspresyonuna olan etkisi

Şekil 30'de görüldüğü gibi M1 makrofajlarına tek başına SAHA uygulandığında NOS2 mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan bir artışa neden olduğu görülmüştür($p=0,2$). M1 makrofajları tek başına LPS ile muamele edildiğinde NOS2 ekspresyonunda önemli bir artışın olmadığı görülmüş ancak M1 makrofajları SAHA ve LPS ile birlikte muamele edildiğinde NOS2 mRNA seviyesinde üç kattan fazla bir artışın olduğu görülmüş ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır($p=0,06$).

4.5.3.5. M1 makrofajlarında SAHA'nın Arg1 ekspresyonuna etkisi



Şekil 31. M1 makrofajlarında Arg1 mRNA relatif ekspresyon değerleri

Şekil 31'de görüldüğü gibi M1 makrofajlarında Arg1 mRNA seviyeleri incelendiğinde tüm gruplarda Arg1 ekspresyonunun gerçekleşmediği görülmüş olup ekspresyonların çok düşük olmasından dolayı grafik relatif ekspresyon olarak verilmiştir.

4.5.4. miRNA ekspresyon değişimleri

M1 makrofaj hücrelerine polarize edilmiş makrofaj hücrelerinde SAHA'nın miRNA'ların ekspresyonuna olan etkileri incelendiğinde SAHA ile muamele edilen M1 makrofaj hücreleri ile M1 makrofaj hücreleri arasında 47 miRNA ekspresyonunun 2 kat veya daha fazla değiştiği görülmüş ve bu değişimlere ait scatter plot ve hierarchical clustering analizleri Şekil 32 'de gösterilmiştir. Ekspresyonu değişen M1 makrofajlarına SAHA muamelesi sonucunda 31 miRNA ekspresyonu düşerken (Tablo 16), 15 miRNA ekspresyonu ise artmıştır (Tablo 17). M1 ve M1 + SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonları incelendiğinde SAHA muamelesi sonucunda ekspresyonu en fazla azalan miRNA'nın 5,29 katlık azalmayla mmu-miR-5099 olduğu, en yüksek oranla ekspresyonu artan miRNA'nın ise 4,99 katlık azalma gösteren mmu-miR-455-3p olduğu görülmüştür.

Tablo 16. M1-M1+ SAHA deney grupları arasında downregüle miRNA'lar ve değişim oranları

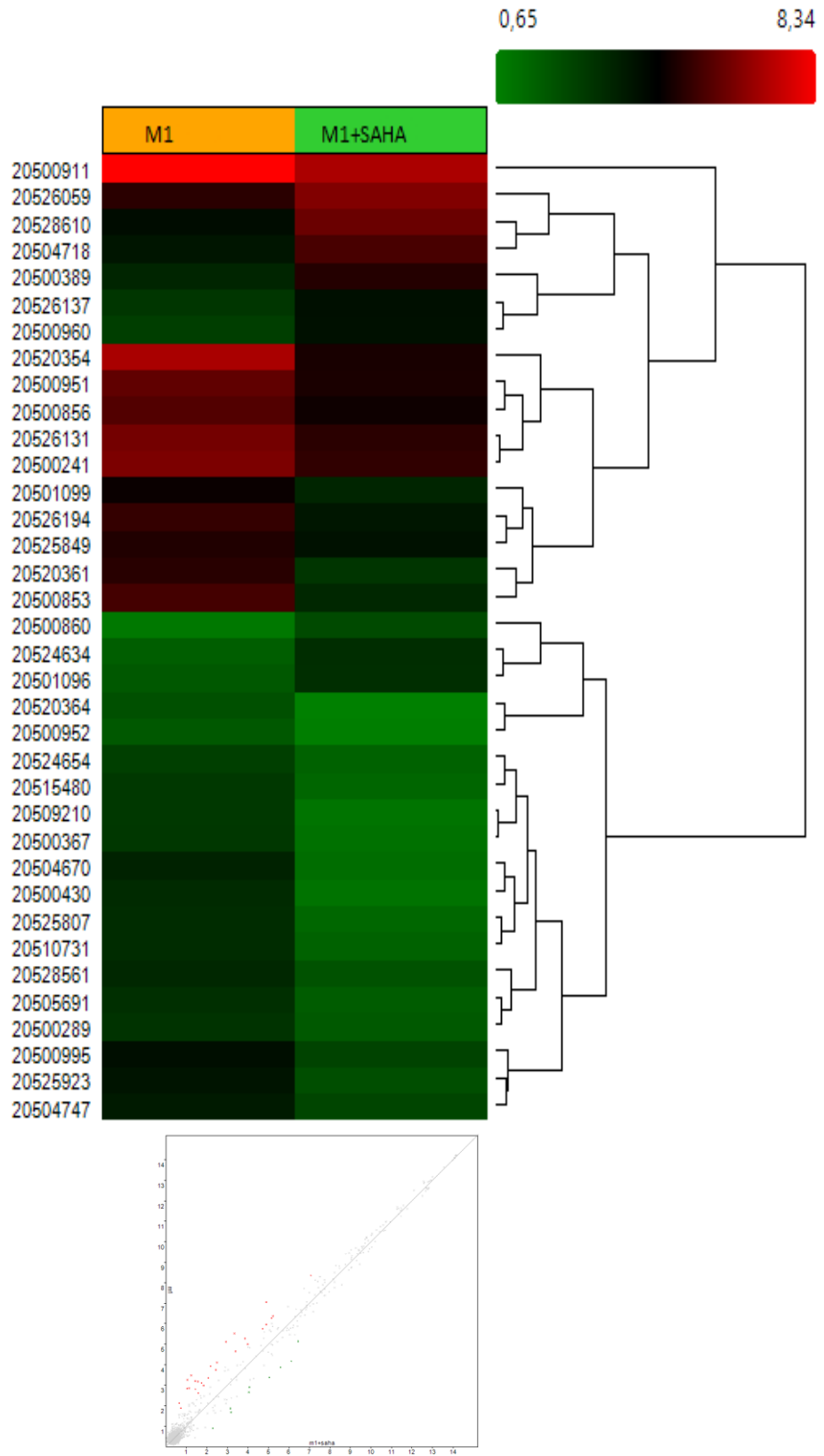
No	miRNA	Fark
1	mmu-miR-5099	5,29
2	mmu-let-7f-5p	5,06
3	mmu-miR-30c-5p	4,62
4	mmu-miR-7653-5p	4,53
5	mmu-miR-674-3p	4,5
6	mmu-miR-30e-5p	4,35
7	mmu-miR-5107-5p	3,72
8	mmu-miR-6923-5p	3,67
9	mmu-miR-6980-5p	3,35
10	mmu-miR-1931	3,08
11	mmu-miR-1895	2,85
12	mmu-miR-3104-5p	2,83
13	mmu-miR-7081-5p	2,66
14	mmu-miR-6368	2,63
15	mmu-miR-7671-3p	2,63
16	mmu-miR-92a-3p	2,59

No	miRNA	Fark
17	mmu-let-7g-5p	2,44
18	mmu-miR-5110	2,38
19	mmu-miR-7118-5p	2,38
20	mmu-miR-183-5p	2,29
21	mmu-miR-7082-5p	2,27
22	mmu-miR-30d-5p	2,25
23	mmu-miR-15b-5p	2,22
24	mmu-miR-1195	2,19
25	mmu-miR-1892	2,14
26	mmu-miR-10a-5p	2,13
27	mmu-miR-3473a	2,13
28	mmu-miR-100-5p	2,12
29	mmu-miR-6239	2,09
30	mmu-miR-328-5p	2,08
31	mmu-miR-30b-5p	2,06

Tablo 17. M1-M1+ SAHA deney grupları arasında upregüle miRNA'lar ve değişim oranları

No	miRNA	Fark
1	mmu-miR-455-3p	-4,99
2	mmu-miR-6349	-3,81
3	mmu-miR-7686-5p	-3,53
4	mmu-miR-28a-3p	-3,21
5	mmu-miR-194-5p	-3,17
6	mmu-miR-200c-3p	-2,94
7	mmu-miR-3620-5p	-2,65
8	mmu-miR-671-5p	-2,63

No	miRNA	Fark
9	mmu-miR-7047-5p	-2,57
10	mmu-miR-7116-5p	-2,27
11	mmu-miR-680	-2,13
12	mmu-miR-192-5p	-2,12
13	mmu-miR-324-5p	-2,07
14	mmu-miR-28a-5p	-2,06
15	mmu-miR-7018-5p	-2,03



Şekil 32. M1 ve M1+SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonlarına ait Scatter plot ve Hierarchical Clustering analizleri.

M1 makrofaj hücrelerinin SAHA ile muamele edilmesi sonucunda ekspresyonları değişen miRNA'ların olası hücresel etkilerinin belirlenebilmesi için KEGG yolak analizi gerçekleştirilmiş olup, yaptığımız analiz sonuçlarında gösterildiği üzere, ekspresyonu değişen miRNA'ların görev alabilecekleri hücresel yollar, bu yolda etkileyebilecekleri gen sayısı ve yolda rol oynayabilecek miRNA sayısı Tablo 18'de belirtilmiştir.

Tablo 18. M1 ve M1+SAHA grupları arasındaki miRNA farklılıklarına ait KEGG yolak analizi ($p \leq 0,05$)

No	KEGG yolak	p-value	Gen Sayısı	miRNA sayısı
1	ECM-Reseptör Etkileşimi	1,38E+00	37	28
2	PI3K-Akt Sinyal Yolağı	1,15E+05	148	39
3	Mucin type O-Glycan Biyosentezi	7,56E+05	12	16
4	Aktin iskeletinin düzenlenmesi	7,56E+05	96	33
5	Focal adhesion	7,56E+05	91	34
6	MAPK Sinyal Yolağı	8,27E+06	106	38
7	Adherens junction	0.000740508490231	34	27
8	AMPK Sinyal Yolağı	0.00175521410805	57	36
9	TNF Sinyal Yolağı	0.0103560728876	42	28
10	Ubiquitin Aracılı Proteolizis	0.0103560728876	60	32
11	Wnt Sinyal Yolağı	0.0190943530861	58	31

4.5.4. 2 M1+LPS - M1+LPS+ SAHA deney grupları arasındaki miRNA ekspresyon farklılıkları

M1 makrofaj fenotipine dönüştürülmüş hücre grubuna ek olarak LPS ile muamele edilmesi ve LPS ile birlikte SAHA ile muamele edilmesi sonucunda miRNA ekspresyonlarında meydana gelen farklılıklar incelendiğinde 82 miRNA ekspresyonunun 2 kat veya daha fazla oranla değiştiği görülmüş ve bu değişimlere ait scatter plot ve hierarchical clustering analizleri şekil 33'de gösterilmiştir. SAHA muamelesi sonucunda 3 miRNA ekspresyonu düşerken (Tablo 19) 79 miRNA ekspresyonu ise arttı (Tablo 20) görülmüştür. M1+LPS deney grubu SAHA ile muamele edildiğinde ekspresyonu en fazla azalan miRNA 2,21 katlık azalmayla mmu-mir-3068 ekspresyonu en fazla artan miRNA ise 6,34 kat artışla mmu-miR-194-5p olarak bulunmuştur.

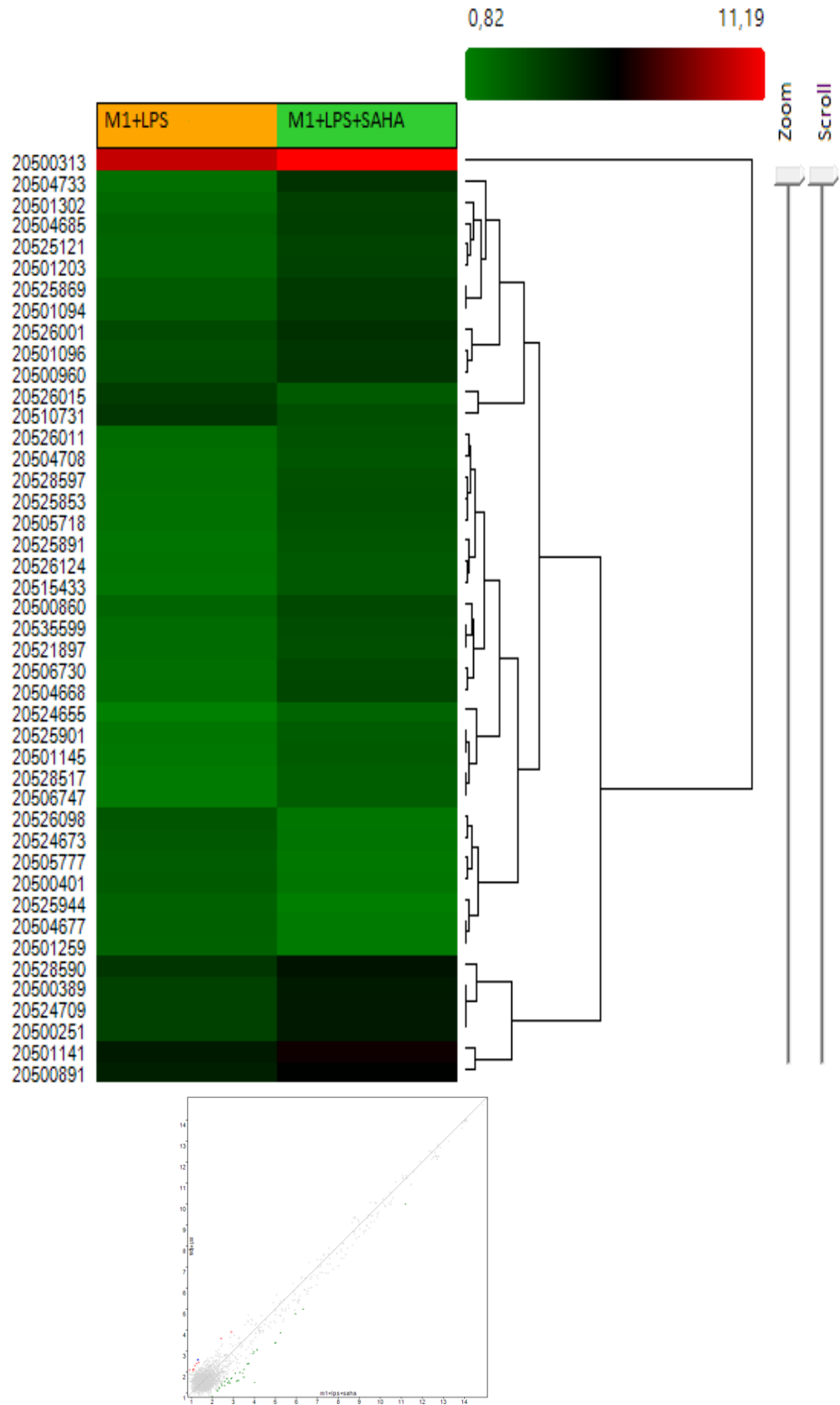
Tablo 19. M1+LPS-M1+LPS+ SAHA deney grupları arasında downregüle miRNA'lar ve değişim oranları

No	Mirna	Fark
1	mmu-mir-3068	2,21
2	mmu-miR-6984-5p	2,09
3	mmu-miR-5099	2

Tablo 20. M1+LPS-M1+ LPS+SAHA deney grupları arasında upregüle miRNA'lar ve değişim oranları

No	Mirna	Fark
1	mmu-miR-194-5p	-6,34
2	mmu-miR-706	-5,71
3	mmu-miR-30b-5p	-4,12
4	mmu-miR-3620-5p	-3,78
5	mmu-miR-760-3p	-3,73
6	mmu-miR-362-5p	-3,72
7	mmu-miR-330-3p	-3,44
8	mmu-miR-181b-5p	-3,32
9	mmu-miR-378d	-3,15
10	mmu-miR-186-3p	-3,06
11	mmu-miR-28a-5p	-3,05
12	mmu-miR-25-3p	-3,01
13	mmu-miR-335-5p	-2,9
14	mmu-miR-695	-2,88
15	mmu-miR-6965-5p	-2,81
16	mmu-miR-192-5p	-2,81
17	mmu-mir-361	-2,79
18	mmu-miR-669f-5p	-2,79
19	mmu-miR-1192	-2,76
20	mmu-miR-7023-5p	-2,69
21	mmu-miR-3102-5p	-2,61
22	mmu-miR-7005-5p	-2,58
23	mmu-miR-5615-3p	-2,55
24	mmu-mir-8101	-2,54
25	mmu-miR-21a-5p	-2,52
26	mmu-let-7f-5p	-2,5
27	mmu-miR-351-5p	-2,48
28	mmu-miR-680	-2,46
29	mmu-miR-20b-5p	-2,46
30	mmu-let-7g-5p	-2,44
31	mmu-miR-7682-3p	-2,42
32	mmu-miR-744-5p	-2,42
33	mmu-miR-7007-5p	-2,39
34	mmu-mir-365-2	-2,34
35	mmu-miR-483-5p	-2,34
36	mmu-miR-7036-5p	-2,31
37	mmu-miR-8095	-2,3
38	mmu-miR-466i-5p	-2,26
39	mmu-miR-6911-5p	-2,25
40	mmu-miR-423-5p	-2,25

No	Mirna	Fark
41	mmu-miR-7116-5p	-2,22
42	mmu-miR-7085-5p	-2,22
43	mmu-miR-28a-3p	-2,22
44	mmu-mir-7654	-2,21
45	mmu-miR-7018-5p	-2,21
46	mmu-miR-7661-5p	-2,2
47	mmu-miR-6946-5p	-2,18
48	mmu-miR-6408	-2,18
49	mmu-miR-8093	-2,17
50	mmu-miR-7027-5p	-2,17
51	mmu-miR-466o-3p	-2,16
52	mmu-mir-466j	-2,15
53	mmu-miR-7078-3p	-2,15
54	mmu-miR-466f-3p	-2,15
55	mmu-miR-6937-5p	-2,14
56	mmu-miR-344g-3p	-2,14
57	mmu-miR-466h-3p	-2,14
58	mmu-miR-669c-3p	-2,14
59	mmu-mir-1839	-2,11
60	mmu-miR-24-2-5p	-2,11
61	mmu-mir-677	-2,1
62	mmu-let-7k	-2,1
63	mmu-mir-703	-2,09
64	mmu-miR-7088-5p	-2,07
65	mmu-miR-667-5p	-2,07
66	mmu-miR-182-5p	-2,07
67	mmu-mir-200a	-2,06
68	mmu-miR-7212-5p	-2,06
69	mmu-miR-669p-3p	-2,06
70	mmu-miR-21c	-2,05
71	mmu-miR-5132-5p	-2,05
72	mmu-miR-26a-5p	-2,05
73	mmu-mir-8099-2	-2,04
74	mmu-mir-8099-1	-2,04
75	mmu-mir-3960	-2,02
76	mmu-miR-764-3p	-2,02
77	mmu-miR-155-5p	-2,02
78	mmu-miR-216c-5p	-2,01
79	mmu-miR-6969-5p	-2



Şekil 33. M1+LPS ve M1+LPS+ SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonlarına ait Scatter plot ve Hierarchical Clustering analizleri.

M1+LPS makrofaj hücrelerinin SAHA ile muamele edilmesi sonucunda ekspresyonları değişen miRNA'ların olası hücresel etkilerinin belirlenebilmesi için KEGG yolak analizleri gerçekleştirilmiştir. Yaptığımız analiz sonuçlarında gösterildiği üzere, ekspresyonu değişen miRNA'ların görev alabilecekleri hücresel yollar, bu yolda etkileyebilecekleri gen sayısı ve yolda rol oynayabilecek miRNA sayısı tablo 21' de belirtilmiştir.

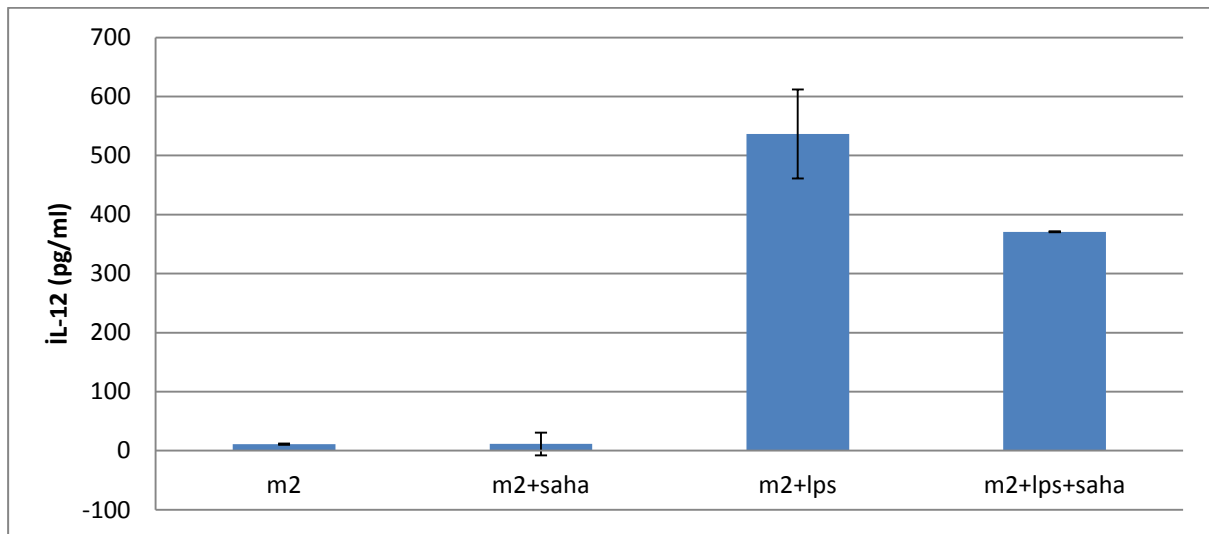
Tablo 21. M1+LPS ve M1+LPS +SAHA grupları arasındaki miRNA farklılıklarına ait KEGG yolak analizi ($p \leq 0,05$)

No	KEGG yolak	p-value	Gen Sayısı	miRNA sayısı
1	MAPK Sinyal Yolağı	9,65E+01	148	59
2	ECM-Reseptör Etkileşimi	1,37E+05	53	50
3	Endocytosis	7,85E+05	128	63
4	Wnt Sinyal Yolağı	1,79E+06	88	56
5	Doymamış Yağ asitlerinin biyosentezi	1,80E+06	15	19
6	Aktin İskeletinin Düzenlenmesi	4,44E+06	125	58
7	Phosphatidylinositol Sinyal Yolağı	6,53E+05	51	46
8	PI3K-Akt Sinyal Yolağı	7,37E+06	190	65
9	cAMP Sinyal Yolağı	8,33E+06	116	59
10	Adherens junction	0.000140983184984	49	40
11	TNF Sinyal Yolağı	0.000475584304823	65	48

4.6. SAHA'nın M2 makrofaj hücrelerine olan etkileri

4.6.1. SAHA'nın M2 makrofaj hücre gruplarında sitokin salınımlarına olan etkileri

4.6.1.1. IL-12 sitokin salınımına etkisi

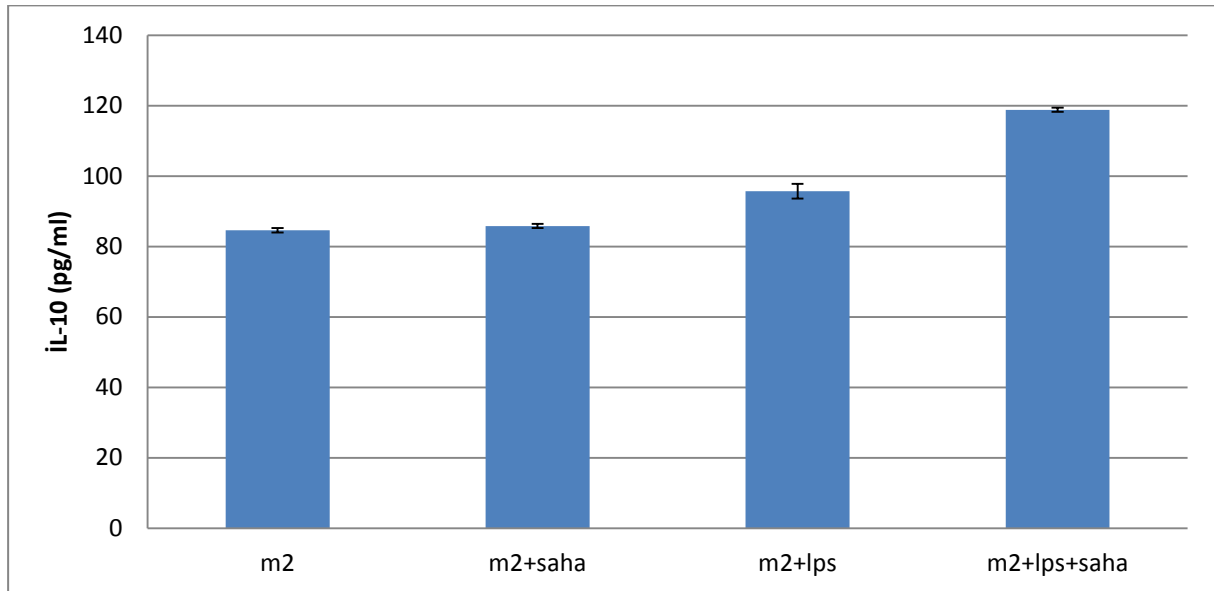


Şekil 34. SAHA'nın M2 makrofajlarında IL-12 salınımına olan etkileri

M2 fenotipine dönüştürülen hücrelerde IL-12 sitokin salınımları ELISA yöntemi ile incelendiğinde, Şekil 34'de görüldüğü gibi, M2 makrofajlarında IL-12 sitokin salınımının çok düşük seviyede olduğu görülmüştür. M2 makrofajlarına tek başına SAHA muamelesi yapıldığında IL-12 sitokin salınımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğin olmadığı görülmüştür ($p=0,12$).

M2 makrofajlarına tek başına LPS muamelesi yapıldığında IL-12 sitokin salınımının arttığı görülmüştür. M2 makrofajlarına SAHA varlığında LPS uygulandığında ise IL-12 sitokin salınımı sadece LPS muamelesi yapılan gruba oranla azaldığı görülmüş ve bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,01$).

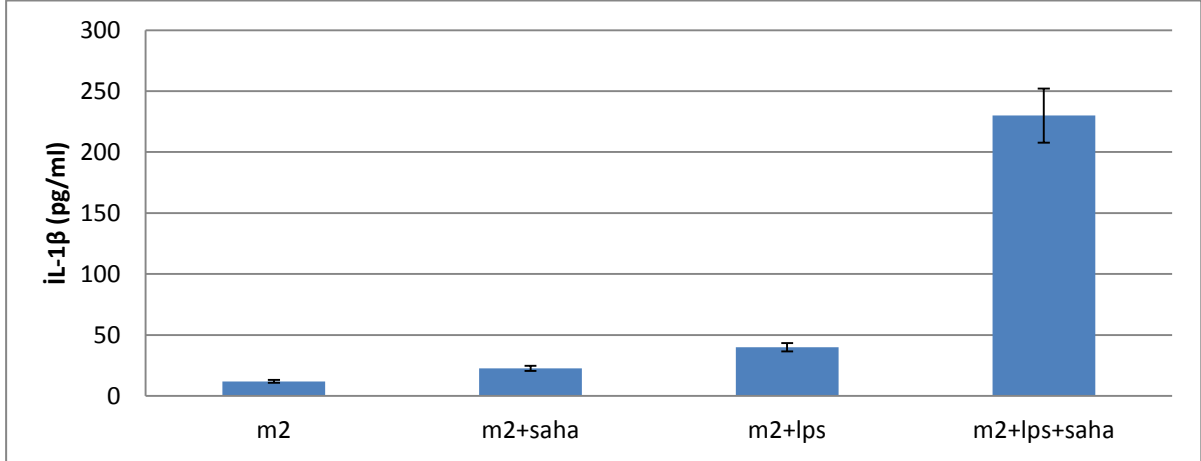
4.6.1.2. IL-10 sitokin salınımına etkisi



Şekil 35. SAHA'nın M2 makrofajlarında IL-10 salınımına olan etkileri

M2 polarize makrofaj hücreleri üzerine SAHA'nın IL-10 sitokin salınımına olan etkileri incelendiğinde Şekil 35'de görüldüğü gibi hem tek başına SAHA muamelesi yapılan hücrelerde hem de LPS ve SAHA birlikte muamele edilen hücrelerde IL-10 sitokin salınımı üzerine SAHA'nın önemli farklılık oluşturmadığı görülmüştür.

4.6.1.3. IL-1 β sitokin salınımına olan etkisi

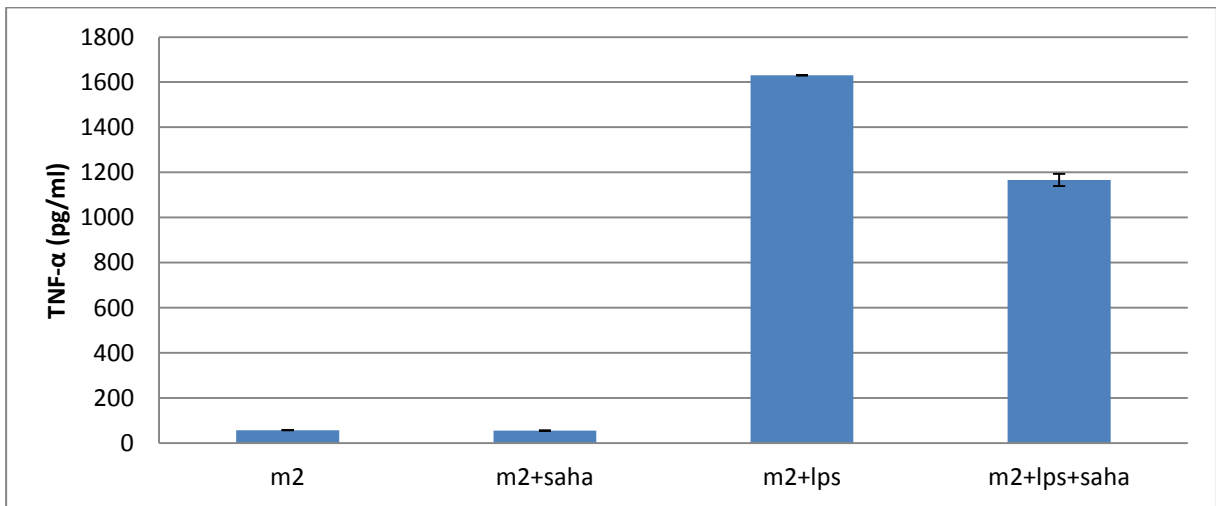


Şekil 36. SAHA'nın M2 makrofajlarında IL-1 β salınımına olan etkileri

M2 makrofajlarında IL-1 β sitokin salınımları incelendiğinde Şekil 36'da görüldüğü gibi, M2 makrofajlarında IL-1 β sitokin salınımının çok düşük seviyede olduğu görülmüştür. M2 makrofajlarına tek başına SAHA muamelesi yapıldığında sitokin seviyesinin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0,0002$)

M2 makrofajları tek başına LPS ile muamele edildiğinde IL-1 β seviyesinde önemli bir farkın olmadığı görülmüş ancak M2 makrofajları SAHA varlığında LPS ile muamele edildiğinde sitokin seviyesinde önemli bir artışın olduğu görülmüştür ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu hesaplanmıştır ($p=0,0001$).

4.6.1.4. TNF- α sitokin salınımına etkisi

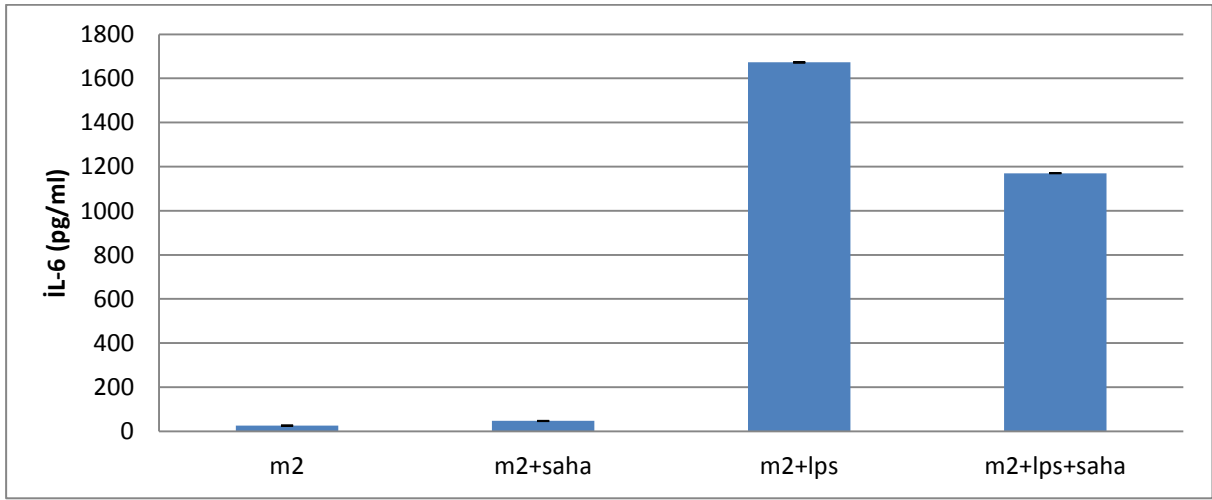


Şekil 37. SAHA'nın M2 makrofajlarında TNF- α salınımına olan etkileri

Şekil 37' gösterildiği gibi, M2 makrofajlarında TNF- α sitokin salınımları incelendiğinde M2 makrofajlarının TNF- α sitokin salınımını gerçekleştirmediği ve hücrelerin tek başına SAHA ile muamele edilmesinin TNF- α salınımında önemli bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür ($p=0,2$).

M2 makrofajlarının tek başına LPS ile muamele edilmesi TNF- α salınımını önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür. M2 makrofajları SAHA varlığında LPS ile muamele edildiğinde ise TNF- α salınımının belirgin bir şekilde azaldığı görülmüş ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı hesaplanmıştır ($p=0,09$).

4.6.1.5. IL-6 sitokin salınımına etkisi



Şekil 38. SAHA'nın M2 makrofajlarında IL-6 salınımına olan etkileri

M2 makrofajlarında IL-6 sitokin salınımı ELISA yöntemi ile araştırıldığında Şekil 38'de görüldüğü gibi, M2 fenotipindeki hücrelerin IL-6 salınımı çok düşük seviyede gerçekleştirdikleri görülmüştür. M2 hücrelerinin sadece SAHA ile muamele edilmesi IL-6 salınımında herhangi bir değişikliğe neden olmazken M2 hücrelerinin tek başına LPS ile muamele edilmesi IL-6 salınımında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmuştur.

SAHA varlığında LPS ile muamele edilen M2 hücrelerinin IL-6 sitokin salınımı tek başına LPS ile muamele edilen M2 hücreleri ile karşılaştırıldığında belirgin bir azalmanın olduğu görülmüş ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p=0,001$).

4.6.2. SAHA'nın M2 makrofajlarının hücre yüzey belirteçlerine olan etkisi

SAHA'nın M2 makrofajlarında CD86 ve CD206 hücre yüzey belirteçlerine olan etkileri incelendiğinde;

Tablo 22. M2 hücrelerinde SAHA'nın CD86 ve CD206 hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonlarına etkisinin akım sitometrisi analiz sonuçları

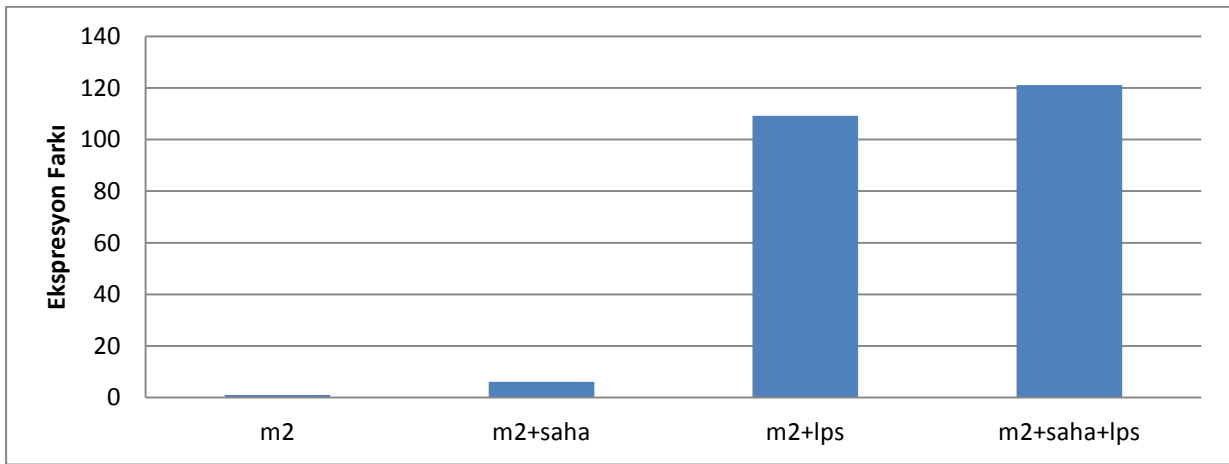
CD86 %	10	88
CD206 %	93	94
Deney Grubu	M2	M2 + SAHA

CD86 %	95	87
CD206 %	87	20
Deney Grubu	M2+LPS	M2 + LPS+SAHA

Tablo 22’de görüldüğü gibi CD86 ve CD206 hücre yüzey belirteçlerinin ifadelerine bakıldığında M2 hücrelerinde baskın olarak CD206 hücre yüzey belirtecinin ifade olduğu görülmektedir. M2 hücreleri tek başına SAHA ile muamele edildiğinde CD 206 ve CD86 her ikisinin de ifade edildiği görülmüştür. M2 hücreleri tek başına LPS ile muamele edildiğinde benzer bir şekilde hücrelerin hem CD86 hem de CD206 ifadesinin olduğu görülmüştür. Hücreler SAHA varlığında LPS ile muamele edildiğinde ilginç bir biçimde CD206 ifadesinin azaldığı ve baskın bir şekilde CD86 ifadesinin gerçekleştiği görülmüştür.

4.6.3.M2 hücrelerinde SAHA’nın mRNA ekspresyonlarına olan etkileri

4.6.3.1 COX2 ekspresyonuna etkisi



Şekil 39. SAHA’nın M2 makrofajlarında COX2 mRNA ekspresyonuna olan etkisi

Şekil 39 ’de görüldüğü gibi M2 makrofaj hücrelerinde COX2 ekspresyonu incelendiğinde M2 makrofajlarında COX2 ekspresyonunun olmadığı görülmüştür. M2 hücrelerine tek başına SAHA verilmesi COX2 ekspresyonunu yaklaşık 6 kat arttırdığı görülmüştür ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,01$). M2 hücrelerine tek başına LPS verilmesi COX2 ekspresyonunu önemli oranda arttırmış SAHA varlığında LPS verildiğinde bu artışın daha fazla gerçekleştiği bulunmuş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,4$).

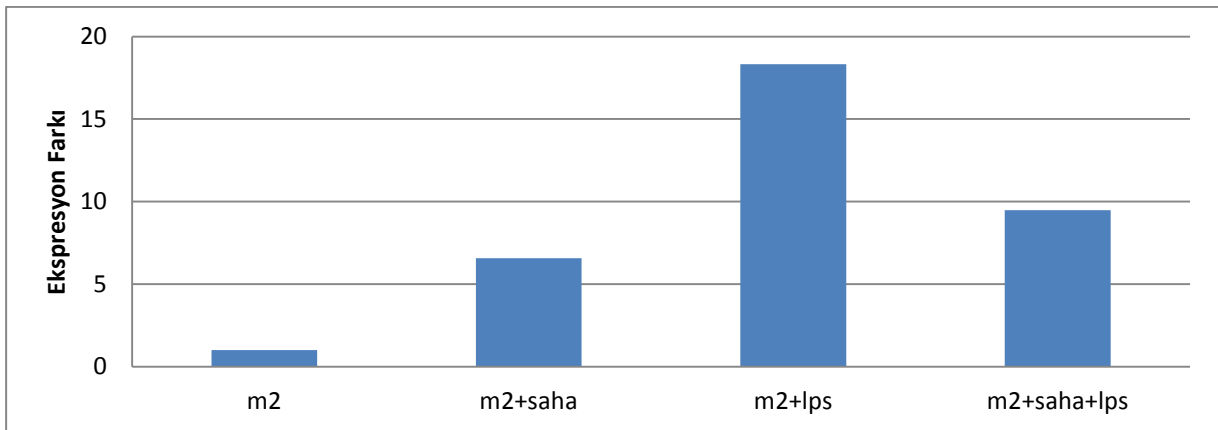
4.6.3.2. CXCL9 ekspresyon değişimi



şekil 40. SAHA'nın M2 makrofajlarında CXCL9 mRNA ekspresyonuna olan etkisi

şekil 40'de görüldüğü gibi yaptığımız real-time PCR analizleri sonucunda M2 makrofaj deney gruplarının hiç birinde CXCL9 mRNA ekspresyonunun geręekleřmedięi görülmüştür.

4.6.3.3. TNF- α ekspresyon değişimi

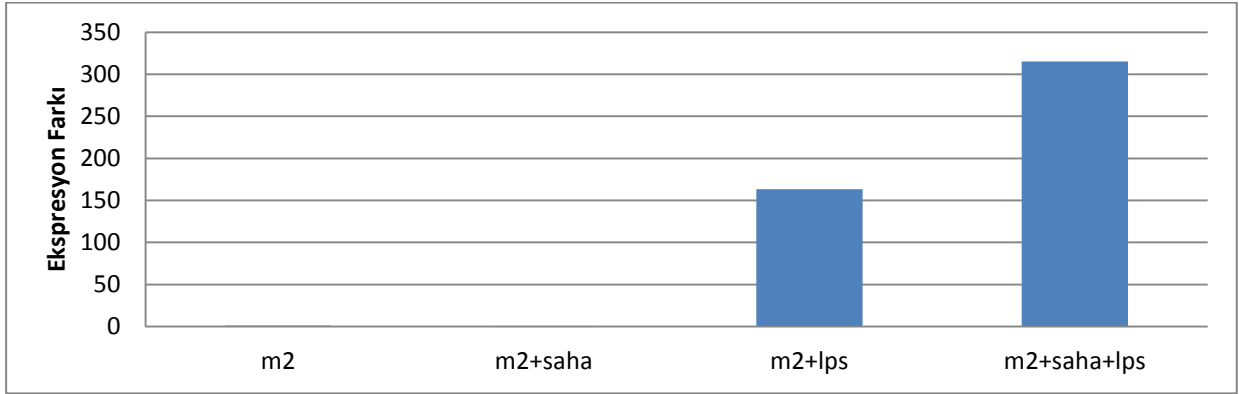


şekil 41. SAHA'nın M2 makrofajlarında TNF- α mRNA ekspresyonuna olan etkisi

şekil 41'de görüldüğü gibi M2 polarize makrofaj hücrelerinde TNF- α ekspresyon değişimi incelendiğinde M2 hücrelerinin çok düşük miktarda TNF- α ekspresyonu gösterdikleri görülmüştür. Tek başına SAHA muamelesi TNF- α ekspresyonunu yaklaşık altı kat arttırdığı görülmüştür. Yaptığımız istatistiksel analiz sonucunda bu artışın anlamlı olduğu bulunmuştur ($p=0,003$).

M2 hücrelerine tek başına LPS muamelesinin yapılması TNF- α ekspresyonunu önemli ölçüde arttırmıştır ancak SAHA ve LPS M2 hücrelerine beraber uygulandığında TNF- α ekspresyonu sadece LPS ile muamele edilen hücrelere orala yaklaşık olarak %50 azalmış ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,09$).

4.6.3.4 M2 makrofajlarında NOS2 mRNA ekspresyon farkları

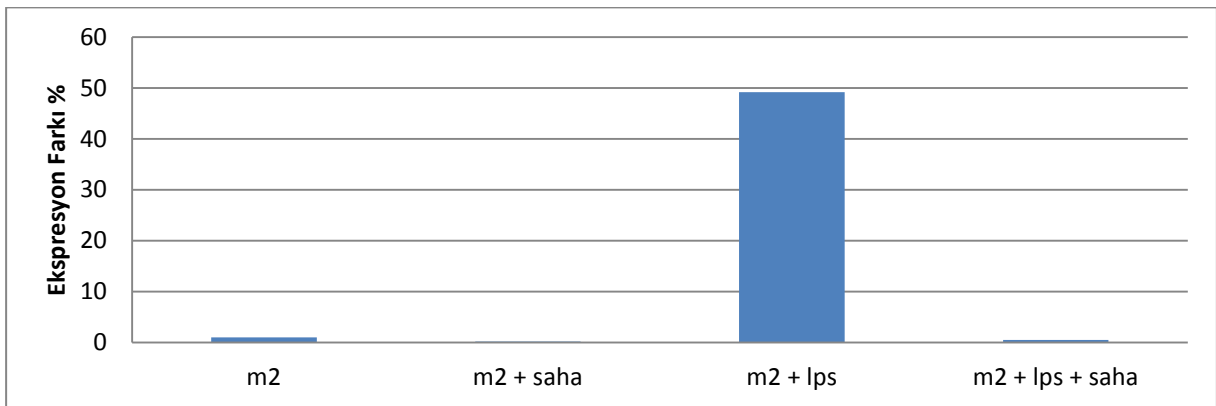


Şekil 42. SAHA'nın M2 makrofajlarında NOS2 mRNA ekspresyonuna olan etkisi

Şekil 42'de görüldüğü gibi M2 hücrelerinde NOS2 ekspresyon değişimi incelendiğinde; M2 polarize hücrelerin çok düşük miktarda NOS2 eksprese ettikleri bulunmuştur. M2 hücrelerinin tek başına SAHA ile muamele edilmesi NOS2 ekspresyonunda herhangi bir fark oluşturmadığı izlenmiştir.

M2 hücrelerine tek başına LPS verilmesi NOS2 ekspresyonunu önemli ölçüde arttırmış, M2 hücrelerine LPS ve SAHA birlikte uygulandığında ise NOS2 ekspresyonunun yaklaşık olarak iki kat daha fazla arttığı görülmüş ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı hesaplanmıştır ($p=0,2$)

4.6.3.5. M2 makrofajlarında Arg1 mRNA ekspresyon farkları



Şekil 43. SAHA'nın M2 makrofajlarında Arg1 mRNA ekspresyonuna olan etkisi

Şekil 43'de görüldüğü gibi Kontrol, M1 ve M2 deney gruplarında Arg1 ekspresyonu ile karşılaştırıldığında en yüksek ekspresyon oranının M2 makrofajlarında olduğu bulunmuştur. Şekil 43'de gösterildiği gibi M2 makrofaj hücreleri tek başına SAHA ile muamele edildiğinde Arg1 ekspresyonu yaklaşık olarak %80 düştüğü gözlenmiştir, ancak yaptığımız istatistiksel analizler sonucunda bu azalmanın anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p=0,06$). M2 hücrelerinin tek başına LPS ile muamele edilmesi sonucunda Arg1 ekspresyonu önemli ölçüde artmıştır ancak M2 hücrelerinin LPS ve SAHA ile birlikte muamele edilmesi sonucunda ise ilginç olarak Arg1 ekspresyonunda büyük bir düşüş görülmüş ve bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,04$).

4.6.4. SAHA'nın M2 polarize makrofaj hücrelerinin miRNA ekspresyonlarına etkisi

4.6.4.1. M2 ve M2+SAHA deney grupları arasındaki miRNA ekspresyon farklılıkları

M2 makrofaj hücrelerine polarize edilmiş makrofaj hücrelerinde SAHA'nın miRNA'ların ekspresyonuna olan etkileri incelendiğinde SAHA ile muamele edilen M2 makrofaj hücreleri ile M2+SAHA makrofaj hücreleri arasında 101 miRNA ekspresyonunun 2 kat veya daha fazla değiştiği görülmüştür (Şekil 44). M2 makrofajlarına SAHA muamelesi sonucunda 28 miRNA ekspresyonu düşerken (Tablo 23) 73 miRNA ekspresyonu ise artmıştır (Tablo 24). M2 ve M2 + SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonları incelendiğinde SAHA muamelesi sonucunda ekspresyonu en fazla azalan miRNA'nın 3,02 katlık azalmayla mmu-mir-465c-1 olduğu, en yüksek oranla ekspresyonu artan miRNA'nın ise 6,64 katlık artış gösteren mmu-miR-146b-5p olduğu görülmüştür.

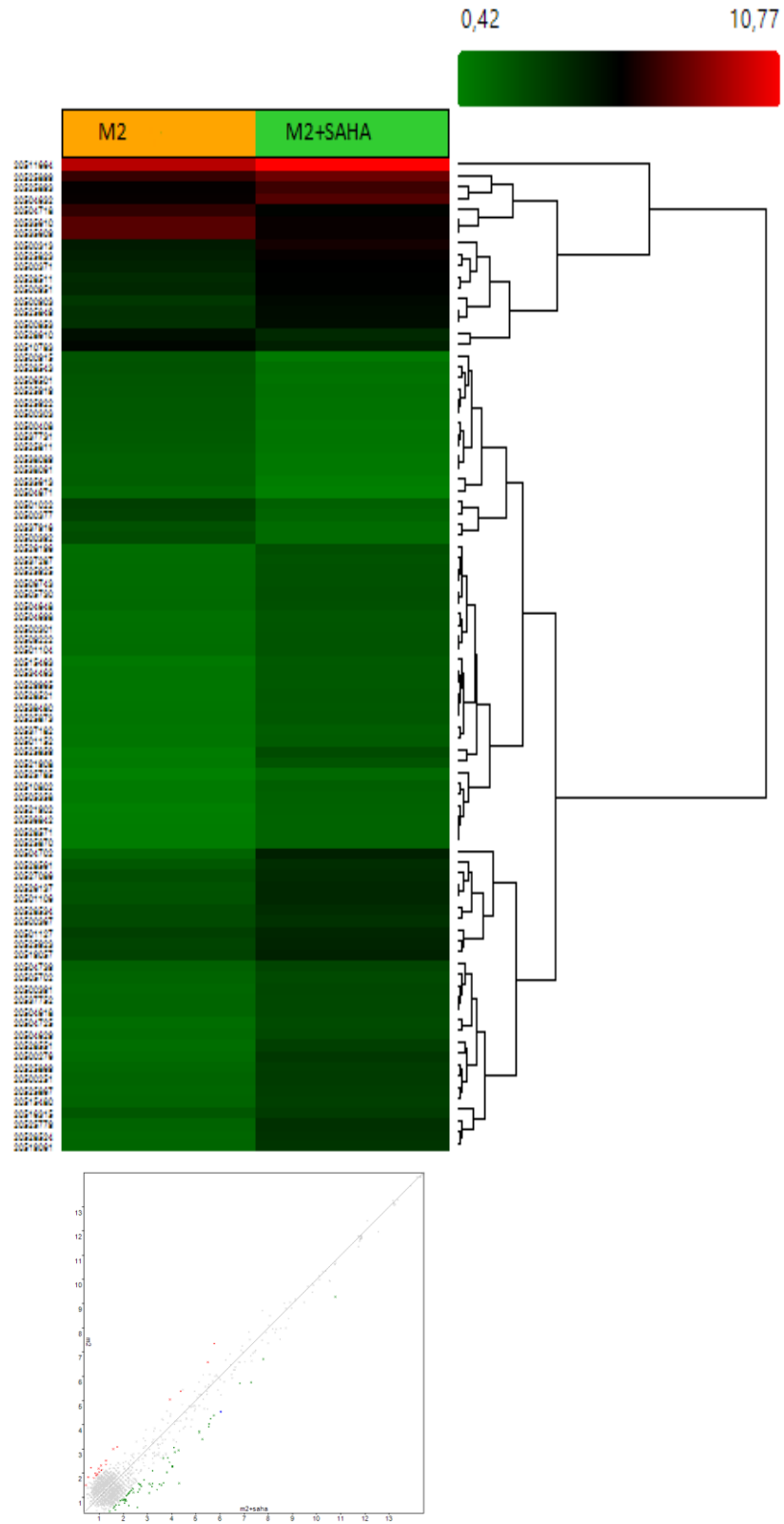
Tablo 23. M2-M2+ SAHA deney grupları arasında downregüle miRNA'lar ve değişim oranları

No	miRNA	Fark
1	mmu-mir-465c-1	3,02
2	mmu-mir-465c-2	3,02
3	mmu-miR-96-3p	2,93
4	mmu-miR-188-5p	2,66
5	mmu-miR-351-5p	2,54
6	mmu-mir-466b-3	2,43
7	mmu-miR-195a-3p	2,36
8	mmu-miR-7662-3p	2,36
9	mmu-miR-467e-5p	2,32
10	mmu-miR-203-3p	2,26
11	mmu-miR-7686-5p	2,14
12	mmu-miR-344d-2-5p	2,11
13	mmu-miR-455-3p	2,1
14	mmu-mir-6546	2,1

No	miRNA	Fark
15	mmu-miR-6978-5p	2,06
16	mmu-miR-150-5p	2,04
17	mmu-miR-6925-5p	2,04
18	mmu-miR-6979-3p	2,04
19	mmu-mir-6983	2,04
20	mmu-miR-1946b	2,01
21	mmu-mir-8099-1	2,01
22	mmu-mir-8099-2	2,01
23	mmu-miR-7028-5p	2
24	mmu-mir-188	2
25	mmu-mir-204	2
26	mmu-mir-743a	2
27	mmu-mir-669g	2
28	mmu-mir-7039	2

Tablo 24. M2-M2+ SAHA deney grupları arasında upregüle miRNA'lar ve değişim oranları

No	miRNA	Fark	No	miRNA	Fark
1	mmu-miR-146b-5p	-6,64	37	mmu-miR-6956-5p	-2,26
2	mmu-miR-132-3p	-4,22	38	mmu-miR-5617-5p	-2,26
3	mmu-miR-7653-5p	-4,21	39	mmu-miR-1249-5p	-2,24
4	mmu-miR-6909-5p	-4,21	40	mmu-miR-1983	-2,21
5	mmu-miR-6949-5p	-3,98	41	mmu-miR-8102	-2,18
6	mmu-miR-3968	-3,89	42	mmu-miR-3473a	-2,18
7	mmu-miR-7666-3p	-3,72	43	mmu-miR-711	-2,18
8	mmu-miR-29a-3p	-3,65	44	mmu-miR-3547-5p	-2,17
9	mmu-miR-7671-3p	-3,42	45	mmu-mir-182	-2,15
10	mmu-miR-7085-5p	-3,42	46	mmu-miR-6968-5p	-2,11
11	mmu-miR-6954-5p	-3,34	47	mmu-miR-149-5p	-2,11
12	mmu-miR-210-3p	-3,33	48	mmu-miR-574-5p	-2,1
13	mmu-miR-30b-5p	-3,14	49	mmu-miR-1192	-2,07
14	mmu-miR-6953-5p	-3,09	50	mmu-miR-692	-2,07
15	mmu-miR-7648-3p	-3,07	51	mmu-miR-1893	-2,06
16	mmu-miR-5620-5p	-2,93	52	mmu-miR-421-3p	-2,06
17	mmu-miR-762	-2,89	53	mmu-miR-211-3p	-2,05
18	mmu-miR-3104-5p	-2,86	54	mmu-miR-183-5p	-2,05
19	mmu-miR-328-5p	-2,86	55	mmu-mir-6236	-2,04
20	mmu-miR-2137	-2,81	56	mmu-mir-3970	-2,04
21	mmu-miR-155-5p	-2,8	57	mmu-miR-6981-5p	-2,04
22	mmu-miR-30c-5p	-2,78	58	mmu-miR-3059-5p	-2,04
23	mmu-miR-7235-5p	-2,73	59	mmu-miR-7b-3p	-2,04
24	mmu-miR-6944-5p	-2,68	60	mmu-miR-200c-3p	-2,04
25	mmu-miR-700-3p	-2,62	61	mmu-mir-5619	-2,01
26	mmu-miR-185-5p	-2,59	62	mmu-miR-7675-3p	-2,01
27	mmu-miR-6931-5p	-2,56	63	mmu-miR-6954-3p	-2,01
28	mmu-miR-378b	-2,54	64	mmu-miR-6912-5p	-2,01
29	mmu-miR-667-3p	-2,53	65	mmu-miR-742-5p	-2,01
30	mmu-miR-195a-5p	-2,44	66	mmu-mir-7222	-2
31	mmu-miR-3101-3p	-2,43	67	mmu-miR-6769b-5p	-2
32	mmu-miR-6980-5p	-2,4	68	mmu-let-7k	-2
33	mmu-miR-7036b-3p	-2,38	69	mmu-miR-3080-5p	-2
34	mmu-miR-7119-5p	-2,32	70	mmu-miR-19b-1-5p	-2
35	mmu-miR-7658-5p	-2,3	71	mmu-miR-92a-2-5p	-2
36	mmu-mir-7003	-2,26	72	mmu-miR-27a-5p	-2



Şekil 44. M2 ve M2+SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonlarına ait Scatter plot ve Hierarchical Clustering analizleri.(kırmızı renk tonu yüksek ekspresyonu, yeşil renk tonu düşük ekspresyonu göstermektedir)

M2 makrofaj hücrelerinin SAHA ile muamele edilmesi sonucunda ekspresyonları değişen miRNA'ların olası hücresel etkilerinin belirlenebilmesi için KEGG analizleri gerçekleştirilmiş ve tablo 25 de belirtilmiştir.

Tablo 25. M2 ve M2 +SAHA grubuna ait KEGG yolak analizi

No	KEGG yolak	p-value	Gen Sayısı	miRNA sayısı
1	ECM-Reseptör Etkileşimi	7,23E-24	52	48
2	Focal adhesion	8,88E+03	124	63
3	Adherens junction	1,29E+06	48	44
4	Endocytosis	2,86E+06	115	56
5	PI3K-Akt Sinyal Yolağı	3,79E+06	178	61
6	Notch Sinyal Yolağı	4,93E+05	35	32
7	AMPK Sinyal Yolağı	4,93E+05	73	54
8	MAPK Sinyal Yolağı	4,93E+05	132	62
9	Mucin type O-Glycan Biyosentezi	0.000235727263059	14	20
10	Aktin Hücre İskeltilinin Düzenlenmesi	0.000663078604426	109	62
11	Leukocyte transendothelial Migrasyonu	0.00181936161931	65	50

4.6.4.2 M2+LPS ve M2+SAHA+LPS deney grupları arasındaki miRNA ekspresyon farklılıkları

M2+LPS deney grubu hücrelerinde SAHA'nın miRNA'ların ekspresyonuna olan etkileri incelendiğinde SAHA ile muamele edilen M2+LPS makrofaj hücreleri ile M2+LPS+SAHA makrofaj hücreleri arasında 42 miRNA ekspresyonunun 2 kat veya daha fazla değiştiği görülmüştür (Şekil 45). M2+LPS makrofajlarına SAHA muamelesi sonucunda 15 miRNA ekspresyonu düşerken (Tablo 26) 27 miRNA ekspresyonu ise artmıştır (Tablo 27). M2+LPS ve M2 +LPS+ SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonları incelendiğinde SAHA muamelesi sonucunda ekspresyonu en fazla azalan miRNA'nın 7,71 katlık azalmayla mmu-miR-1946b olduğu, en yüksek oranla ekspresyonu artan miRNA'nın ise 4,13 katlık artış gösteren mmu-miR-744-5p olduğu görülmüştür.

Tablo 26. M2+LPS - M2+LPS+SAHA deney grupları arasında downregüle miRNA'lar ve değişim oranları

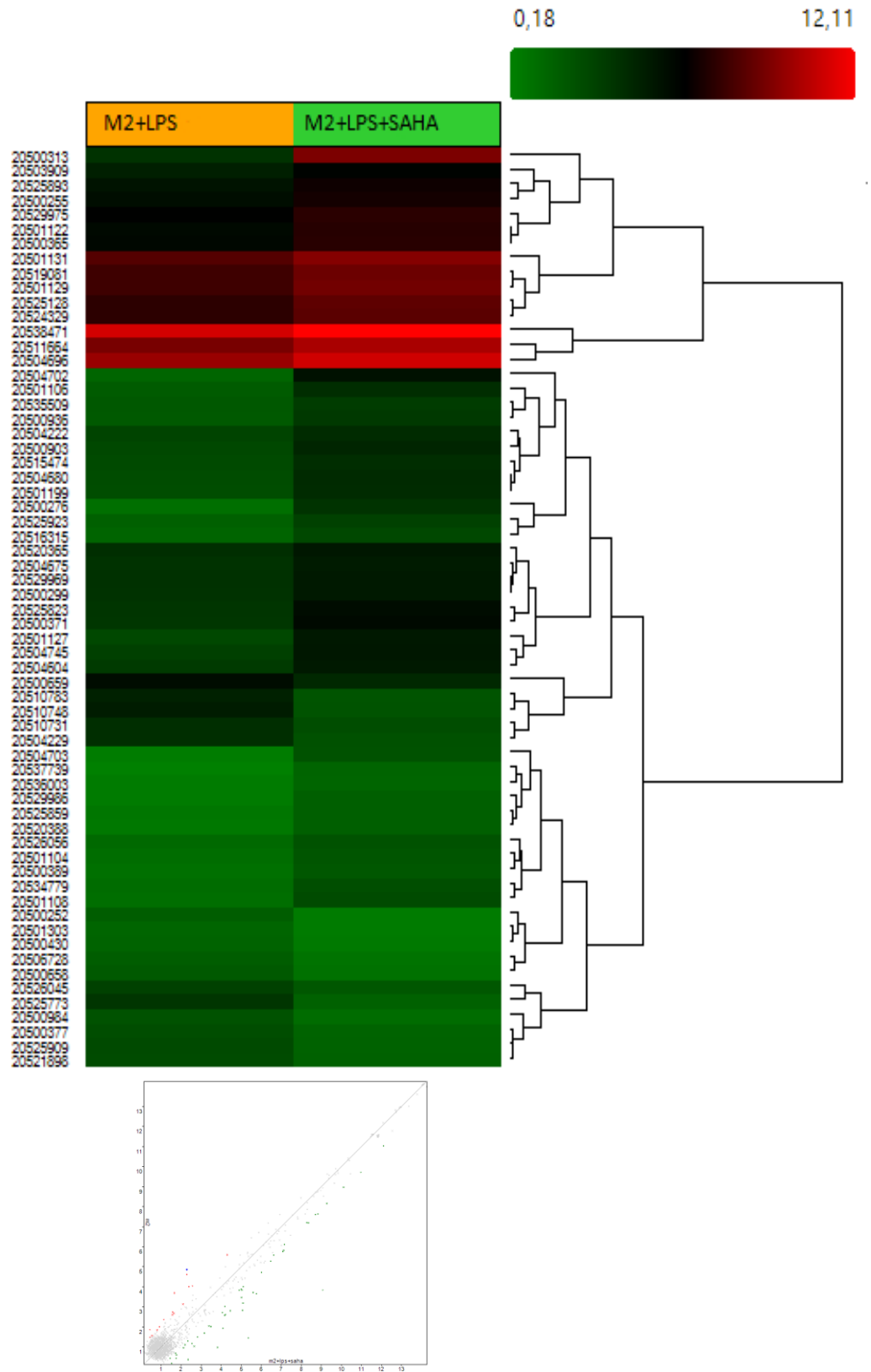
No	miRNA	Fark
1	mmu-miR-1946b	7,71
2	mmu-miR-1946a	6,64
3	mmu-miR-125a-5p	3,2
4	mmu-miR-6923-5p	3,18
5	mmu-miR-106a-5p	2,72
6	mmu-miR-1931	2,68
7	mmu-miR-328-5p	2,62
8	mmu-miR-6906-5p	2,57

No	miRNA	Fark
9	mmu-miR-877-5p	2,22
10	mmu-miR-5100	2,17
11	mmu-miR-467b-3p	2,13
12	mmu-miR-6769b-5p	2,12
13	mmu-mir-26a-1	2,07
14	mmu-miR-5625-5p	2,05
15	mmu-miR-423-5p	2,03

Tablo 27. M2+LPS - M2+LPS+SAHA deney grupları arasında upregüle miRNA'lar ve değişim oranları

No	miRNA	Fark
1	mmu-miR-346-3p	-2,01
2	mmu-miR-674-3p	-2,01
3	mmu-miR-532-5p	-2,02
4	mmu-miR-574-5p	-2,02
5	mmu-miR-712-5p	-2,03
6	mmu-miR-677-3p	-2,04
7	mmu-miR-680	-2,05
8	mmu-miR-378d	-2,12
9	mmu-miR-425-5p	-2,15
10	mmu-miR-361-5p	-2,21
11	mmu-miR-500-3p	-2,21
12	mmu-miR-690	-2,42
13	mmu-miR-3535	-2,45
14	mmu-miR-7033-5p	-2,46

No	miRNA	Fark
15	mmu-miR-1949	-2,47
16	mmu-miR-182-5p	-2,49
17	mmu-miR-7686-5p	-2,51
18	mmu-miR-211-3p	-2,6
19	mmu-miR-27b-3p	-2,66
20	mmu-miR-320-3p	-2,76
21	mmu-miR-151-3p	-2,89
22	mmu-mir-5133	-3,3
23	mmu-miR-139-5p	-3,37
24	mmu-miR-185-5p	-3,79
25	mmu-miR-7116-5p	-3,79
26	mmu-miR-181b-5p	-3,84
27	mmu-miR-744-5p	-4,13



Şekil 45. M2+LPS ve M2+LPS+ SAHA deney gruplarında miRNA ekspresyonlarına ait Scatter plot ve Hierarchical Clustering analizleri.

M2+LPS makrofaj hücrelerinin SAHA ile muamele edilmesi sonucunda ekspresyonları değişen miRNA'ların olası hücresel etkilerinin belirlenebilmesi için KEGG analizleri gerçekleştirilmiş ve tablo 28'de belirtilmiştir.

Tablo 28. M2+LPS ve M2+LPS+SAHA deney gruplarına ait KEGG yolak analizi

No	KEGG yolak	p-value	Gen Sayısı	miRNA sayısı
1	ECM-Reseptör Etkileşimi	8,16E-04	43	24
2	Yağ asiti Biyosentezi	2,76E-01	5	6
3	Focal adhesion	7,46E+04	103	35
4	Phosphatidylinositol Sinyal Yolağı	8,30E+05	43	26
5	ErbB signaling Sinyal Yolağı	1,57E+05	44	30
6	MAPK signaling Sinyal Yolağı	1,61E+06	116	36
7	PI3K-Akt signaling Sinyal Yolağı	2,98E+06	152	36
8	Wnt signaling Sinyal Yolağı	4,73E+06	69	31
9	Aktin Hücre İskeltinin Düzenlenmesi	5,86E+06	98	35
10	Endocytosis	7,86E+06	101	33
11	Adherens junction	0.000196922475657	39	23
12	AMPK Sinyal Yolağı	0.000301271346939	61	29

4.7. miRNA EKSPRESYONLARININ KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ

SAHA'nın miRNA ekspresyonlarına olan etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için hem aynı grup içinde hem de gruplar arasında ortak miRNA'lar araştırılmıştır.

Kontrol hücrelerinde;

Kontrol grubu hücrelerinde SAHA'nın miRNA ekspresyonuna olan etkilerinin araştırılabilmesi ve olası hücresel yollar üzerine etkilerinin araştırılabilmesi için kontrol, Kontrol+LPS, Kontrol+SAHA, Kontrol+SAHA+LPS hücrelerinde miRNA ekspresyonları karşılaştırılmıştır. Yapmış olduğumuz karşılaştırma sonucunda miRNA'lar beş ana başlık altında toplanmıştır, bunlar; LPS varlığında artan ancak SAHA varlığında düşen, LPS varlığında azalan ancak SAHA varlığında artan, sadece SAHA ve LPS varlığında artan, SAHA ve LPS varlığında azalan ve son olarak LPS ile ekspresyonu artan SAHA varlığında ekspresyonu pozitif korele şekilde artan miRNA'lar.

Kontrol grubunda bulunan miRNA'lar Tablo 29 da gösterildiği gibidir.

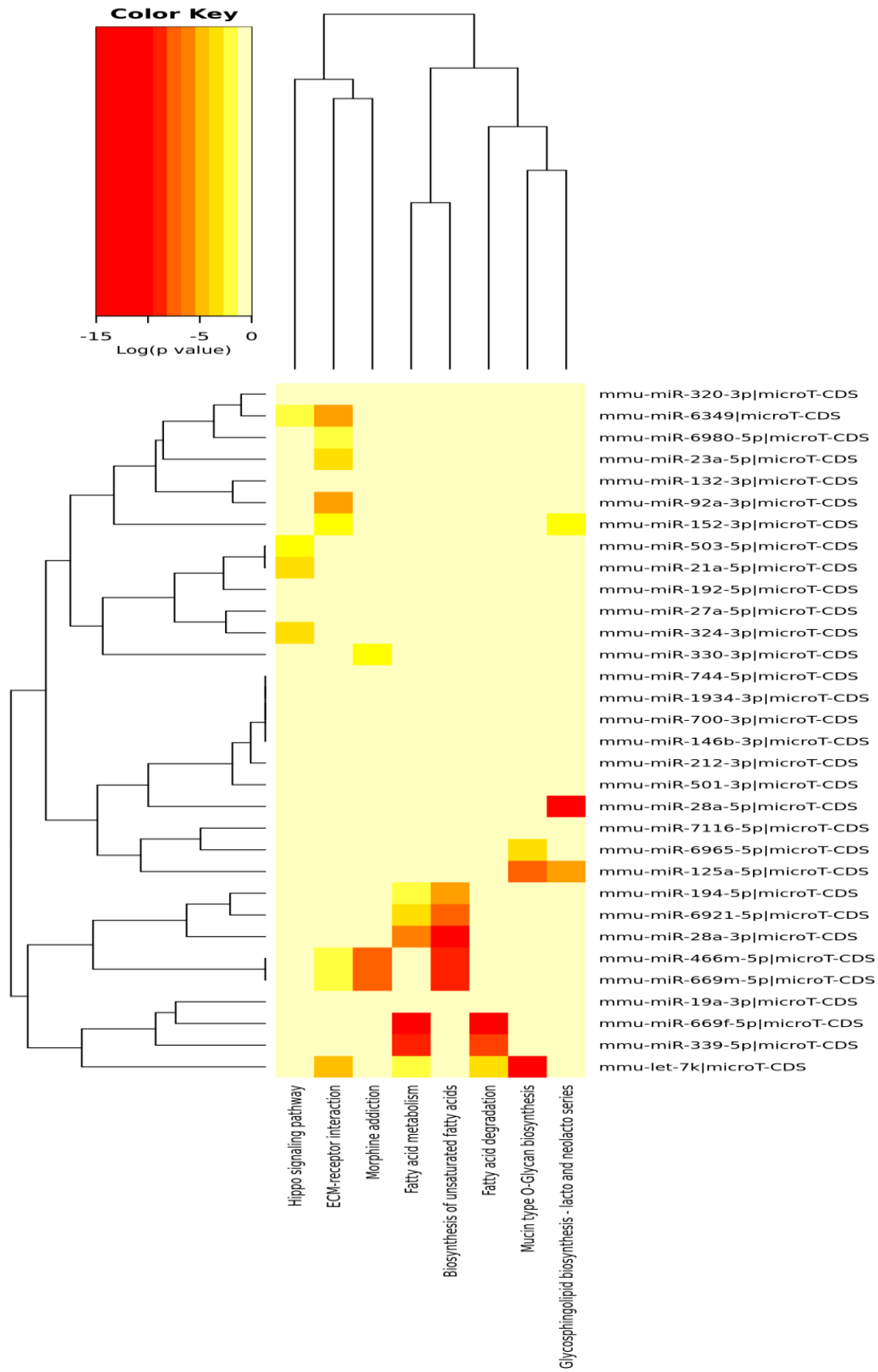
Tablo 29. Kontrol grubu hücrelerinde karşılaştırmalı miRNA ekspresyon analizi

Lps ile ekspresyonu artmış SAHA azaltmış	mmu-mir-125a-5p, mmu-mir-21a-5p
Lps ile ekspresyonu azalmış SAHA arttırmış	mmu-mir-23a-5p, mmu-mir-503-5p, mmu-mir-339-5p, mmu-mir-1934-3p, mmu-mir-7116-5p, mmu-mir-6921-5p, mmu-mir-6980-5p
Lps ile ekspresyonu artmış SAHA ile daha artmış	mmu-mir-194-5p, mmu-mir-132-3p, mmu-mir-501-3p, mmu-mir-212-3p, mmu-mir-28a-5p
SAHA ve lps ile ekspresyonu artmış	mmu-mir-324-3p , mmu-mir-744-5p , mmu-mir-27a-5p , mmu-mir-6965-5p , mmu-mir-320-3p , mmu-mir-6349 , mmu-mir-700-3p , mmu-mir-192-5p , mmu-mir-669f-5p , mmu-mir-669m-5p , mmu-mir-466m-5p , mmu-mir-152-3p , mmu-mir-146b-3p , mmu-mir-28a-3p , mmu-mir-330-3p
SAHA ve lps ile ekspresyonu azalmış	mmu-mir-19a-3p, mmu-mir-92a-3p

Yaptığımız karşılaştırmalı analiz sonucunda SAHA'nın kontrol grubu makrofaj hücrelerinde LPS uyarımına yanıtta farklılık oluşturmasını sağlayabilecek 32 miRNA belirlenmiştir. Bu miRNA'ların rol oynayabilecekleri olası hücresel yolların belirlenebilmesi amacıyla ortak yolda rol oynayan genleri hedefleyen miRNA'ların zenginleştirilmiş analizi olan (gen union) KEGG yolak analizi yapılmış ve sonuçlar Tablo 30' da analize ait heatmap analizi Şekil 46'da gösterilmiştir.

Tablo 30. Kontrol grubu hücrelerine ait KEGG yolak analizi

No	Kegg yolak	P değeri	Etkilenen gen sayısı	miRNA sayısı
1	ESM reseptör etkileşimi	6.776779222e-10	32	19
2	MAPK sinyal yolağı	1,15e-06	99	29
3	PI3K-AKT sinyal yolağı	0,0002	118	28
4	Endositoz	0,00072	78	25
5	TGF-beta sinyal yolağı	0,0018	35	24
6	TNF sinyal yolağı	0,026	31	22



Şekil 46. Kontrol grubuna ait ortak miRNA'lara ait Kegg yolak heatmap analizi (Diana.com)

M1 Makrofaj Hücrelerinde:

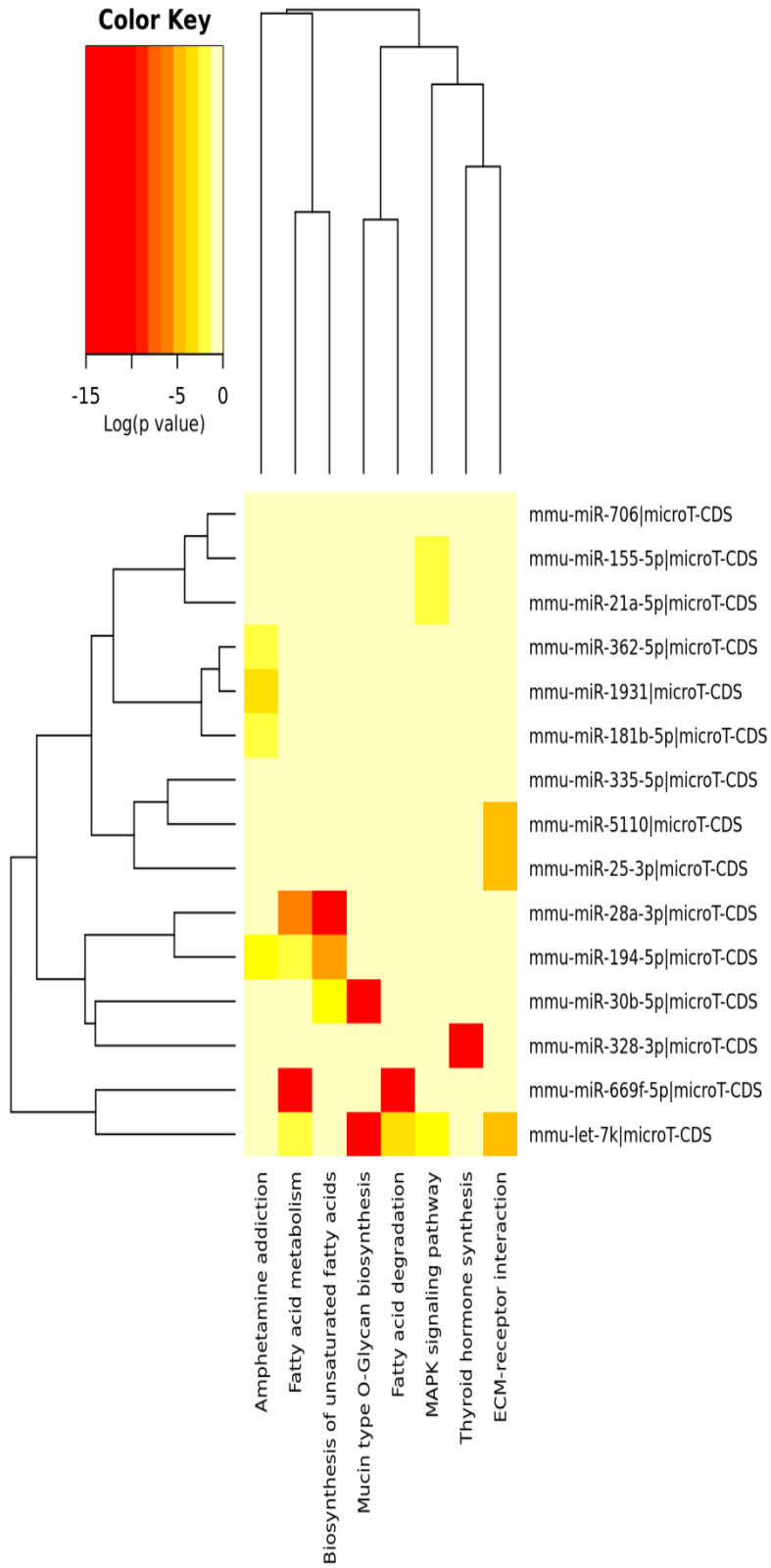
M1 makrofaj hücreleri deney grubunda SAHA'nın etkilerinin anlaşılabilmesi için yapılan karşılaştırmalı ekspresyon analizi sonucu ekspresyonu değişen miRNA'lar tablo 31 de gösterildiği gibi bulunmuştur. Ekspresyonu değişen miRNA'ların rol alabilecekleri hücresel yolların belirlendiği kegg yolak analizi Tablo 32'de ve heatmap analizi Şekil 47'de görüldüğü gibi bulunmuştur.

Tablo 31. M1 makrofajlarında SAHA'nın miRNA ekspresyonlarına olan etkilerinin karşılaştırmalı analizi..

SAHA ile ekspresyonu artmış	mmu-mir-28a-3p
saha ile ekspresyonu azalmış	mmu-mir-1931 , mmu-mir-5110 , mmu-mir-328-3p
LPS ile ekspresyonu düşerken SAHA ile Upregüle	mmu-mir-194-5p, mmu-mir-30b-5p, mmu-mir-25-3p, mmu-mir-let-7k, mmu-mir-669f-5p, mmu-mir-181b-5p, mmu-mir-362-5p, mmu-mir-155-5p, mmu-mir-378-5p, mmu-mir-21a-5p
saha ve lps ile ekspresyonu artmış	mmu-mir-335-5p, mmu-mir-706

Tablo 32. M1 makrofajlarında SAHA'nın ekspresyonunu değiştirdiği miRNA'ların rol oynaması muhtemel hücresel yollar(p≤0,05)

KEGG yolak	p-value	Gen Sayısı	miRNA Sayısı
Mucin type O-Glycan biyosentezi	8,18E-06	6	2
Yağ asiti Metabolizması	1,36E-03	4	4
Doymamış Yağ Asitlerinin Biyosentezi	6,17E-03	3	3
Yağ Asiti Degredasyonu	6,40E-02	2	2
Tiroit Hormon Sentezi	6,21E+00	1	1
ECM-Reseptör Etkileşimi	0.0001198511	11	3
Amphetamine Bağımlılığı	0.01977698	12	4
MAPK Sinyal Yolağı	0.03691617	31	3



Şekil 47. M1 makrofajlarında SAHA'nın ekspresyonunu değiştirdiği miRNA'ların rol oynaması muhtemel hücresel yollara ait Heatmap analizi ($p \leq 0,05$).

M2 Makrofajlarında:

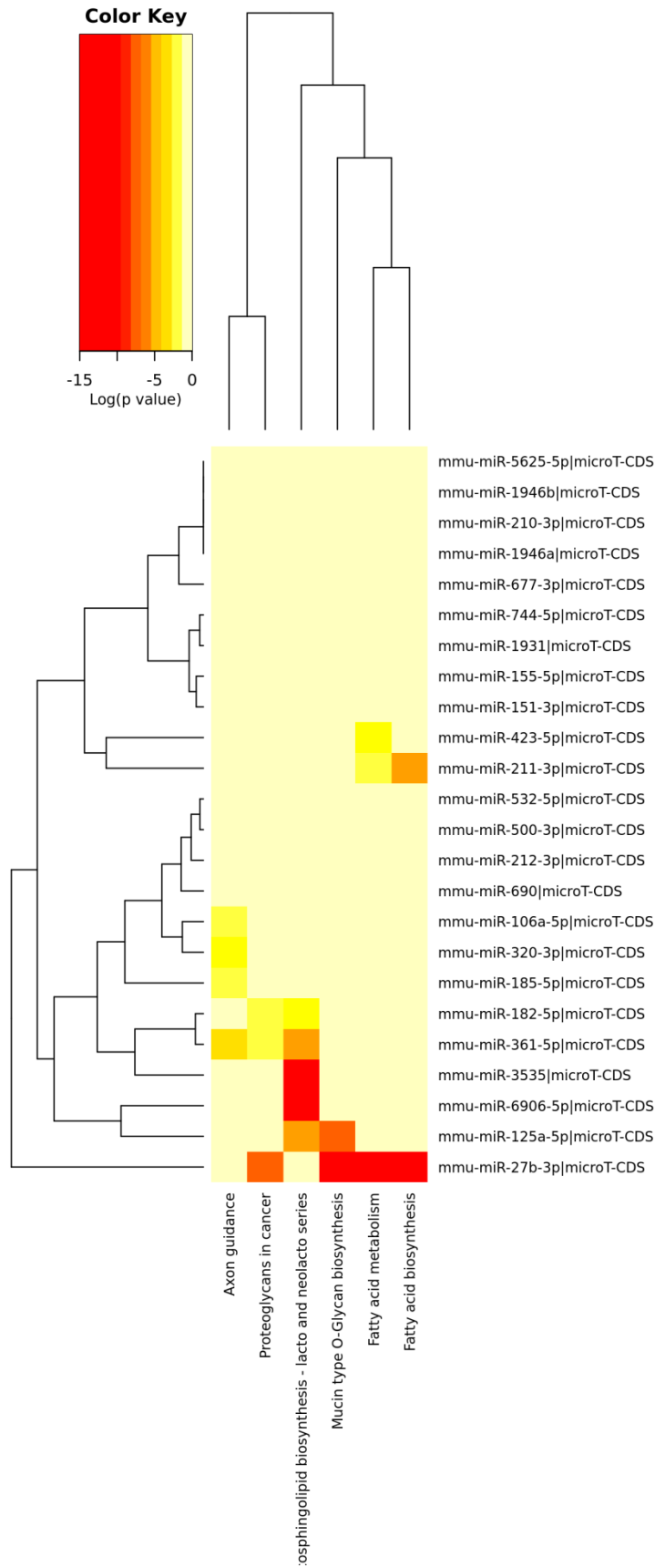
M2 makrofaj hücreleri deney grubunda SAHA'nın etkilerinin anlaşılabilmesi için yapılan karşılaştırmalı ekspresyon analizi sonucu ekspresyonu değişen miRNA'lar tablo 33 de gösterildiği gibi bulunmuştur. Ekspresyonu değişen miRNA'ların rol alabilecekleri hücresel yolların belirlendiği kegg yolak analizi Tablo 33'de ve Heatmap analizi şekil 48'de görüldüğü gibi bulunmuştur.

Tablo 33. M2 makrofajlarında SAHA'nın miRNA ekspresyonlarına olan etkilerinin karşılaştırmalı analizi.

SAHA ile ekspresyonu artan miRNA'lar	mmu-mir-211-3p, mmu-mir-185-5p
SAHA ile ekspresyonu azalan miRNA'lar	mmu-mir-1946b
LPS ile ekspresyonu düşerken SAHA ile ekspresyonu artan miRNA'lar	mmu-mir-423-5p, mmu-mir-125a-5p, mmu-mir-5625-5p
LPS ile ekspresyonu düşerken SAHA ile ekspresyonu artan miRNA'lar	mmu-mir-151-3p, mmu-mir-27b-3p
Hem LPS hem de SAHA ile ekspresyonu artan miRNA'lar	mmu-mir-212-3p, mmu-mir-155-5p, mmu-mir-210-3p, mmu-mir-29a-3
LPS ve SAHA birlikte uygulandığında ekspresyonu artan miRNA'lar	mmu-mir-677-3p, mmu-mir-3535, mmu-mir-690, mmu-mir-182-5p, mmu-mir-532-5p, mmu-mir-320-3p, mmu-mir-744-5p, mmu-mir-361-5p, mmu-mir-500-3p
LPS ve SAHA ile birlikte uygulandığında ekspresyonu azalan miRNA'lar	mmu-mir-1946a, mmu-mir-6906-5p, mmu-mir-1931, mmu-mir-106a-5p

Tablo 34. M2 makrofajlarında SAHA'nın ekspresyonunu değiştirdiği miRNA'ların rol oynaması muhtemel hücresel yollar (p≤0,05)

KEGG yolak	p-value	Gen Sayısı	miRNA Sayısı
Glycosphingolipid Biyosentezi	2,55E-09	3	5
Yağ Asiti Biyo Sentezi	8,07E-04	2	2
Mucin Tip O-Glycan Biyosentezi	0.0005920827	6	2
Yağ Asiti Metabolizması	0.005600895	4	3
Kanserde Proteoglykanlar	0.006041643	41	3
Axon Yönlendirilmesi	0.00662269	31	4



Şekil 48. M2 makrofajlarında SAHA'nın ekspresyonunu değiştirdiği miRNA'ların rol oynaması muhtemel hücresel yollara ait Heatmap analizi($p \leq 0,05$).

5. TARTIŞMA

Makrofajlar birçok dokuda görülen doğal immün sistem hücreleridir. Fizyolojik koşullarda makrofajlar trofik faktörlerin üretilmesi, yıkılan doku parçalarının uzaklaştırılması ve çevresel strese yanıt olarak oluşan kronik enflamasyonun önlenmesi gibi işlevleriyle doku homeostazın korunmasında rol oynamaktadırlar (P.J. Murray, 2011). Enfeksiyon veya doku yaralanması sonucu makrofajlar aktive olmakta ve mikrobiyal öldürmeyi de içeren konak savunma mekanizmasında görev yapmaktadırlar. Ayrıca aktive olan makrofajlar sitokin ve kemokin üretimi gerçekleştirerek diğer immün sistem hücreleriyle de etkileşime girmektedirler. Aktive makrofajlar mikro çevrelerinde bulunan patojenlere veya sitokinlere bağlı olarak çeşitli fenotipik fonksiyonlara sahip makrofajlara polarize olabilmektedirler (S. Gordon, 2010). Patojenler veya diğer immün sistem hücreleri tarafından üretilen sitokinler ile gerçekleşen makrofaj polarizasyonunu hangi sinyal yolları kullanılarak olduğu ortaya çıkarılmışsa da bu sinyallerin kompleks ve devam eden gen ekspresyonlarına nasıl etki ettiği ve makrofajların içinde buldukları mikroçevrede meydana gelen değişikliklerde makrofajların nasıl tekrar programlanabildikleri henüz tam anlamıyla anlaşılamamıştır (Lionel B.Ivashkiv, 2013).

En iyi karakterize edilen aktive makrofaj fenotipi klasik aktivasyon olarak bilinen ve M1 makrofajlar olarak da adlandırılan makrofajların interferon γ ve Toll like reseptör ligantları gibi mikrobiyal bir ürünle uyarılmış makrofajlardır. Diğer bir iyi karakterize edilmiş polarize makrofaj tipi ise alternatif makrofaj olarak bilinen ve M2 makrofaj olarak da adlandırılan makrofajlardır. Alternatif aktive olan makrofajlar T helper (TH2) hücrelerinden salınan interlökin 4 ve interlökin 13 sitokinleri tarafından uyarılmaları sonucu polarize olmaktadır. M1 makrofajları konak savunmasında ve patojenlerin temizlenmesinde görev alırken, M2 makrofajları enflamasyonun çözülmesinde ve doku tamiri gibi süreçlerde önemli görevler üstlenmektedir (Sica, 2012).

Sitokinler, sinyal yolları ve transkripsiyonel faktörlerinin makrofaj polarizasyonunda rol oynadıkları bilirse de günümüzde epigenetik değişikliklerin de makroaj polarizasyonun da önemli roller oynayabileceğini göstermişlerdir (Glass, 2010).

Suberoylanilide hydroxamic asit (SAHA), hydroxamic asit içeren hibrit polar moleküldür. SAHA özel olarak histon deasetilazlara bağlanarak inhibe olmalarını sağlamaktadır. SAHA bu etkisini sahip olduğu hidroksamik asit bölgesinin histon deasetilazların çinko içeren ceplerine bağlanmaları ile gerçekleştirirler (Finnin M S, 1999).

SAHA, histon deasetilaz sınıf 1 ve 3'ü güçlü bir şekilde inhibe etmekte ve histon 3 ve 4'ün hiperasetilasyonuna neden olmaktadır (Richon V M, 1998). Histon deasetilazların inhibisyonu sonucu asetilenmiş histon sayısında artış meydana gelmektedir. Bu hiperasetilasyon yaklaşık %1-2 lik genin ekspresyonunda artışa neden olmaktadır (Marks P A, 2001). Ekspresyonu artan genlerin içinde hücre döngüsü kinaz inhibitörü p21 ayrıca tümör hücrelerinde apoptozla ilişkili genlerin bulunması SAHA'nın anti tümör özelliğini oluşturmaktadır (Said T K, 2001). Daha önce yapılan birçok çalışma histon deasetilaz inhibitörlerinin tümör hücrelerinin in vitro koşullarda proliferasyonunu ayrıca in vivo deneylerde de tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir (Marks P, 2001).

Butter ve arkadaşları tarafından yapılan insan periferik kan monositlerinin LPS ile uyarımı üzerine SAHA'nın etkisi incelenmiş ve proenflamatuar sitokin seviyesini azalttığını görmüşlerdir (Butler L M, 2000). Ayrıca farelerde oluşturulan endotoksemi modelinde SAHA'nın in vivo ortamda da dolaşımdaki TNF- α , IL-1- β , IL-6 ve IFN- γ sitokin seviyelerini %50den fazla azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgu ile bir histon deasetilaz olan SAHA'nın anti enflamatuar bir etkiye sahip olduğunu ve bu etkisini anti tümör dozu olan 50-200 mg/kg/gün den daha az olan 10-50 mg/kg/gün konsantrasyonlarda gösterdiği bulunmuştur (Butler L M, 2000).

Bizim İn vitro ortamda gerçekleştirdiğimiz Raw 264.7 fare makrofaj hücreleri üzerine SAHA'nın hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelendiğinde özellikle 1 μ M üzerindeki SAHA konsantrasyonlarının hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. Ayrıca histon deasetilaz aktivasyonunun kolorimetrik olarak incelenmesi sonucunda 24. Saatte 1 μ M konsantrasyonun histon deasetilaz aktivasyonunu inhibe ettiğini ancak sürenin 24 saatin üzerine çıktığında bu etkinin giderek azaldığını ve özellikle 48. Saatte histon deasetilaz aktivitesinin yaklaşık olarak SAHA uygulanmayan kontrol hücreleri seviyesine ulaştığı görülmüştür.

Fagositler ve antijen sunan hücreler edinsel immün sistem ve doğal immün sistem arasında iletişimin kurulmasında görev yapan hücrelerdir. Makrofajlar ve dendritik hücreler intrasellüler ve ekstrasellüler patojenlere karşı Th1 TH17 yanıtının oluşturulmasını sağlayacak olan IL-12 ve IL-23 üreten doğal immün sistemin önemli hücreleridir (Korn T 2009). Histon deasetilaz inhibitörlerinin IL-12 ve IL-23 üretimi için potansiyel inhibitör oldukları daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Brogdon, 2007).

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada yüksek IL-12 salınım kabiliyeti klasik aktive makrofajlar (M1) için bir belirteç olarak kabul edilmiştir. Deney gruplarında SAHA'nın IL-12 salınımına olan etkileri incelendiğinde;

Daha önce hiçbir uyarı verilmemiş kontrol grubu hücrelerinin IL-12 salınımları incelendiğinde hücrelerin IL-12 salınımı gerçekleştirmediği görülmüştür. Kontrol hücrelerine tek başına SAHA muamelesinin yapılması IL-12 salınımında herhangi bir fark meydana getirmediği görülmüştür.

Kontrol grubu hücrelerine 24 saat boyunca tek başına LPS muamelesinin yapılması sonucunda IL-12 sitokin salınımında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın meydana geldiği görülmüştür. Hücreler SAHA ve LPS ile birlikte muamele edildiğinde ise IL-12 sitokin salınımının önemli ölçüde inhibe olduğu görülmüştür.

Kontrol hücrelerinde IL-12 salınımı için önemli bir inhibitör etkisi gösteren SAHA'nın daha önce polarize edilmiş makrofaj hücrelerinde de aynı etkiyi gösterip göstermediği araştırılmıştır. Daha önce M1 makrofaj fenotipine dönüştürülmüş hücrelerde IL-12 salınımı incelendiğinde hücrelerin sitokin salınımını gerçekleştirdiği görülmüştür. M1 hücreleri tek başına SAHA ile muamele edildiğinde ise IL-12 sitokin salınımında önemli bir değişikliğin olmadığı görülmüştür. Kontrol hücrelerinde LPS ile muamele sonucunda IL-12 salınımını güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülen SAHA'nın aynı etkiyi enflamatuvar makrofaj fenotipine dönüşmüş hücrelerde görülmemesi sürpriz bir sonuç olmuştur. M1 makrofajlarının tek başına LPS ile muamele edilmesi sonucunda IL-12 salınımının güçlü bir şekilde uyarıldığı görülmüştür. M1 makrofajlarının LPS ve SAHA ile birlikte muamele edilmesi sonucunda ise IL-12 salınımının sadece LPS uyarımı yapılan makrofaj hücrelerine oranla %45 oranında arttığı görülmüştür.

Daha önce alternatif aktive (M2) makrofaj fenotipine dönüştürülen hücrelerde SAHA'nın IL-12 salınımına olan etkileri incelendiğinde, M2 makrofajlarının çok düşük seviyede IL-12 salınımı gerçekleştirdiği görülmüştür. Yaptığımız çalışmada makrofaj polarizasyonunun kontrolünde M2 makrofaj fenotipinin belirleyicisi olarak IL-10 yüksek, IL-12 düşük sitokin salınımının olması bir belirleyici olarak kullanılmıştır. M2 hücrelerinin tek başına SAHA ile muamele edilmesi sonucunda IL-12 sitokin seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişimin olmadığı saptanmıştır. M2 makrofajlarının tek başına LPS ile muamele edilmesi sonucunda ise IL-12 sitokin seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür. M2 makrofaj hücrelerinin LPS ve SAHA ile birlikte muamele edildiğinde ise IL-12 sitokin salınımında düşüş olduğu, ancak bu düşüş kontrol hücrelerinde SAHA'nın oluşturduğu güçlü inhibitör etkisinden daha zayıf bir inhibisyon olduğu saptanmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalar histon asetilasyonunun TLR uyarımına cevap olarak IL-12p40 promotor aktivasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Sun, 2004). Konrad ve

arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada SAHA'nın dahil olduğu histon deasetilaz inhibitörlerinin devamlı histon H4 asetilasyonunda artışa neden olduğunu ve histon H4 asetilasyonunun LPS ile indüklenen genlerin ekspresyonunun aktivasyonu ile korelasyon gösterdiği ve HDAC inhibitörlerinin TLR ile uyarılan IL-12p40 ekspresyonunu zayıflattığını göstermişlerdir (Konrad, 2007). Yaptığımız çalışma sonucunda SAHA'nın IL-12 sitokin salınımları üzerine olan etkilerinin kontrol ve polarize makrofaj hücrelerinde farklı sonuçlar oluşturduğu belirlenmiştir. Kontrol hücrelerinde elde ettiğimiz sonuçlar Konrad ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmanın sonuçları ile örtüşse de polarize makrofajlarda IL-12 salınımlarında aynı etkiyi göstermemiştir. SAHA'nın polarize makrofajlarda meydana getirdiği bu değişiklikler farklı hücresel yolların SAHA muamelesinden etkilendiği ve farklı sonuçların çıkmasına neden olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

IL-10 makrofajlar tarafından salınan ve hedef hücreler üzerinde anti-enflamatuvar etki gösteren başlıca sitokindir. Ancak IL-10'un etkisini nasıl gerçekleştirdiği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Minton, 2017). Yapmış olduğumuz çalışmada IL-12 düşük, IL-10 yüksek sitokin salınımı alternatif makrofaj (M2) fenotipi için bir belirteç olarak kabul edilmiştir. Oluşturduğumuz deney gruplarında IL-10 sitokin salınımları incelendiğinde,

Herhangi bir uyarı verilmemiş kontrol hücrelerinde IL-10 sitokin salınımının gerçekleştiği görülmüştür. Kontrol grubu hücrelerine tek başına SAHA muamelesinin IL-10 sitokin salınımlarında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir artışa neden olmadığı görülmüştür. Kontrol grubu hücrelerine tek başına LPS uygulanması IL-10 salınımını arttırdığı görülmüş ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Kontrol grubu hücrelerine LPS ve SAHA birlikte uygulandığında IL-10 sitokin salınımlarında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişimin olmadığı görülmüştür.

Daha önce M1 makrofaj fenotipine dönüştürülen hücreler IL-12 yüksek IL-10 düşük sitokin salınımı fenotipine sahiptirler. M1 hücreleri tek başına SAHA ile muamele edildiğinde sitokin salınımlarında azalmanın meydana geldiği bulunmuş ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. M1 hücrelerine tek başına LPS muamelesinin yapılması IL-10 salınımlarında artışa neden olmuştur. M1 hücrelerine LPS ve SAHA birlikte uygulandığında IL-10 sitokin salınımı sadece LPS verilen hücrelere oranla azalmanın olduğu görülse de bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

IL-10 sitokin salınımları incelenen kontrol, M1 ve M2 hücreleri arasında M2 hücreleri en yüksek IL-10 sitokin salınımına sahip hücreler olarak bulunmuştur. M2 hücrelerine tek başına SAHA muamelesinin yapılması IL-10 sitokin salınımlarında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. M2 hücrelerine tek başına LPS

muamelesi IL-10 sitokin salınımını arttırdığı görülmüş, M2 hücrelerine LPS ve SAHA birlikte uygulandığında ise sadece LPS verilen M2 hücrelerine oranla sitokin salınımında düşüş olduğu görülse de bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur.

IL-10 sitokin salınımı üzerine yaptığımız deneyler sonucu SAHA'nın hiçbir deney grubunda sitokin salınımını istatistiksel olarak değiştirmedığı görülmüştür. Ancak 2016 yılında Fang ve arkadaşlarının farelere yapmış oldukları çalışmada SAHA uygulanmasının ardından serumda IL-10 miktarının arttığını ayrıca SAHA'nın T hücre alt tiplerinin oranlarında farklılık yarattığını ve Th1 hücrelerinin azalırken Treg hücrelerinin sayılarında artış olduğunu belirlemişlerdir (Fang, 2016). Serumda IL-10 miktarının artışının nedeni olarak Treg hücrelerin oranındaki artış ile açıklanabilir. Bu sonuç bize SAHA'nın makrofajlarda IL-10 salınımına istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı ancak sistemik olarak diğer hücreleri etkileyerek IL-10 salınımını arttırdığını göstermektedir.

Fenotipik olarak M1 makrofajları yüzeylerinde yüksek seviyede majör histokompatibilite kompleksi sınıf II(MHC II) ve kostimülatör faktörler CD80 ve CD86 ifade etmektedirler (Arnold, 2014). Ayrıca özellikle farelerde IL-4 ile muamele edilen ve M2 makrofaj fenotipine dönüştürülen makrofajların yüksek seviyede Mannoze reseptörü (CD206) ifade ettiği gösterilmiştir (Gordon, 2005). RAW 264.7 fare makrofaj hücrelerinde flow sitometri yöntemi ile CD86 ve CD206 hücre yüzey belirteçleri incelendiğinde, herhangi bir uyarı verilmemiş kontrol hücrelerinin düşük seviyede CD86 ekspresyonu gösterdiği ancak CD206 ekspresyonunu %5 oranında gösterdiği görülmüştür. Kontrol hücrelerine tek başına SAHA ile muamele edilmesi sonucunda hücrelerdeki CD86 ifadesi son derece artarak %96 seviyesine yükselmiştir. CD 206 seviyesinde ise önemli bir değişiklik olmayıp %1 seviyesinde ekspresyon görülmüştür. Kontrol grubu makrofaj hücrelerine tek başına LPS uygulanması CD86 ifadesini arttırarak %96 seviyesinde bir ekspresyona neden olmuş CD206 seviyesi ise %1 olarak belirlenmiştir. Hücrelere LPS ve SAHA birlikte uygulandığında ise CD86 seviyesi sadece LPS verilen hücrelere oranla kısmen düşük olan %82 seviyesinde ölçülmüş ancak hücrelerin büyük oranda CD86 ekspresyonu gerçekleştirdiği görülmüştür. CD206 seviyesinde ise herhangi bir fark olmayıp %1 olarak ölçülmüştür.

M1 makrofajlarında hücre yüzey belirteçleri incelendiğinde ise M1 makrofajlarının yüksek seviyede CD86 hücre yüzey belirteci ifade ettiği CD206 ekspresyonunu ise gerçekleştirmedığı görülmüştür. M1 hücrelerine tek başına SAHA verilmesi zaten yüksek seviyede olan CD86 oranında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı ve yüksek seviyede ekspresyonun devam ettiği görülmüştür. CD 206 ekspresyonunun ise olmadığı görülmüştür. M1 hücrelerine tek başına LPS muamelesi ve LPS ile birlikte SAHA muamelesi M1

hücrelerinde yüksek seviyede CD86 ekspresyonunun olmasını sağlamış ancak CD206 ekspresyonuna herhangi bir etki göstermemiştir.

SAHA'nın hücre yüzey belirteçlerine en dramatik etkiyi M2 makrofaj hücrelerinde göstermiştir. Yaptığımız flow sitometri analizleri sonucunda M2 hücrelerinin yüksek oranda CD206 ve düşük seviyede CD86 hücre yüzey belirteci ifadesini gerçekleştirdiği görülmüştür. M2 hücrelerine tek başına SAHA muamelesinin yapılması hücrelerin yüksek seviyede hem CD86 hem de CD206 ekspresyonuna neden tespit edilmiştir. M2 hücrelerine tek başına LPS uygulanması hücrelerde tek başına SAHA verilen gruba benzer bir şekilde yüksek seviyede hem CD86 hem de CD206 ifadesine sahip hücrelerin oluşmasını sağlamıştır. İlginç olarak M2 hücrelerine LPS ve SAHA birlikte uygulandığında CD206 ifadesi son derece düşmüş ve %20 seviyesine gerilemiştir. CD86 seviyesi ise %87 olarak ölçülmüştür.

Hücre yüzey belirteçlerinde görülen bu farklılıklar SAHA'nın farklı fenotipe sahip hücrelerde farklı etkiler ortaya çıkardığını göstermektedir. M2 hücrelerinde LPS ile birlikte SAHA muamelesinin CD206 ifadesini son derece düşürmesi ise SAHA'nın özellikle M2 fenotipine sahip hücrelerde bu fenotipin gerilemesine neden olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

TNF- α enflamatuvar hastalıkların patogeneğinde rol oynayan en önemli makrofaj kaynaklı sitokinlerden biridir (Taylor ve Williams, 2015). Yaptığımız çalışmada RAW264.7 fare makrofaj hücrelerinin LPS ile muamelesi sonucunda TNF- α 'nın hem sitokin salınımı hem de mRNA gen ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Tek başına SAHA muamelesi TNF- α ekspresyonuna herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüş ancak LPS ve SAHA hücrelere birlikte uygulandığında TNF- α seviyesinde hem sitokin salınımı hem de gen ekspresyonunda sadece LPS uygulanan hücrelere oranla düşüş olduğu saptanmış ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

SAHA'nın herhangi bir uyarı almamış makrofaj hücrelerinde TNF- α salınımına olan etkileri incelendikten sonra daha önce uyarı alarak farklı fenotiplere (M1 ve M2) dönüştürülen hücrelere olan etkileri incelenmiştir.

Klasik aktive(M1) makrofajlarında TNF- α seviyesi incelendiğinde bu fenotipteki hücrelerin yüksek seviyede TNF- α salınımı gerçekleştirdiği hem protein seviyesinde hem de gen ekspresyonu düzeyinde gösterilmiştir. M1 makrofajlarına tek başına SAHA uygulanması, hücrelerdeki TNF- α salınımını düşürdüğü görülmüş, ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Gen ekspresyonu olarak incelendiğinde ise M1 makrofajlarına tek

başına SAHA uygulanmasının TNF- α gen ekspresyonunda önemli bir değişime neden olmadığı görülmüştür.

M1 makrofajlarının tek başına LPS ile muamele edilmesi hücrelerdeki TNF- α salınımını ve gen ekspresyonunu artırmıştır. M1 makrofajları LPS ve SAHA ile birlikte muamele edildiğinde TNF- α sitokin salınımının düştüğü görülmüştür, ancak kontrol hücrelerinde olduğu gibi bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir. mRNA düzeyinde TNF- α gen ekspresyonuna olan etkisi incelendiğinde SAHA'nın yaklaşık iki katlık bir ekspresyon azalmasına neden olduğu görülmüştür.

SAHA'nın alternatif aktive M2 makrofajlarında TNF- α salınımı incelendiğinde, M2 makrofajlarının hem sitokin salınımı hem de mRNA ekspresyonu olarak incelendiğinde TNF- α ifadesinin olmadığı görülmüştür. M2 makrofajlarına tek başına SAHA uygulandığında sitokin seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artışın olduğu görülmüştür. TNF- α gen ekspresyon farkı incelendiğinde tek başına SAHA muamelesinin yaklaşık 6 katlık bir artışa neden olduğu saptanmıştır.

M2 makrofajları tek başına LPS ile muamele edildiğinde TNF- α sitokin seviyesinde ve gen ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış meydana gelmiştir. M2 makrofajları LPS ve SAHA ile birlikte muamele edildiğinde ise TNF- α sitokin salınımında sadece LPS muamelesi yapılan M2 hücrelerine oranla yaklaşık %30 oranında bir azalmanın meydana geldiği görülmüş ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. TNF- α gen ekspresyonu incelendiğinde ise SAHA ile LPS'nin birlikte muamelesi sonucunda sadece LPS ile muamele edilen hücrelere oranla gen ifadesinin yaklaşık 2 kat azalma meydana geldiği görülmüştür.

Roger T. ve arkadaşları tarafından geniş spektrumlu histon deasetilaz inhibitörlerinin enfeksiyonda doğal immün sistemin TLR sinyallenmesine olan etkilerinin makrofaj ve dendritik hücrelerde araştırıldığı çalışmada bizim yaptığımız çalışma ile benzer şekilde TSA ve SAHA muamelesi ile LPS nin makrofaj hücrelerine birlikte uygulandığında TNF- α ekspresyonunda önemli bir değişimin meydana gelmediğini göstermişlerdir. Ancak hücreler LPS yerine Pam3CSK4, E coli, and S aureus gibi başka mikrobiyal ürünler ile uyarıldığında ise histon deasetilaz inhibitörlerinin TNF- α ekspresyonlarını güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür (Roger T. 2011). Ancak histon deasetilaz inhibitörlerinin proenflamatuar sitokin salınımlarına olan etkilerinin hangi mekanizma ile gerçekleştirdiği henüz tam olarak anlaşılammıştır (Zlatka, 2018). Örneğin Takada ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma sonucunda histon deasetilaz inhibitörlerinin NF-kB transkripsiyon faktörünün hedef genin promotoruna bağlanmada herhangi bir etkisinin bulunmadığı ancak I κ B α kinaz

aktivasyonuna, I κ B α fosforilasyonuna ve P65'in nükleusa translokasyonuna etki ettiğini göstermişlerdir (Takada, 2006). Bizim elde ettiğimiz sonuçlar literatürle uyumlu olsa da polarize makrofajlarda farklı sonuçların elde edilmesi histon deasetilaz inhibitörlerinin TNF- α ekspresyonuna olan etkilerinin hücre tipine ve uyarana bağlı olarak farklılık ortaya çıkarabileceğini göstermiştir.

Kontrol hücreleri üzerine SAHA'nın IL-1 β salınımına olan etkileri incelendiğinde; SAHA tek başına makrofaj hücrelerine uygulandığında IL-1 β sitokin salınımında herhangi bir fark oluşturmadığı görülmüştür. Ancak makrofaj hücrelerine SAHA, LPS ile birlikte verildiğinde IL-1 β sitokin salınımının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Polarize makrofajlarda incelendiğinde M1 makrofajları tek başına SAHA ile muamele edildiğinde M1 makrofajlarında IL-1 β sitokin salınımlarında önemli bir değişikliğin olmadığı görülmüştür. Benzer şekilde LPS ile muamele edilen M1 makrofajları ile LPS ve SAHA birlikte muamele edilen makrofajlardaki IL-1 β sitokin salınımı karşılaştırıldığında anlamlı bir değişikliğin olmadığı saptanmışken M2 makrofajlarında ise LPS ile birlikte SAHA muamelesinin IL-1 β salınımını güçlü bir şekilde arttırdığı görülmüştür. IL-1 β salınımı için genellikle aktif kaspaz-1 tarafından pro- IL-1 β 'nin kesilmesini sağlayacak bir inflamazom aktivasyonu gerektirmektedir (Schroder, 2010). Ancak HDACi tarafından inflamazom bağımsız olarak IL-1 β olgunlaştırılması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Hildebrand, 2014). Birçok enflamatuvar hastalık sürecinde IL-1 β 'nin rolü göz önüne alındığında inflamazomların histon deasetilazlarla olan olası etkileşimlerinin araştırılması ve IL-1 β seviyesindeki bu değişimin ortaya çıkartılması için daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Bir pro-enflamatuvar sitokin olan IL-6 salınımı incelendiğinde kontrol grubu hücrelerinin IL-6 salınımını çok düşük miktarlarda gerçekleştirdiği görülmektedir. Kontrol grubu hücrelere tek başına SAHA muamelesinin yapılması hücrelerin IL-6 sitokin salınımlarında istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermediği bulunmuştur. Kontrol grubu hücrelere tek başına LPS uygulanması IL-6 sitokin salınımını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmüştür. Hücrelere LPS ve SAHA birlikte uygulandığında IL-6 sitokin salınımının düşmüş ve bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

M1 makrofajlarında IL-6 sitokin salınımı incelendiğinde M1 grubu hücrelerin yüksek seviyede IL-6 sitokin salınımı yapma kabiliyetinde oldukları görülmüştür. M1 makrofajlarına tek başına SAHA muamelesinin yapılması IL-6 sitokin salınımını önemli ölçüde düşürdüğü görülmüştür ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. M1 makrofajlarına tek başına LPS uygulanması IL-6 salınımını istatistiksel olarak anlamlı bir

şekilde arttırmıştır. Yine M1 makrofajlarına LPS ve SAHA birlikte uygulandığında IL-6 salınımı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürmüştür.

M2 makrofajlarında IL-6 seviyesi incelendiğinde hücrelerin düşük seviyede sitokin salınımı gerçekleştirdiği görülmüştür. M2 makrofaj hücrelerine tek başına SAHA muamelesinin yapılması IL-6 sitokin salınımında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. M2 hücrelerine tek başına LPS muamelesinin yapılması hücrelerde IL-6 sitokin salınımını önemli ölçüde artırmış ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hücreler LPS ve SAHA ile birlikte muamele edildiğinde ise sadece LPS ile muamele edilen gruba oranla IL-6 sitokin salınımlarında azalmanın meydana geldiği bulunmuş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı olduğu hesaplanmıştır.

Tüm deney gruplarında SAHA muamelesi IL-6 sitokin salınımını anlamlı bir şekilde düşürmüştür. Halili ve arkadaşları tarafından HDAC inhibitörlerinin kemik iliği kökenli makrofaj hücrelerinin LPS uyarımına olan cevaba etkilerini inceledikleri çalışmada IL-6 seviyesinin SAHA'yı da içeren geniş spektrumlu HDAC inhibitörlerince anlamlı bir şekilde düşürüldüğü gösterilmiştir (Halili, 2010). Yapmış olduğumuz çalışma ile korelasyon gösteren çalışmada daha önce uyarı almamış ve bizim çalışmamızda kontrol grubu olarak belirlediğimiz hücreler kullanılmıştır. Bizim yapmış olduğumuz çalışmamızda SAHA'nın IL-6 salınımına olan etkisini polarize makrofaj hücrelerinde de benzer şekilde oluşturduğu gösterilmiştir.

Siklooksijenaz(COX) prostaglandin-endoperoksit sentetaz olarakta bilinen enzim ailesidir. COX inhibisyonu enflamasyonun semptomlarının ve ağrının giderilmesinde farmakolojik olarak kullanılmaktadır. Dikkat çekici olarak COX izoformu olan COX2 meme ve bağırsak kanserlerinde düşük sağ kalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir. COX2 mRNA ekspresyon analizleri incelendiğinde, kontrol grubu hücrelerinin çok düşük seviyede COX2 ekspresyonu ettikleri görülmüştür. Kontrol grubu hücrelerine tek başına SAHA muamelesinin yapılması hücrelerde COX2 ekspresyonunda herhangi bir farklılığa neden olmadığı görülmüştür. Hücrelerin tek başına LPS ile muamele edilmesi sonucunda ise hücreler güçlü bir şekilde COX2 ekspresyonu gerçekleştirdikleri görülmüştür. Hücrelere LPS ile SAHA birlikte uygulandığında ise COX2 ekspresyonunun sadece LPS ile muamele edilen hücrelere oranla daha güçlü bir şekilde ifade edildiği görülmüştür.

M1 hücrelerinde COX2 ekspresyonu incelendiğinde hücrelerin güçlü bir şekilde COX2 ekspresyonunu gerçekleştirdiği görülmüştür. M1 hücrelerine tek başına SAHA uygulanması COX2 ifadesinde önemli bir fark yaratmadığı görülmüştür. M1 hücrelerine sadece LPS uygulandığında hücrelerin COX2 ekspresyonu M1 hücrelerine oranla yaklaşık iki katlık bir

artış göstermiştir. M1 hücrelerine LPS ve SAHA birlikte uygulandığında ise COX2 ekspresyonunun son derece arttığı bulunmuştur.

M2 hücrelerinde COX2 ekspresyonu incelendiğinde M2 hücrelerinin çok düşük seviyede COX2 ekspresyonu gerçekleştirdiği görülmüştür. M2 hücrelerine tek başına SAHA uygulanması COX2 ekspresyonunu yaklaşık altı kat arttırmıştır. M2 hücrelerine tek başına LPS uygulanması COX2 ekspresyonunu önemli ölçüde artırırken LPS ve SAHA'nın birlikte hücrelere uygulanması ekspresyonda önemli bir farka neden olmamıştır.

Zhe ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yayınlanan makalede IL-1 β muamelesinin makrofajlarda COX2 ifadesinin arttırdığı gösterilmiştir (Zhe ve ark 2011). SAHA'nın LPS ile birlikte uygulandığında IL-1 β seviyesini arttırdığının gösterilmesi COX2 ifadesindeki artışın SAHA yüzünden mi yoksa ortamda bulunan IL-1 β yüzünden mi sorusunu akla getirmektedir. M1 ve kontrol hücre hatlarında nedenin ortamda bulunan IL-1 β yüzünden gerçekleşebileceği akla gelse de özellikle M2 hücrelerinde artan IL-1 β ifadesine rağmen LPS ve SAHA'nın beraber uygulandığı deney grubunda COX2 ifadesinde bir değişiklik görülmemiştir. M2 makrofajlarındaki bu farklılık hücrelerin anti enflamatuvar fenotipleri ile ilgi olabileceği düşünülse de daha kapsamlı çalışmalarla bu etkinin nedeninin araştırılması gerekmektedir.

Makrofaj hücrelerinin diğer immün sistem hücreleri ile haberleşmesini sağlayan kemokinlerden ve bizim deneylerimizde M1 makrofaj belirteci olarak kullandığımız CXCL9 kemokininin mRNA ekspresyonu incelendiğinde, kontrol hücrelerinde ve M2 hücrelerinde CXCL9 ekspresyonunun olmadığı görülmüştür. M1 hücrelerinin ise güçlü bir şekilde CXCL9 ekspresyonunu gerçekleştirdikleri görülmüştür. Tek başına SAHA ile muamele edilen hücrelerde CXCL9 ekspresyonunun M1 hücrelerine oranla yaklaşık olarak 27 kat artış gösterdiği saptanmıştır. M1 hücrelerine tek başına LPS verilmesi CXCL9 ekspresyonunda herhangi bir farklılık yaratmadığı görülmüştür. LPS ve SAHA birlikte uygulandığında ise hücrelerde CXCL9 ekspresyonunun M1 hücrelerine oranla yaklaşık olarak 54 kat artış gösterdiği bulunmuştur.

CXCL9 gibi kemokinler, T hücrelerin enflamatuvar bölgesinde sayıca artışına neden olarak ve T hücre sitokinleri ve enflamatuvar faktörler ile diğer immün sistem hücrelerinin bölgeye toplanmalarına neden olmaktadır. Tümör mikroçevresinde T hücre sayısında artışın meydana gelmesi tümör hücrelerinin T hücre aracılı öldürülmesiyle sonuçlanmaktadır (Hong Zheng, 2016). Yapmış olduğumuz çalışmada SAHA'nın M1 hücrelerinde CXCL9 kemokin ekspresyonuna olan etkisinin araştırılabilmesi için daha kapsamlı deneylerin yapılmasına ihtiyaç vardır.

İndüklenabilir nitrik oksit sentetaz-2(NOS2) ekspresyonu incelendiğinde ise kontrol hücrelerinin düşük seviyede NOS2 ekspresyonu gerçekleştirdiği hücrelere tek başına SAHA muamelesinin yapılmasının NOS2 ifadesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Hücreler tek başına LPS ile muamele edildiğinde NOS2 ekspresyonunun güçlü bir şekilde arttığı bulunmuştur. Hücreler SAHA ve LPS ile birlikte muamele edildiğinde ise gen ekspresyonunun daha fazla artış gösterdiği belirlenmiştir.

Makrofaj polarizasyonunun kontrolünde M1 fenotipi için bir belirteç olarak kullanılan NOS2 hücrelerde güçlü bir şekilde ifade edilmektedir. M1 hücrelerine tek başına SAHA uygulanması NOS2 ekspresyonunda bir miktar artışa neden olsa da bu artış düşük bir oran olarak görülmüştür. M1 hücrelerinin tek başına LPS ile muamele edilmesi hücrelerde NOS2 ekspresyonunu önemli bir değişimin olmadığı görülmüştür. M1 hücrelerinin LPS ve SAHA ile birlikte muamele edilmesi ise NOS2 ekspresyonunu önemli oranda arttırdığı saptanmıştır.

M2 fenotipine sahip makrofaj hücreleri düşük seviyede NOS2 ekspresyon etmektedirler. Kontrol hücrelerine benzer şekilde M2 hücrelerinde NOS2 ekspresyonu tek başına SAHA ile muamele edildiğinde değişmemiş ancak LPS ile veya LPS ve SAHA birlikte muamele edildiğinde NOS2 ekspresyonu önemli oranda artmıştır.

Makrofaj polarizasyonunun kontrolünde M2 makrofaj belirteci olarak kullanılan Arjinaz-2(Arg1) gen ekspresyonu incelendiğinde kontrol ve M1 hücrelerinde gen ekspresyonunun tüm deney gruplarında çok düşük seviyede olduğu görülmüştür.

M2 hücrelerinde güçlü bir şekilde Arg1 gen ekspresyonunun olduğu görülmüştür. M2 hücrelerine tek başına SAHA muamelesinin yapılması Arg1 gen ekspresyonunu yaklaşık olarak beş kat düşürdüğü tespit edilmiştir. M2 hücrelerine tek başına LPS uygulaması Arg1 ekspresyonunu önemli bir oranda arttırdığı görülmüştür. Ancak M2 hücreleri LPS ve SAHA ile birlikte muamele edildiğinde Arg1 gen ekspresyonunun son derece dramatik bir şekilde düştüğü gösterilmiştir.

Arg1 gen seviyesinde oluşan bu farklılık hücre yüzey belirteçlerinde SAHA ile birlikte LPS uygulamasının bir M2 makrofaj kontrol faktörü olan CD206 ekspresyonunun değişimi ile uyumlu bir şekilde görülmektedir. Her ne kadar IL-10 sitokin seviyesinde SAHA'nın istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı görülse de özellikle M2 fenotipinin önemli göstergeleri olan iki faktördeki bu azalma SAHA'nın M2 fenotipini geri döndürebilme yeteneğinin olabileceği sonucunu vermektedir. Ancak son derece heterojen olan makrofaj hücrelerinde SAHA'nın bu etkisinin kanıtlanabilmesi için daha fazla belirtecin araştırıldığı ve hücre hattının yanı sıra kemik iliği kökenli gibi primer bir hücre serisinin kullanılması

gerekmektedir. Ayrıca bizim yapmış olduğumuz deneylerde kullandığımız hücre hattı olan RAW264.7 hücre hattının fare kökenli bir hücre hattı olduğundan dolayı sonuçların insan hücrelerinde de denenmesi gerekmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar mikro RNA(miRNA) olarak bilinen küçük kodlamayan RNA'ların immün ve enflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde önemli düzenleyici faktörler olduklarını ortaya koymuşlardır (O'Connell RM, 2012). miRNA'nın normal ve patolojik immün fonksiyonlardaki rolü üzerine yapılan çalışmalar miRNA düzenlenmesindeki bozuklukların aşırı veya kontrol edilemeyen enflamasyonun oluşumu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (O'Neill LA, 2011). Daha önce yapılan kanser çalışmalarında SAHA'nın çeşitli kanser hücrelerinde miRNA ekspresyonunu değiştirdiği gösterilmiştir (Yang D, 2012).

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada hipotezimiz Vorinostatın polarize makrofaj hücrelerinde fenotipik değişimlere neden olduğu ve bu etkisi gerçekleştirirken miRNA ekspresyon profillerini değiştirdiğidir.

EUN-MEE LEE ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan çalışmada SAHA'nın küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre hatlarında miRNA ekspresyonunu değiştirdiği gösterilmiştir (LEE, 2009). Bu çalışma SAHA'nın miRNA ekspresyonlarını değiştirebilme potansiyelinin olduğunu göstermiş ilerleyen zamanlarda histon deasetilaz inhibitörlerinin miRNA ekspresyonuna olan etkileri araştırılmaya devam edilmiştir.

Kontrol hücrelerinde miRNA ekspresyon profillerin incelendiğinde tek başına SAHA muamelesi yapılan hücrelerle kontrol hücreleri arasında 132 miRNA ekspresyonunun iki kat veya daha fazla değiştiği görülmüştür. SAHA muamelesi yapılan hücre grubunda 116 miRNA ekspresyonunun azaldığı 15 miRNA ekspresyonunun ise arttığı görülmüştür. Ekspresyonu değişen miRNA'ların ortak rol oynayabilecekleri hücresel yolların KEGG analizleri yapıldığında ekspresyonu değişen miRNA'ların istatistiksel olarak en anlamlı şekilde ECM reseptör etkileşimi, WNT sinyal yolağı, endositoz, MAPK sinyal yolağı ve PI3K-Akt sinyal yolağında rol oynayabileceği görülmüştür.

Kontrol grubu makrofaj hücrelerine tek başına LPS muamelesi yapılan ve LPS ile birlikte SAHA muamelesi yapılan hücrelerin miRNA ekspresyon farklılıkları incelendiğinde ise 55 miRNA ekspresyonunun iki kat veya daha fazla değiştiği görülmüştür. Bunlardan 44 miRNA'nın ekspresyonu LPS ile SAHA birlikte verildiğinde ekspresyonu artmış 11 miRNA'nın ise ekspresyonu azaldığı görülmüştür. Yaptığımız KEGG analizleri sonucu ekspresyonları değişen bu miRNA'ların sadece Vorinostat muamelesi yapılan hücrelere banzer şekilde ECM

reseptör etkileşimi, Endositoz, MAPK sinyal yolağı ve PI3K-Akt sinyal yolağında rol oynaya bileceğini göstermektedir.

M1 grubu makrofaj hücrelerinde Vorinostatın miRNA ekspresyonlarına olan etkileri incelendiğinde tek başına SAHA muamelesi yapılan hücrelerle M1 hücreleri arasında 46 miRNA ekspresyonunun iki kat veya daha fazla değiştiği görülmüştür. Tek başına SAHA muamelesi yapılan hücre grubunda 31 miRNA ekspresyonunun azaldığı 15 miRNA ekspresyonunun ise arttığı görülmüştür. Yaptığımız KEGG analizleri sonucu ekspresyonları değişen bu miRNA'ların kontrol grubu hücrelere banzer şekilde ECM reseptör etkileşimi, WNT sinyal yolağı, endositoz, MAPK sinyal yolağı ve PI3K-Akt sinyal yolağında rol oynaya bileceği görülmüştür.

Tek başına LPS muamelesi yapılan M1+LPS deney grubu ile LPS ve SAHA muamelesi yapılan M1+LPS+SAHA deney grupları arasındaki miRNA ekspresyon farkları incelendiğinde 82 miRNA ekspresyonunun iki kat veya daha fazla değiştiği görülmüştür. Bunlardan 79 miRNA'nın ekspresyonu LPS ile SAHA birlikte verildiğinde ekspresyonu artmış 3 miRNA'nın ise ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Yaptığımız KEGG analizleri sonucu ekspresyonları değişen bu miRNA'ların kontrol grubu hücrelere banzer şekilde ECM reseptör etkileşimi, WNT sinyal yolağı, endositoz, MAPK sinyal yolağı ve PI3K-Akt sinyal yolağında rol oynayabileceği görülmüştür.

M2 grubu makrofaj hücrelerinde Vorinostatın miRNA ekspresyonlarına olan etkileri incelendiğinde en yüksek miRNA ekspresyon farkının M2 makrofajlarında olduğu görülmüştür. Yapılan miRNA ekspresyon analizleri sonucunda tek başına SAHA muamelesi yapılan M2+SAHA deney grubu hücreleri ile M2 deney grubu hücreleri arasında 101 miRNA ekspresyonunun iki kat veya daha fazla değiştiği görülmüştür. Tek başına SAHA muamelesi yapılan hücre grubunda 73 miRNA ekspresyonunun arttığı 28 miRNA ekspresyonunun ise azaldığı belirlenmiştir. Yaptığımız KEGG analizleri sonucu ekspresyonları değişen bu miRNA'ların kontrol grubu ve M1 grubu hücrelerde olduğu gibi ECM reseptör etkileşimi, endositoz, MAPK sinyal yolağı ve PI3K-Akt sinyal yolağında rol oynaya bileceği görülmüştür.

SAHA ve LPS birlikte verilen M2+LPS+ SAHA deney grubu hücreleri ile tek başına LPS verilen M2+LPS deney grubu hücreleri arasındaki miRNA ekspresyon farklılıkları incelendiğinde ise 42 miRNA ekspresyonunun iki kat veya daha fazla değiştiği görülmüştür. Tek başına LPS muamelesi yapılan hücre gruba göre SAHA ve LPS'nin birlikte uygulanan hücre grubunda 27 miRNA ekspresyonunun arttığı 15 miRNA ekspresyonunun ise azaldığı görülmüştür. Yaptığımız KEGG analizleri sonucu ekspresyonları değişen bu miRNA'ların kontrol grubu ve M1 grubu hücrelerde olduğu gibi ECM reseptör etkileşimi, WNT sinyal

yolağı, endositoz, MAPK sinyal yolağı ve PI3K-Akt sinyal yolağında rol oynaya bileceğı görölmüştür.

Yapmış olduğumuz miRNA analizleri sonucunda SAHA'nın daha önce kanser hücre hatlarında gösterildiğı gibi makrofaj hücrelerinde de miRNA ekspresyon farklılıklarına neden olduğu gösterilmiştir. miRNA ekspresyon profilleri incelendiğinde ekspresyonu değışen miRNA'ların ortak rol oynayabilecekleri yolaklar incelendiğinde ortak yolakların bulunmuş olması SAHA'nın miRNA ekspresyon farklılıkları yaratarak hücresele yolaklarda rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

SAHA'nın makrofaj fenotipinde meydana getirdiğı etkilerin miRNA ekspresyonlarına olan etkileriyle ilişkilendirebilmek amacıyla karşılaştırmalı analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda bulunan miRNA'ların KEGG yolak analizleri sonucunda rol alabilecekleri yolaklar diğere gruplarla büyük oranda benzerlik içermekte ve bunlardan en dikkat çekenini ise MAPK sinyal yolağıdır.

Yaptığımız karşılaştırmalı analiz sonucuna göre LPS muamelesi sonucu kontrol hücrelerinde mmu-mir-125a-5p ekspresyonu artarken LPS ile birlikte SAHA muamelesi sonucunda bu miRNA ekspresyonunun azaldığı görölmüştür. Sami ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada mir-125a-5p ekspresyonunun LPS ile indüklenen fare makrofaj hücrelerinde upregüle olduğunu ve makrofaj ilişkili enflamasyonun negatif regülatörü olarak iş yaptığını göstermiştir. mir-125a-5p'in inhibe edilmesi hücrelerde pro-enflamatuar genlerin ekspresyonlarında istatistiksel bir artışın meydana gelmesine neden olurken, miRNA'nın over eksprese edilmesi M2 makrofajlarında Arg1 gen ekspresyonunun son derece artmasına neden olmuştur (Sami, 2013). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada tüm hücre gruplarında LPS muamelesi mir-125a-5p ekspresyonunu arttırırken SAHA ile LPS muamelesi sonucunda miRNA ekspresyonu düşmüştür, ancak özellikle kontrol grubu ve M1 grubu makrofaj hücrelerinde SAHA birçok pro-enflamatuvar genin ekspresyonunda düşüşe neden olmuştur. Bu nedenle SAHA'nın mir-125a-5p ekspresyonuna olan etkisinin Kontrol ve M1 grubu hücrede farklı parametrelerle değıerlendirilebileceğı sonucuna varılmıştır. Ancak M2 grubu hücrelerde mir-125a-5p ekspresyonu LPS ile birlikte SAHA muamelesi sonucu düşmesi ve Arg1 gen ekspresyonunun da son derece azalması mir-125a-5p'in etkisi ile olabileceğı ve yapılacak ileri çalışmalar için güçlü bir aday olacağı öngörülmektedir.

SAHA ile ekspresyonu değışen bir diğere miRNA mmu-mir-21a-5p'dir. Daha önce yapılan çalışmalarda LPS ile muamele edilen Raw264.7 makrofaj hücrelerinde mir-21 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Sheedy, 2010). Yakın zamanlı çalışmalar mir-21'in makrofajlarda ifade olan TLR4 desen tanıma reseptör etkileşiminin düzenlenmesinde önemli

rol oynadığı gösterilmiştir (O'Neill, 2011). Mir-21'in hedefi olan PDC4 ve Peli1 TLR4 sinyal yolağının pozitif regülatörleridir ve mir-21 tarafından hedef alınmaları sonucunda TLR4 sinyallenmesinde azalma buna bağlı olarak TNF- α ekspresyonunda azalma meydana geldiği ve bu özelliği ile anti enflamatuvar bir miRNA olduğu gösterilmiştir (Rebecca, 2016). Bizim yapmış olduğumuz deneylerde literatürle benzer olarak LPS muamelesi yapılan kontrol grubu makrofaj hücrelerinde mir-21 seviyesinin arttığı gösterilmiştir SAHA muamelesi ile bu artışın azaldığı görülmüştür. Ancak LPS ile birlikte SAHA ile muamele edilen makrofaj hücrelerinde TNF- α sitokin salınımında azalma meydana gelmiştir. Bu bulgu SAHA'nın makrofaj hücrelerinde farklı moleküler mekanizmalar ile bu etkisini gösterebileceği sonucuna varılmıştır.

mir-194-5p ekspresyonunun kontrol grubu hücrelerde LPS muamelesi sonucu arttığı LPS ile SAHA birlikte muamele edildiğinde hem kontrol grubunda hem de M1 makrofaj hücrelerinde mir-194-5p ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Huigun ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada mir-194 TLR4 sinyallenmesinde TRAF6'yı hedefleyerek enflamasyonun negatif düzenleyicisi olarak görev yapabileceğini göstermiştir. mir-194-5p ekspresyonu artan makrofaj hücrelerinde TNF- α sitokin miktarının azalması literatürle uyum göstermekte ancak makrofaj hücrelerinde diğer enflamatuvar cevaplara olan etkisinin daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekeceğini düşünmekteyiz.

Daha önce yapılan çalışmalar mir-155'in SMAD2/3 veya IL13R α 1'yı hedef alabileceği ve bu moleküllerin hedeflenmesi yoluyla enflamatuvar fenotip olan M1 makrofaj polarizasyonunu destekleyebileceği gösterilmiştir (Martinez, 2011). miR-155'in M1 makrofaj polarizasyonunu hangi moleküler mekanizma ile desteklediği tam olarak aydınlatılamamıştır, ancak M1 fenotipinin kritik bir molekülü olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Xing, 2012). Xing ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada M1 makrofajlarının M2 fenotipine dönüştürüldüğünde miR-155 ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı, M2 makrofajlarında miR-155 ekspresyonunun artırılması ile M2 veya M2 benzeri TAM'larda M1 makrofaj polarizasyonunun arttığı gösterilmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışma ile SAHA'nın polarize edilmiş ve edilmemiş makrofaj hücrelerinde miRNA ekspresyon farkları oluşturduğu bulunmuştur. Yapmış olduğumuz analizler sonucunda bulunan miRNA'ların enflamatuvar cevapların oluşturulmasında görevli hücreyel yollarda da rol oynayabilecekleri saptanmıştır. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada özellikle M2 makrofajlarına SAHA tek başına uygulandığında miR-155 ekspresyonunun iki kattan daha fazla bir artış oluşturduğu görülmüştür. M2 makrofajlarında SAHA muamelesi normalde düşük seviyede ekspresyonunu gördüğümüz CD86 ifadesinin

artması ayrıca TNF- α ifadesinin artışına neden olmuştur. Önemli olarak LPS ile birlikte uygulandığında SAHA CD206 hücre yüzey ekspresyonunu düşürmesi ve Arg1 gen ekspresyonunu düşürmesi ile M2 fenotipik özelliklerinin son derece azalmasına ve M1 fenotipinin oluşmasını desteklemeyi sağladığı görülmüştür. SAHA kontrol ve M1 makrofaj hücreleri üzerine miR-155 ekspresyonuna önemli bir etki oluşturmazken M2 makrofajlarında böyle bir etkiyi oluşturması yaptığımız çalışmanın en önemli bulguları arasındadır. M2 makrofajları üzerine SAHA'nın etkilerinin daha iyi aydınlatılabilmesi için daha ileri, özellikle fonksiyon çalışmalarının yapılması gereklidir.

6. SONUÇ

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre histon deasetilaz inhibitörlerinin immün sistemi baskılayıcı ve anti-enflamatuvar etkilerinin olduğu ve bu özellikleri ile akut ya da kronik enflamatuvar hastalıkların tedavisinde potansiyel bir ilaç olarak kullanılabileceğini öngörülmektedir. Ancak Histon deasetilaz inhibitörlerinin enflamatuvar hücreler üzerine etki mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu etkinin aydınlatılabilmesi amacıyla yapılan bu araştırmanın sonuçları aşağıda özetlenmiştir;

- Projemizde kullanılan histon deasetilaz inhibitörü Vorinostat'ın Raw 264.7 fare makrofaj hücreleri üzerine 1µM dan yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkisinin olduğu,
- Vorinostat'ın 24 saat süreyle ve 1µM konsantrasyonda uygulandığında hücrelerde histon deasetilaz aktivasyonunu inhibe ettiği, ancak bu sürenin 48 veya 72 saate çıktığında 1µM konsantrasyonun aynı etkiyi göstermediği,
- Polarize makrofaj hücrelerinde Vorinostatın IL-12 salınımını farklı şekilde değiştirdiği, kontrol hücrelerinde SAHA'nın LPS ile birlikte verildiğinde IL-12 salınımını düşürürken, M1 makrofajlarında SAHA ve LPS'nin birlikte muamelesinin IL-12 salınımını arttırdığı, M2 makrofajlarında ise LPS ile SAHA'nın birlikte verilmesinin IL-12 salınımını düşürdüğü ancak bu etkinin kontrol grubu makrofajlarına oranla daha sınırlı olduğu,
- Polarize makrofaj hücrelerinde IL-10 salınımına SAHA'nın istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı,
- Hücre yüzey belirteçleri olan CD86 ve CD 206 ekspresyonlarına SAHA'nın farklı fenotipteki makrofajlar üzerine farklı etkiler gösterdiği özellikle M2 makrofajlarda yüksek olan CD206 ekspresyonunu LPS ile SAHA'nın birlikte uygulandığında önemli ölçüde düşürdüğü,
- Polarize makrofaj hücrelerinde TNF-α sitokin salınımını genel olarak inhibe ettiği ancak bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı,
- SAHA'nın IL-1β salınımına tek başına uygulandığında herhangi bir etki göstermediği ancak LPS ile birlikte SAHA muamelesinin özellikle kontrol ve M2 fenotipine sahip hücrelerde IL-1β güçlü bir şekilde uyardığı ancak M1 hücrelerinde SAHA'nın IL-1β salınımına anlamlı bir etki göstermediği,
- IL-6 salınımına kontrol ve M2 makrofaj hücrelerinde SAHA'nın tek başına uygulandığında herhangi bir fark oluşturmayıp, LPS ile birlikte SAHA uygulandığında tek başına LPS uygulanan gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde

düşürdüğü ayrıca M1 hücrelerine tek başına SAHA muamelesinin IL-6 sitokin salınımını anlamlı bir şekilde düşürdüğü, LPS ile birlikte SAHA uygulandığında tek başına LPS uygulanan gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüşün olduğu,

- Kontrol ve M1 hücrelerinde SAHA ve LPS'nin birlikte uygulanmasının COX2 mRNA ekspresyonunu güçlü bir şekilde arttırdığı, M2 hücrelerinde ise bu etkinin görülmediği,
- Bir kemokin ligandı olan CXCL9 ekspresyonunun LPS muamelesi ile gerçekleşmediği sadece IFN γ ile birlikte uyarılan M1 makrofajlarında ifade olduğu, SAHA'nın hem tek başına hem de LPS ile uygulandığında CXCL9 ekspresyonunu arttırdığı,
- Makrofaj hücrelerinde tek başına SAHA uygulamasının NOS2 ekspresyonuna önemli bir etki göstermediği, LPS uyarımının NOS2 ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı, SAHA ve LPS'nin birlikte uygulandığı hücrelerde ise gen ekspresyonunun arttığı,
- En yüksek Arg1 ekspresyonunun M2 fenotipindeki hücrelerde olduğu, tek başına SAHA muamelesinin Arg1 ekspresyonunda yaklaşık beş katlık bir azalmaya neden olduğu, LPS ve SAHA'nın birlikte uygulandığı deney grubunda ise Arg1 ekspresyonundaki azalmanın son derece dramatik olduğu,
- Hücrelerin SAHA ile hem tek başına hem de LPS ile birlikte muamele edilmesinin miRNA ekspresyonlarında önemli değişikliklere neden olduğu,
- Kontrol hücrelerinde miRNA ekspresyon profillerin incelendiğinde tek başına SAHA muamelesi yapılan hücrelerle kontrol hücreleri arasında 132 miRNA ekspresyonunun iki kat veya daha fazla değiştiği, SAHA muamelesi yapılan hücre grubunda 116 miRNA ekspresyonunun azaldığı 15 miRNA ekspresyonunun ise arttığı,
- Kontrol grubu makrofaj hücrelerine tek başına LPS muamelesi yapılan ve LPS ile birlikte SAHA muamelesi yapılan hücrelerin miRNA ekspresyon farklılıkları incelendiğinde 55 miRNA ekspresyonunun iki kat veya daha fazla değiştiği Bunlardan 44 miRNA'nın ekspresyonunun LPS ile SAHA birlikte verildiğinde ekspresyonu arttığı 211 miRNA'nın ise ekspresyonu ise azaldığı,
- M1 grubu makrofaj hücrelerinde Vorinostatın miRNA ekspresyonlarına olan etkileri incelendiğinde tek başına SAHA muamelesi yapılan hücrelerle M1 hücreleri arasında 47 miRNA ekspresyonunun iki kat veya daha fazla değiştiği, tek başına SAHA muamelesi yapılan hücre grubunda 31 miRNA ekspresyonunun azaldığı 15 miRNA ekspresyonunun ise arttığı,
- Tek başına LPS muamelesi yapılan M1+LPS deney grubu ile LPS ve SAHA muamelesi yapılan M1+LPS+SAHA deney grupları arasındaki miRNA ekspresyon farkları incelendiğinde 82 miRNA ekspresyonunun iki kat veya daha fazla değiştiği,

bunlardan 3479 miRNA'nın ekspresyonunun LPS ile SAHA birlikte verildiğinde ekspresyonu arttığı 3 miRNA'nın ise ekspresyonunun azaldığı,

- M2 makrofajlarında miRNA ekspresyon analizleri sonucunda tek başına SAHA muamelesi yapılan M2+SAHA deney grubu hücreleri ile M2 deney grubu hücreleri arasında 101 miRNA ekspresyonunun iki kat veya daha fazla değiştiği, tek başına SAHA muamelesi yapılan hücre grubunda 73 miRNA ekspresyonunun arttığı 28 miRNA ekspresyonunun ise azaldığı,
- SAHA ve LPS birlikte verilen M2+LPS+SAHA deney grubu hücreleri ile tek başına LPS verilen M2+LPS deney grubu hücreleri arasındaki miRNA ekspresyon farklılıkları incelendiğinde 42 miRNA ekspresyonunun iki kat veya daha fazla değiştiği tek başına LPS muamelesi yapılan hücre gruba göre SAHA ve LPS'nin birlikte uygulanan hücre grubunda 27 miRNA ekspresyonunun arttığı 15 miRNA ekspresyonunun ise azaldığı,
- SAHA'nın tüm makrofaj hücre gruplarında miRNA ekspresyonunda farklılıklar yaratabildiği,
- Tüm deney gruplarında ekspresyonu değişen miRNA'ların benzer moleküler yollarda işlevsel olabileceği,
- Ekspresyonu değişen miRNA'ların makrofaj aktivasyonunda rol oynayabilen miRNA'ları da içerdiği,
- M2 makrofajlarında SAHA'nın özellikle LPS ile birlikte uygulandığında M1 fenotipine ait belirteçlerin artışı desteklediği,
- M2 makrofajlarında SAHA muamelesinin miR-155-5p ekspresyonunu arttırdığı ve M2 fenotipinde meydana gelen değişimlerin mekanizmalarının anlaşılabilmesi için güçlü bir aday olabileceği sonuçlarına varılmıştır.

SAHA'nın kontrol hücrelerinde ve polarize makrofaj hücrelerinde makrofaj fenotiplerine farklı etkiler gösterdiğinin görülmesi ayrıca miRNA ekspresyonlarında da belirgin değişikliklerin görülmesi SAHA'nın bu etkisini miRNA ekspresyon farkları oluşturarak meydana getirebileceğini düşündürmektedir. Ancak bu etkilerinin doğrulanabilmesi için daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışma ile polarize makrofaj hücrelerinde SAHA'nın miRNA ekspresyonunda değişiklikler meydana getirdiği ilk defa ortaya konarak, ileride yapılacak daha kapsamlı çalışmalar için kaynak oluşturması sağlanmıştır.

7. KAYNAKLAR

Alam, M. M. and O'Neill, L. A. 'MicroRNAs and the resolution phase of inflammation in macrophages, *European Journal of Immunology*, 2011. 41(9), pp. 2482–2485.

Amanpreet Singh , Rajat Kaushik NSAIDS(Cox-2 inhibitors): A safer approach *Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 2017. 12(4), PP 25-31

Hou J, Wang P, Lin L, Liu X, Ma F, An H, Wang Z, Cao X. 'RIG-I-Dependent Type I IFN Production in MicroRNA-146a Feedback Inhibits MicroRNA-146a Feedback Inhibits RIG-I-Dependent Type I IFN Production in Macrophages by Targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2'. *J Immunol*. 2009 1;183(3):2150-8

Androulidaki, A. et al. 'The Kinase Akt1 Controls Macrophage Response to Lipopolysaccharide by Regulating MicroRNAs, *Immunity*, 2009. 31(2), pp. 220–231.

Arnold CE et al.. A critical role for suppressor of cytokine signaling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. *Immunology* 2014. 141, 96-110.

Bazzoni, F. et al. 'Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals', *National Academy of Sciences*, 2009. 106(13), pp. 5282–5287.

Blusse vOAA, Mattie H, & van FR A quantitative evaluation of pulmonary macrophage kinetics. *Cell Tissue Kinet* 1983. 16(3):211-219.

Boldin, M. P. et al. 'miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice', *Journal of Experimental Medicine*, 2011. 208(6).

Bonizzi, G. and Karin, M. 'The two NF- κ B activation yolaks and their role in innate and adaptive immunity', *Trends in Immunology*, 2004. 25(6), pp. 280–288.

Brogdon JL, Xu Y, Szabo SJ, et al. Histone deacetylase activities are required for innate immune cell control of Th1 but not Th2 effector cell function. *Blood*. 2007;109(3):1123-1130.

Butler L M, Agus D B, Scher H I, Higgins B, Rose A, Cordon-Cardo C, Thaler H T, Rifkind R A, Marks P A, Richon V M. *Cancer Res* 2000. 60:5165–5170.

Ceppi, M. et al. 'MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling yolak in activated human monocyte-derived dendritic cells', *National Academy of Sciences*, 2009. 106(8), 2735–2740.

Chen, X.-M. et al. 'A Cellular Micro-RNA, let-7i , Regulates Toll-like Receptor 4 Expression and Contributes to Cholangiocyte Immune Responses against *Cryptosporidium parvum* Infection', **Journal of Biological Chemistry**, 2007. 282(39), 28929–28938.

David JR, David RR Cellular hypersensitivity and immunity. Inhibition of macrophage migration and the lymphocyte mediators. **Allergy**. 1972 16:300-449.

Das A, et al. Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. **The American journal of pathology**. 2015 185(10):2596-606

Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, & Taylor PR Tissue-resident macrophages. **Nature immunology** 2013 14(10):986-995.

Deroanne CF, Bonjean K, Servotte S, Devy L, Colige A, Clausse N, Blacher S, Verdin E, Foidart JM, Nusgens BV, Castronovo V. Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. **Oncogene**. 2002 17;21(3):427-36.

Dokmanovic M1, Marks PA. Prospects: histone deacetylase inhibitors. **J Cell Biochem**. 2005 1;96(2):293-304

Duvic M, Talpur R, Ni X, et al. Phase 2 trial of oral Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). **Blood**. 2007;109(1):31–39.

Eun-Mee Lee, Sangsu Shin, Hwa Jun Cha, Youngmin Yoon, Seunghee Bae, Jin Hyuk Jung, Sun-Mi Lee, Su-Jae Lee, In-Chul Park, Young-Woo Jin, Sungkwan Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) changes microRNA expression profiles in A549 human non-small cell lung cancer cells **Journal of Molecular Medicine** , 2009 24: 45-50

Finnin M S, Donigian J R, Cohen A, Richon V M, Rifkind R A, Marks P A, Breslow R, Pavletich N P **Nature** 1999 401:188–193

Glass, K. Saijo Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells **Nat. Rev. Immunol**, 10 2010, 365-376

Gordon, S. and Martinez, F. O. 'Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions', **Immunity**, 32(5), 2010 593–604.

Gordon, F.O. Martinez Alternative activation of macrophages: mechanism and functions **Immunity**, 2010 32 , 593-604

Gordon S and Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005 5(12):953-64

Goyvaerts, C. et al. 'Targeted Lentiviral Vectors: Current Applications and Future Potential', in Gene Therapy - *Tools and Potential Applications*.2013

Graff, J. W. et al. 'Identifying Functional MicroRNAs in Macrophages with Polarized Phenotypes', *Journal of Biological Chemistry*,2012 287(26), pp. 21816–21825.

Hagemann, T. et al. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF- κ B', *The Journal of Experimental Medicine*, 2008 205(6), pp. 1261–1268.

Halili MA, Andrews MR, Labzin LI, Schroder K, Matthias G, Cao C, Lovelace E, Reid RC, Le GT, Hume DA, et al. Differential effects of selective HDAC inhibitors on macrophage inflammatory responses to the Toll-like receptor 4 agonist LPS. *J Leukoc Biol* 2010 87:1103–1114.

Hildebrand D, Bode KA, Rieß D, Cerny D, Waldhuber A, Römmler F, Strack J, Korten S, Orth JH, and Miethke T, et al. Granzyme A produces bioactive IL-1 β through a nonapoptotic inflammasome-independent pathway. *Cell Reports* 2014 9: 910–917

Hirsch JG Immunity to infectious diseases: review of some concepts of Metchnikoff. *Bacteriological reviews* 1959 23(2):48-60.

Hoebe, K., Janssen, E. and Beutler, B. 'The interface between innate and adaptive immunity', *Nature Immunology*, 2004 5(10), pp. 971–974.

Hong Zheng, Weipeng Zhao, Cihui Yan, Crystina C. Watson, et al. HDAC inhibitors enhance T cell chemokine expression and augment response to PD-1 immunotherapy in lung adenocarcinoma *Clin Cancer Res*. 2016 Aug 15; 22(16): 4119–4132.

Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase *Nature*. 2002 23;417(6887):455-8.

Huiqun Tian, Chaoqi Liu, Xiaohua Zou, Wei Wu , Changcheng Zhang , Ding Yuan MiRNA-194 Regulates Palmitic Acid-Induced Toll-Like Receptor 4 Inflammatory Responses in THP-1 *Cells Nutrients* 2015, 7, 3483-3496

Jennifer L. Cooper, Steven Henikoff Adaptive Evolution of the Histone Fold Domain in Centromeric Histones *Molecular Biology and Evolution* 2004 21(9) 1712-1718

Johnstone RW Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. **Nat Rev Drug Discov.** 2002;1(4):287-99

Kaan KÜÇÜKOĞLU Histonların Asetilasyonu ve Histon Deasetilaz İnhibitörleri Türkiye Klinikleri **J Pharm Sci** 2013;2(2):55-73

Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation *Cell.* 2004 23;116(2):259-72

Kirsty Minton et al. Antiinflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science** 2017 356, 513–519

Konrad A Bode, Kate Schroder, David A Hume, Timothy Ravasi, Klaus Heeg, Matthew J Sweet, Alexander H Dalpke Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment **Immunology.** 2007; 122(4): 596–606.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. **Annu Rev Immunol.** 2009;27:485-517.

Krol, J., Loedige, I. and Filipowicz, W. 'The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay', **Nat Rev Genet.** 2010 11(9):597-610

Langrish CL, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **The Journal of experimental medicine** 2005. 201(2):233-240.

Lawrence, T. and Natoli, G. 'Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity', **Nature Reviews Immunology**, 2011 11(11), pp. 750–761.

Liao, X. et al. 'Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization.', *The Journal of clinical investigation.* **American Society for Clinical Investigation**, 2011 121(7), pp. 2736–49.

Lionel B.Ivashkiv Epigenetic regulation of macrophage polarization and function **Trends in Immunology.** 2013 34 216-223

Liu, G. et al. 'miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses', **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2009 106(37), pp. 15819–15824.

Liu, G. and Abraham, E. 'MicroRNAs in Immune Response and Macrophage Polarization', **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2013 33(2), pp. 170–177.

Lucas, T. et al. 'Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair', *The Journal of Immunology*, 2010 184(7), pp. 3964–3977.

McCoy, C. E. et al. 'IL-10 Inhibits miR-155 Induction by Toll-like Receptors', *Journal of Biological Chemistry*, 2010 285(27), pp. 20492–20498.

Mackaness GB The Immunological Basis of Acquired Cellular Resistance. *The Journal of experimental medicine* 1964. 120:105-120.

Marks P A, Rifkind R A, Richon V M, Breslow R, Miller T, Kelly W K *Nat Rev Cancer* 2001 1:194–202.

Marks PA, Richon VM, Rifkind RA Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells *J Natl Cancer Inst.* 2000 2;92(15):1210-6.

Marmorstein R Structure and function of histone acetyltransferases *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(5-6):693-703

Martinez FO, Helming L, Gordon S Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology* 2009 27:451-483.

Martinez FO & Gordon S The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* 2014. 6:13

Martinez-Nunez R.T., Louafi F., Sanchez-Elsner T. The interleukin 13 (IL-13) pathway in human macrophages is modulated by microRNA-155 via direct targeting of interleukin 13 receptor alpha1 (IL13Ralpha1) *J. Biol. Chem.* 2011, vol. 286 1786-1794

Mantovani A et al.. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004.25, 677- 686.

Mills CD et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000.164, 6166-6173.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, & Coffman RL Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986. 136(7):2348-2357.

Murray P.J. , T.A. Wynn Protective and pathogenic functions of macrophage subsets *Nat. Rev. Immunol.* 2011, 11 pp. 723-737

- Nahid, M. A. et al. 'miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: implication in innate immunity.', *The Journal of biological chemistry. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 2009 284(50), pp. 34590–9.
- O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:295–312.
- O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:163–175.
- Pauleau, A.-L. et al. 'Enhancer-Mediated Control of Macrophage-Specific Arginase I Expression', *The Journal of Immunology*, 2004 172(12).
- Pello, O. M. et al. 'Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology', *Blood*, 2012 119(2), pp. 411–421.
- Porta, C. et al. 'Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor B', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009 106(35), pp. 14978–14983.
- Rebecca Elise Barnett, Daniel J. Conklin, Lindsey Ryan, Robert C. Keskey, Vikram Ramjee, Ernesto A. Sepulveda, Sanjay Srivastava, Aruni Bhatnagar, William G. Cheadle Anti-inflammatory effects of miR-21 in the macrophage response to peritonitis (2016) *J. Leukoc. Biol.* 99: 361–371
- Richon V M, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind R A, Marks P A ProcA class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases *Natl cad Sci* 1998 95:3003–3007.
- Roger T, Lugin J, Le Roy D, Goy G, Mombelli M, Koessler T, Ding XC, Chanson AL, Reymond MK, Miconnet I, Schrenzel J, François P, Calandra T. Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection *Blood*. 2011 27;117(4):1205-17.
- Said T K, Moraes R C, Sinha R, Medina D Mechanisms of suberoylanilide hydroxamic acid inhibition of mammary cell growth *Breast Cancer Res* 2001 3:122–133
- Sami Banerjee , Huachun Cui , Na Xie , Zheng Tan , Shanzhong Yang , Mert Icyuz , Victor John Thannickal , Edward Abraham , Gang Liu miR-125a-5p Regulates Differential Activation of Macrophages and Inflammation *The Journal of Biological Chemistry*(2013) vol. 288, no. 49, pp. 35428 –35436

Schroder K and Tschopp J The inflammasomes. **Cell** 2010 140:821–832.

Sheedy, F. J. et al. 'Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21', **Nature Immunology**,2010 11(2), pp. 141–147.

Sica, A. et al. 'Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas.', The Journal of clinical investigation. **American Society for Clinical Investigation**,2012 122(3), pp. 787–95.

Sica, A. and Bronte, V. 'Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development.', The Journal of clinical investigation. **American Society for Clinical Investigation**, 2007 117(5), pp. 1155–66.

Sijie Fang, Xiangda Meng, Zhuhong Zhang, Yang Wang, Yuanyuan Liu, Caiyun You, Hua Yan Vorinostat Modulates the Imbalance of T Cell Subsets, Suppresses Macrophage Activity, and Ameliorates Experimental Autoimmune Uveoretinitis **Neuromol Med** 2016 18:134–145

Sindrilaru, A. et al. 'An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice', **Journal of Clinical Investigation**, 2011 121(3), pp. 985–997.

Sophia Rangwala, Madeleine Duvic, Chunlei Zhang Trends in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma – critical evaluation and perspectives on Vorinostat **Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy** 2012 Volume 2012:2 17—27

Stein M et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **J Exp Med** 1992 176, 287-292.

Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. **Nature**. 2000 6;403(6765):41-5

Sun H, Lu J, Wei L, Wang X, Xu X, Dong M, Huang B Histone acetyltransferase activity of p300 enhances the activation of IL-12 p40 promoter. **Mol Immunol**. 2004 Nov; 41(12):1241-6.

Szekanecz Z & Koch AE Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol** 2007. 19(3):289-295.

Taganov, K. D. et al. 'NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses.', *National Academy of Sciences*, 2006 103(33), pp. 12481–6.

Takada Y, Gillenwater A, Ichikawa H, and Aggarwa BB. Suberoylanilide Hydroxamic Acid Potentiates Apoptosis, Inhibits Invasion, and Abolishes Osteoclastogenesis by Suppressing Nuclear Factor-kB Activation. *J Biol Chem*. 2006; 281:5612–5622.

Takeda, Y. et al. 'Macrophage skewing by Phd2 haplodeficiency prevents ischaemia by inducing arteriogenesis', *Nature*, 2011 479(7371), pp. 122–126.

Takeuchi, O. and Akira, S. 'Epigenetic control of macrophage polarization', *European Journal of Immunology*. 2011, 41(9), pp. 2490–2493.

Taylor PC ve Williams RO) Combination cytokine blockade: the way forward in therapy for rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheumatol* 2015 67:14–16

Thierry Roger, Jérôme Lugin, Didier Le Roy, Geneviève Goy, Matteo Mombelli, Thibaud Koessler, et al. Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection *Blood*. 2011;117(4):1205-1217

Udalova, I. A. et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and Th1/Th17 response. *Nat Immunol*. 2011 12(3):231-8

web.1-Düzgün, N. 'İmmün Sistemin Tanıtımı'.

<http://ichastaliklariromatoloji.medicine.ankara.edu.tr/files/2014/02/İmmün-Sistemin-Tanıtımı.pdf>

Wynn TA Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nature reviews* 2004. 4(8):583-594.

Xing Cai, Yuan Yi, Ningzhu Li, Dihan Zhu, Junfeng Zhang, Chen-Yu Zhang, Ke Ze Re-polarization of tumor-associated macrophages to pro-inflammatory M1 macrophages by microRNA-155 *Journal of Molecular Cell Biology*, Volume 4, Issue 5, 1 2012, 341–343

Yang D, Torres CM, Bardhan K, Zimmerman M, McGaha TL, Liu K Decitabine and Vorinostat cooperate to sensitize colon carcinoma cells to Fas ligand-induced apoptosis in vitro and tumor suppression in vivo. *J Immunol*. 2012 1; 188(9):4441-9.

Yona S, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 2013 38(1):79-91.

Zhang WC, et al. High salt primes a specific activation state of macrophages, M(Na). **Cell research** 2015. 25(8):893-910

Zhe Hou, Domenick J. Falcone, Kotha Subbaramaiah, Andrew J. Dannenberg Macrophages induce COX-2 expression in breast cancer cells: role of IL-1 β autoamplification **Carcinogenesis**. 2011; 32(5): 695–702.

Zlatka Georgieva Dobрева, Boncho Grigorov Grigorov, Spaska Angelova Stanilova Effect of a Histone Deacetylases Inhibitor of IL-18 and TNF-Alpha Secretion in Vitro Maced **J Med Sci**. 2018;15; 6(2):269-273.

8. ÖZGEÇMİŞ

Samet TÜREL 1981 yılında Van'da doğdu. Babasının görevi nedeniyle ilkokulu Bursa, Ortaokulu Tunceli ve Liseyi Ordu'da okudu. Lisans eğitimini Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde 2004 tamamlayıp aynı yıl Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek lisans eğitimine başladı. 2008 yılında "Hipertansiyon ile ACE2 Gen Polimorfizmi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi" konulu yüksek lisans tezini hazırlayarak mezun olmaya hak kazanmıştır. 2009-2010 yılları arasında vatani görevini Gülhane Askeri Tıp Akademisi KBRN Bilim Dalında yapmış ve kimyasal silahların metabolik ürünlerinin tespiti üzerine çalışmalar yapma imkanı bulmuştur. 2010 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimine başlamıştır. Samet TÜREL evli ve bir çocuk babasıdır.