



**COVID-19 TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLARIN
İNSAN BÖBREK HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

ÖZGE ÖZERDEM İLİK

Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**Danışman: Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN
2023**

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



COVID-19 TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLARIN
İNSAN BÖBREK HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZGE ÖZERDEM İLİK

ORCID: 0000-0001-5196-3956

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Danışman: Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

ŞUBAT-2023

Her hakkı saklıdır.

ÖZET

COVID-19 TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLARIN İNSAN BÖBREK HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Özge ÖZERDEM İLİK

Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

COVID-19 olarak adlandırılan ve 2019 yılı itibari ile tüm dünyayı etkileyen SARS-CoV-2'ye karşı özgül bir tedavinin bulunmaması, hali hazırda başka hastalıkların tedavisinde kullanılan bazı ilaçların kullanılmasını gündeme getirmiştir. Bu ilaçlardan hidrosiklorokin (HCQ), favipiravir (FVP) ve valproik asit (VPA) pandemi sırasında sıklıkla ve yüksek dozlarda reçete edilmiştir. Bu Yüksek Lisans Tez çalışmasında HEK293T hücrelerinde HCQ, FVP ve VPA uygulanmalarının hücre canlılığı, çoğalması ve morfolojisi üzerine etkileri MTT analizi ve AO/PI boyamaları kullanılarak, HDAC aktivitesindeki değişim ve bu değişimin anti-inflamatuar yanıt belirteçleri olan IL-6, IL-10 ve TNF- α ifadesine etkisi ELİSA yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde hücre canlılığının devam ettiği herhangi bir hücre ölümü olmadığı gözlenmiştir. Yapılan MTT analizleri sonucunda VPA uygulanan kültürlerde hücre proliferasyonunun 24. ve 48. saatte ve HCQ uygulanan kültürlerde 48. saatte azaldığı, FVP uygulanan kültürlerde ise 24. saatte hücre proliferasyonunun azaldığı fakat 48. saatte tekrar artmış olduğu gözlenmiştir. Tüm deney gruplarında HDAC aktivitesinin artmış olduğu belirlenmiştir. VPA uygulanan kültürlerde 24. saatte %20,42 ve 48. saatte %5,77, HCQ uygulanan kültürlerde 24. saatte % 53,16 ve 48. saatte %54,43 ve FVP uygulanan kültürlerde 24. saatte %164,22 ve 48. saatte % 198,16 artış gerçekleşmiştir. HCQ IL-10 ifadesinde artışa, FVP IL-10 ve IL-6 seviyesinde artışa ve VPA uygulaması özellikle TNF- α ifadesinde artışa neden olmuştur. Sonuç olarak HDAC aktivitesindeki artışın IL-10, IL-6 ve TNF- α değişimlerine neden olduğu, VPA uygulamasının TNF- α üzerindeki etkisinin HDAC ile ilişkili olabileceği ancak IL-10 ve IL-6 ifadesinden bağımsız farklı bir hücresel yolak ile ilişkili olabileceği gösterilmiş ve literatürde henüz yer almayan önemli bulgular raporlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hidrosiklorokin, Favipiravir, Valproik Asit, HEK293T, COVID-19

ABSTRACT

IN VITRO EVALUATION OF THE EFFECTS OF DRUGS USED IN THE TREATMENT OF COVID-19 ON THE HUMAN KIDNEY CELL LINE

Özge ÖZERDEM İLİK

Department of Biology

MSc. Thesis

Supervisor: Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

The lack of a specific treatment for SARS-CoV-2, which is called COVID-19 has rapidly affected the whole world as of 2020, has brought the use of some drugs currently used in the treatment of other diseases. Of these drugs, hydroxychloroquine (HCQ), favipiravir (FVP) and valproic acid (VPA) have been prescribed frequently and in high doses during the pandemic. In this Master's Thesis study, the effects of HCQ, FVP and VPA applications on cell viability, proliferation and cell morphology in HEK293T cells were determined by using MTT analysis and AO/PI staining, and the change in HDAC activity and the anti-inflammatory response markers of this change, IL-6, IL-10 and its effect on TNF- α expression was evaluated using the ELISA method. In all cultures treated with VPA, HCQ and FVP, it was observed that cell viability was maintained and no cell death was observed. As a result of MTT analysis, it was observed that cell proliferation decreased at 24 and 48 hours in cultures treated with VPA and at 48 hours in cultures treated with HCQ, while cell proliferation decreased at 24 hours in cultures treated with FVP, but increased again at 48 hours. It was determined that HDAC activity was increased in all experimental groups compared to control; 20.42% at 24 hours and 5.77% at 48 hours in cultures treated with VPA, 53.16% at 24 hours and 54.43% at 48 hours in cultures treated with HCQ, and 164.22% at 24 hours and 198,16% at 48 hours in cultures treated with FVP. HCQ caused an increase in IL-10 expression, FVP caused an increase in IL-10 and IL-6 levels, and VPA administration especially increased TNF- α expression. As a result, it has been shown that the increase in HDAC activity causes changes in IL-10, IL-6 and TNF- α , the effect of VPA administration on TNF- α may be related to HDAC, but may be related to a different cellular pathway independent of IL-10 and IL-6 expression and important findings that have not yet been reported in the literature have been reported.

Keywords: Hydroxychloroquine, Favipiravir, Valproic Acid, HEK293T, COVID-19

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vii |
| SİMGELER DİZİNİ | viii |
| KISALTMALAR DİZİNİ | ix |
| TEŞEKKÜR | xi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Literatür Özeti | 2 |
| 1.1.1 HEK293T Hücre Hattı | 4 |
| 1.1.2 İlaçlar | 2 |
| 1.1.2.1 Hidroksiklorokin(HCQ)..... | 4 |
| 1.1.2.2 Favipiravir(FVP)..... | 5 |
| 1.1.2.3 Valproik Asit (VPA)..... | 6 |
| 1.1.3 Histon Deasetilaz (HDAC) | 7 |
| 1.1.4 Sitokinler..... | 9 |
| 1.1.4.1 İnterleukin 6 (IL-6)..... | 10 |
| 1.1.4.2 İnterleukin 10 (IL-10)..... | 13 |
| 1.1.4.3 Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF- α) | 15 |
| 1.2 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı | 17 |
| 2. MATERYAL VE METOT | 18 |
| 2.1 Kullanılan Cihazlar | 18 |
| 2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler | 18 |
| 2.3 Kullanılan Kitlerin İçerikleri..... | 19 |
| 2.3.1 ELISA Human IL-6 | 19 |
| 2.3.2 ELISA Human IL-10 | 20 |
| 2.3.3 ELISA Human TNF- α | 21 |
| 2.3.4 HDAC Aktivite Kolorimetrik Test Kiti..... | 21 |
| 2.3.5 MTT Hücre Proliferasyon Test Kiti | 22 |
| 2.4 Kullanılan Besiyeri | 22 |
| 2.4.1 DMEM..... | 22 |
| 2.5 Kullanılan Solüsyonlar..... | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5.1 %70 Etanol..... | 22 |
| 2.5.2 Stok BSA | 22 |
| 2.5.3 AO/PI Boyama Solüsyonu..... | 22 |
| 2.5.4 NETN Lizis Tamponu | 22 |
| 2.5.5 IL-6 ELİSA Solüsyonları | 23 |
| 2.5.5.1 <i>Kitte Hazır Olmayan Malzemelerin Hazırlanması</i> | 23 |
| 2.5.5.2 <i>Seyreltme Protokolü</i> | 23 |
| 2.5.6 IL-10 ELİSA Solüsyonları | 24 |
| 2.5.6.1 <i>Kitte Hazır Olmayan Malzemelerin Hazırlanması</i> | 24 |
| 2.5.6.2 <i>Seyreltme Protokolü</i> | 24 |
| 2.5.7 TNF- α ELISA Solüsyonları | 24 |
| 2.5.7.1 <i>Kitte Hazır Olmayan Malzemelerin Hazırlanması</i> | 24 |
| 2.5.7.2 <i>Seyreltme Protokolü</i> | 25 |
| 2.6 Yöntemler | 25 |
| 2.6.1 Hücre Kontrolü | 25 |
| 2.6.2 Hücre Lizatı Eldesi | 25 |
| 2.7 İlaç Uygulanması | 26 |
| 2.8 MTT Hücre Canlılık Analizi..... | 27 |
| 2.9 AO/PI Boyama..... | 28 |
| 2.10 Hücre Sayımı..... | 28 |
| 2.11 Protein Miktar Tayini ve Standart Grafik Hazırlanışı..... | 28 |
| 2.12 Kullanılan Kitlerin Uygulanışı..... | 28 |
| 2.12.1 IL-6 ELİSA Uygulama Protokolü | 29 |
| 2.12.2 IL-10 İçin ELİSA Uygulama Protokolü..... | 30 |
| 2.12.3 TNF- α için ELİSA Uygulama Protokolü | 32 |
| 2.12.4 HDAC Aktivite Kolorimetrik Test Kiti..... | 33 |
| 2.12.4.1 <i>HDAC Aktivite Kolorimetrik Test Kiti Uygulama Protokolü</i> | 33 |
| 2.12.5 MTT Hücre Proliferasyon Test Kiti | 34 |
| 2.12.5.1 <i>Kitte Hazır Olmayan Malzemeler</i> | 34 |
| 2.12.5.2 <i>MTT Hücre Proliferasyon Test Kiti Uygulama Protokolü</i> | 34 |
| 2.12.6 Protein Assay Kit..... | 34 |
| 2.12.6.1 <i>Standart Grafik Hazırlanışı</i> | 34 |
| 2.12.6.2 <i>Hücre Lizatlarında Protein Miktar Tayini</i> | 35 |
| 3. BULGULAR | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1 Hücre Kültürlerinde Hücre Canlılığı ve Proliferasyonunun Morfolojik Olarak Değerlendirmesi | 36 |
| 3.2 Hücre Kültürlerinde Hücre Canlılığı ve Proliferasyonunun MTT Analizi ile Değerlendirmesi | 38 |
| 3.3 Standart Grafik | 39 |
| 3.4 Protein Miktar Tayini | 40 |
| 3.5 HDAC ELİSA Sonuçları | 41 |
| 3.6 IL-6 ELİSA Sonuçları | 42 |
| 3.7 IL-10 ELİSA Sonuçları | 44 |
| 3.8 TNF- α ELİSA Sonuçları | 46 |
| 4. SONUÇ VE ÖNERİLER | 49 |
| KAYNAKLAR | 53 |
| ÖZGEÇMİŞ | 57 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 2. 1. Human IL-6 ELİSA kiti içeriği..... | 19 |
| Çizelge 2. 2. Human IL-10 ELİSA kitinin içeriği..... | 20 |
| Çizelge 2. 3. Human TNF- α ELİSA kiti içeriği | 21 |
| Çizelge 2. 4. HDAC aktivite kolorimetrik test kitinin içeriği..... | 21 |
| Çizelge 2. 5. MTT hücre proliferasyon test kiti içeriği..... | 22 |
| Çizelge 2. 6. NETN lizis tamponu içeriği..... | 23 |
| Çizelge 2. 7. MTT ve AO/PI testleri için VPA, HCQ ve FVP uygulama dozları..... | 27 |
| Çizelge 2. 8. ELİSA analizleri için uygulanan Valproic acid (VPA), hydroxychloroquine (HCQ) ve Favipiravir (FVP) uygulama dozları..... | 27 |
| Çizelge 3. 1.VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde MTT analizi sonucunda belirlenen % hücre canlılığı değerleri..... | 39 |
| Çizelge 3. 2. Protein miktar tayini için standart grafik oluşturulmasında kullanılan BSA konsantrasyonları ve elde edilen OD değerleri..... | 40 |
| Çizelge 3. 3. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde kültür süpernatantında protein miktarı ($\mu\text{g/ml}$)..... | 41 |
| Çizelge 3. 4. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde hücre lizatında protein miktarı | 41 |
| Çizelge 3. 5. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde HDAC miktarı yüzde değerleri..... | 41 |
| Çizelge 3. 6. Kit içeriğinde bulunan standart kullanılarak yapılan ölçümler sonucu elde edilen OD değerleri..... | 42 |
| Çizelge 3. 7. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde IL-6 miktarı yüzde değerleri..... | 43 |
| Çizelge 3. 8. Kit içeriğinde bulunan standart kullanılarak yapılan ölçümler sonucu elde edilen OD değerleri..... | 44 |
| Çizelge 3. 9. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde IL10 miktarı yüzde değerleri..... | 45 |
| Çizelge 3. 10. Kit içeriğinde bulunan standart kullanılarak yapılan ölçümler sonucu elde edilen OD değerleri..... | 46 |
| Çizelge 3. 11. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde TNF- α miktarı yüzde değerleri..... | 47 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1. 1. Sunulan tez çalışmasında kullanılan HEK293T hücrelerine ait inverted mikroskopi görüntüsü..... | 4 |
| Şekil 1. 2. Favipiravir kimyasal yapısı..... | 5 |
| Şekil 1. 3. İnsan HDAC'lerinin etki alanı organizasyonu..... | 8 |
| Şekil 1. 4. İnterlökin-6'nın topolojisi..... | 10 |
| Şekil 1. 5. IL-6 sitokini tarafından uyarılan sinyal yollarının şematik gösterimi..... | 12 |
| Şekil 1. 6. IL-10'un yanıt veren hücrelerdeki etkileri ve anti-imflamatuar yanıt..... | 14 |
| Şekil 1. 7. IL-10'un antiinflamatuar etki dışındaki fonksiyonları..... | 15 |
| Şekil 1. 8. İki TNF- α reseptörü, TNFR1 ve TNFR2 ve TNF- α (mTNF- α) aracılık ettiği tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) sinyal yolağına genel bakış..... | 16 |
| Şekil 3. 1. VPA, HCQ ve FVP uygulanan HEK293T hütlürlerinde invert mikroskopi ile hücre morfolojisi ve canlılığı..... | 37 |
| Şekil 3.2. VPA, HCQ ve FVP uygulanan HEK293T hütlürlerinde florasan mikroskopi ile AO/PI boyamaların incelenmesi..... | 38 |
| Şekil 3.3. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde MTT analizi sonucunda belirlenen % hücre canlılığı değerlerine ait bar grafik..... | 39 |
| Şekil 3.4. Sigmaplot yazılımı kullanılarak oluşturulan standart grafik..... | 40 |
| Şekil 3.5. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde HDAC miktarı yüzde değerlerine ait bar grafik..... | 42 |
| Şekil 3.6. IL-6 standart grafiğı..... | 43 |
| Şekil 3. 7. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde IL6 miktarı yüzde değerlerine ait bar grafik..... | 44 |
| Şekil 3. 8. IL-10 standart grafiğı..... | 45 |
| Şekil 3. 9. VPA, HCQ ve FVP Uygulanan Kültürlerde IL-10 miktarı yüzde değerlerine ait bar grafik..... | 46 |
| Şekil 3. 10. TNF- α Standart Grafiğı..... | 47 |
| Şekil 3. 11. VPA, HCQ ve FVP Uygulanan Kültürlerde TNF- α miktarı yüzde değerlerine ait bar grafik..... | 48 |

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|-----|-------------------------|
| °C | Derece Santigrat |
| kDa | Kilodalton |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| mM | Milimolar |
| ng | Nanogram |
| nm | Nanometre |
| pg | Pikogram |
| rpm | Dakikadaki Devir Sayısı |
| µl | Mikrolitre |
| α | Alfa |

KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|------------|---|
| AO/PI | Acridine Orange/ Propidium Iodide |
| BDNF | Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| COVID-19 | Koronavirüs Hastalığı 2019 |
| DMEM | Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medium'u |
| DNA | Deoksiribo Nükleik Asit |
| ELİSA | Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi |
| EPO | Eritropoietin |
| ESM | Ekstra Selüler Matriks |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| FVP | Favipiravir |
| GABA | Gama Aminobütirik Asit |
| G-CSF | Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör |
| GRH | Büyüme Hormonu |
| HAT | Histon Asetiltransferaz Enzimleri |
| HCQ | Hidroksiklorokin |
| HDAC | Histon Deasetilaz |
| HEK293T | İnsan Embriyonik Böbrek 293Hücre Hattı |
| IL-10 | İnterlökin, 10 |
| IL-6 | İnterlökin, 6 |
| JNK | Jun N Terminal Kinaz |
| LIF | Lösemi İnhibitör Faktör |
| MAPK | Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz |
| MTT | 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür Testi |
| OD | Optik Densite |
| OSM | Onkostatın M |
| PBS | Fosfat Tamponlu Salin |
| PI3K | Posfoinositid 3 Kinaz |
| PRL | Prolaktin |
| RdRp | RNA Bağımlı RNA Polimeraz |
| RNA | Ribo Nükleik Asit |
| SARS-CoV-2 | Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 |

| | |
|---------------|---|
| STAT | Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü |
| TACE | TNF- α -Dönüştürücü Enzim |
| TBS | Tris Tamponlu Salin |
| TMB | Renk Geliştirme Reaktifi |
| TNF- α | Tümör Nekroz Faktör |
| TYK2 | Tirozin Kinaz 2 |
| UV | Ultraviyole |
| VPA | Valproic acid |



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleşmesi ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana yön veren, hem akademik hem manevi anlamda destek ve emeklerini esirgemeyen, beni yüreklendiren, üzerimde büyük emeği olan, öğrencisi olmaktan her zaman onur duyacağım tez danışmanım sayın Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN'e;

Pandemi döneminin tüm kısıtlılıklarına rağmen uzaktan eğitim süresince büyük bir özveriyle bilgi birikimini şevkle paylaşan Prof. Dr. Cenk ARAL ve Prof. Dr. Rıfat BİRCAN'a;

Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan değerli hocalarıma;

Tez çalışmam süresince hem akademik hem de dost olarak yanımda olan Hande AKALAN'a;

Hayatım boyunca beni destekleyen ve her zaman yanımda olan haklarını asla ödeyemeyeceğim annem Nur ÖZERDEM ve babam Erdoğan ÖZERDEM'e;

Bu süreçte manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Selahaddin İLİK ve çalışmalarım sırasında yaşından büyük olgunlukla bana destek olan kızım Doğa İLİK'e gönülden ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özge ÖZERDEM İLİK

Biyoloji Öğretmeni

1. GİRİŞ

Hidroksiklorokin (HCQ) ve Favipiravir (FVP) antiprotozoal, antienflamatuar ve analjezik etkili ilaçlar olarak; 2019 yılı itibari ile tüm dünyayı hızla etkileyen ve büyük halk sağlığı endişelerine yol açan, COVID-19 olarak da adlandırılan yeni severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pandemisinin tedavisinde yerini almış durumdadır (Karaarslan vd., 2020; Boulware vd., 2020). Güncel araştırmalarda HCQ'nun, in-vitro olarak SARS-CoV-2 virüsünün replikasyonunu sınırladığı gösterildikten sonra (Meo, Klonoff ve Akram, 2020) özellikle son aylarda, sıklıkla reçete edilmektedir.

Kromatin ve DNA modifikasyonlarının transkripsiyonel düzeyde gen ifadesinin kontrolünü sağladığı bilinmektedir. Histon yapılarının amino kuyruklarında oluşan çeşitli post-translasyonel modifikasyonların aracılığı ile de proliferasyon dahil birçok biyolojik olay kontrol edilmektedir (Draker vd., 2012). Kromatin DNA modifikasyonlarının en önemlilerinden biri histon asetilasyonudur (Starkova vd., 2019). Asetilasyon ile histonların elektrostatik yükü değişmekte, böylece transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanması kolaylaşarak, histonun DNA'ya ilgisi azalmaktadır (Zhang vd., 2010). Histonların asetilasyon durumu, histon asetil transferaz ve histon deasetil transferaz enzim aileleri arasındaki ilişki dönüşebilir bir denge ile belirlenmektedir. HDAC enzimleri önemli hücresel olayları etkilemeleri nedeni ile potansiyel ilaçların hedefi olmuş ve bu enzimleri inhibe edebilen bileşikler tanımlanarak tedavi protokollerinde yerini almaya başlamıştır (Singh, Bishayee ve Pandey, 2018; Sartor vd., 2019; Xie, Tang ve Hill, 2019; Tsai vd., 2020, Harrison ve Dexter, 2013).

HDAC hücre bölünmesi, apoptoz ve farklılaşma gibi temel hücresel süreçler üzerinde etkiye sahip olup, HDAC enzim ailesinin hücre döngüsü düzenlenmesi, hücre çoğalması, sağkalım, farklılaşma, metabolizma, DNA tamiri gibi birçok biyolojik olayla ilişkili olması nedeni ile ilaç hedefi olma kapasitesi yüksektir. Bu nedenle de HDAC enzimlerinin aktivasyonlarının araştırılması popüler kazanmıştır (Singh, Bishayee ve Pandey, 2018; Sartor vd., 2019; Xie, Tang ve Hill, 2019; Tsai vd., 2020, Harrison ve Dexter, 2013). Bunlar arasında, başta kanser olmak üzere, spinal kaslar atrofi, Alzheimer hastalığı, Parkinson, diyabet, gibi farklı birçok hastalık gruplarının tedavilerine yönelik HDAC inhibitörleri ön plana çıkmıştır (Singh, Bishayee ve Pandey, 2018; Sartor vd., 2019; Xie, Tang ve Hill, 2019; Tsai vd., 2020, Harrison ve Dexter, 2013).

Epilepsinin yanı sıra bipolar ve duygudurum bozukluklarının tedavisi için klinik uygulamada kullanılan valproic asit (VPA), HDAC aktivitesini *invitro* ve *invivo* olarak inhibe eder ve histon hiperasetilasyonuna yol açar (Tian vd., 2019; Chen vd., 2018). VPA, organizma içindeki çok çeşitli fonksiyonları düzenleyen, çeşitli proteinlerdeki lizinden asetil gruplarının uzaklaştırılmasına katılan histon deasetilazları hedefler. Bu enzimlerin dengesizliği veya arızası, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilidir. VPA, karsinoma hücrelerinin farklılaşmasını indükler. VPA uygulamasının tümör büyümesi ve metastaz oluşumu önemli ölçüde azaltılabilir olduğu hayvan deneylerinde gösterilmiştir (Sixto-López, Bello ve Correa-Basurto, 2020).

Bu çalışmada HCQ veya Favipiravirin HDAC aktivitesi üzerine etkisi ve bu etkinin inflamasyondan kaynaklanıp kaynaklanmadığı HEK293T insan böbrek epitel hücre hattı modelinde araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmada HDAC aktivitesindeki değişiminin İnterloklin 6, İnterloklin 10 ve Tümör Nekroz Faktör α ifadesinde değişime neden olup olmadığı ELİSA yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

1.1. Literatür Özeti

1.1.1. HEK293T Hücre Hattı

İnsan embriyonik böbrek 293 hücreleri, genellikle HEK 293, HEK-293, 293 hücreleri veya HEK hücreleri olarak da adlandırılır, spontan olarak düşük materyali olan bir fetüsten elde edilen insan embriyonik böbrek hücrelerinden türetilen ölümsüzleştirilmiş spesifik bir hücre dizisidir (Kavsan, Iershov ve Balynska, 2011).

HEK 293 hücreleri, güvenilir büyümeleri ve transfeksiyon eğilimleri nedeniyle hücre biyolojisi araştırmalarında uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca biyoteknoloji endüstrisi tarafından gen tedavisi için terapötik proteinler ve virüslerin yanı sıra çok çeşitli kimyasallar için güvenlik testleri üretmek için kullanılırlar. 293T (veya HEK 293T), SV40 büyük T antijeninin mutant bir versiyonunu ifade eden bir türev insan hücre hattıdır (Shaw, Morse, Ararat ve Graham, 2002).

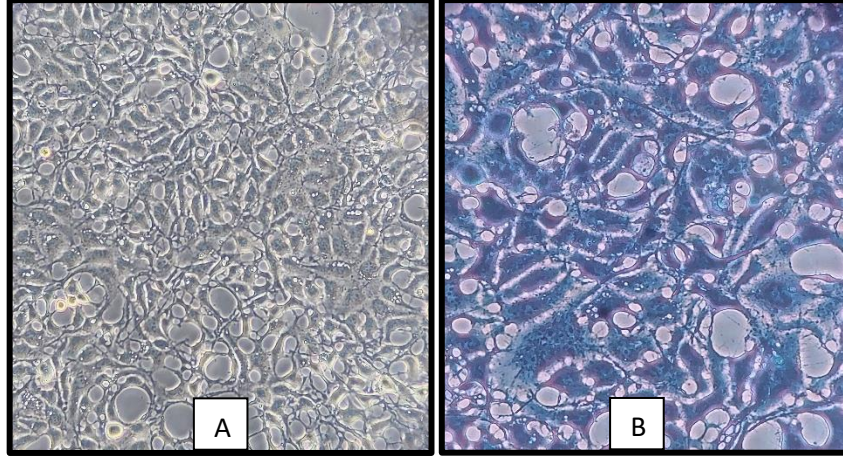
HEK 293 hücreleri, 1973 yılında Alex van der Eb'nin Hollanda, Leiden'deki laboratuvarında normal insan embriyonik böbrek hücrelerinin kültürlerinin parçalanmış adenovirüs DNA'sı ile transfeksiyonu yoluyla üretilmiştir (van der Eb A., 2017). Hücrelere adenovirüs ile transdüksiyon, van der Eb'in laboratuvarında post-doc olan Frank Graham

tarafından gerçekleştirildi. İnsan embriyonik böbrek kültürlerinden kaynaklandıkları için HEK olarak adlandırılırken, 293 sayısı deney numarasını ifade etmektedir (Graham, Smiley, Russell ve Nairn, 1977). Daha sonraki yıllarda yapılan analizler ~4.5 kilobaz büyüklüğünde viral genomun insan 19. kromozomuna eklendiğini göstermiştir (Louis, Eveleigh, Graham, 1997).

Uzun yıllar boyunca HEK 293 hücrelerinin, tümü böbreklerde bol miktarda bulunan fibroblastik, endotelial veya epitelyal bir hücrenin transformasyonu ile üretildiği varsayılmıştır. Graham ve arkadaşları, HEK 293 hücrelerinin ve insan embriyonik böbrek hücrelerinin adenovirüs transformasyonu ile üretilen diğer insan hücre dizilerinin olgunlaşmamış nöronların birçok özelliğine sahip olduğunu göstermişlerdir.

HEK 293 ve beş türev hücre hattının genomları ve transkriptomları üzerine kapsamlı bir çalışma, HEK 293 transkriptomunu insan böbrek, adrenal, hipofiz ve merkezi sinir dokusuyla karşılaştırdı (Lin vd., 2014). HEK 293 paterni, birçok nöronal özelliğe sahip olan adrenal hücrelerine çok benzemektedir. Adrenal bezin konumu göz önüne alındığında, embriyonik böbrek kaynaklı bir kültürde birkaç adrenal hücrenin ortaya çıkmış olduğu adenovirüs tarafından transforme edildiği düşünülmektedir. Adenovirüsler, nöronal soy hücrelerini tipik insan böbrek epitel hücrelerinden çok daha verimli bir şekilde dönüştürebilmektedir (Shaw vd., 2002). Bu nedenle, embriyonik bir adrenal öncü hücre, HEK 293 hattının en olası kaynak hücresi gibi görünmektedir. Sonuç olarak HEK 293 hücreleri, tipik böbrek hücrelerinin *invitro* modeli olarak kullanılmamalıdır.

HEK 293 hücreleri (Şekil 1. 1.), her bir kromozomun iki veya daha fazla kopyasını sergileyen ve kromozom sayısı 64 olan karmaşık bir karyotipe sahiptir. Bunlar, bir haploid insan gametinin kromozom sayısının üç katından daha azını içeren hipotriploid olarak tanımlanırlar. Kromozomal anormallikler, X kromozomunun toplam üç kopyasını ve kromozom 17 ve kromozom 22'nin dört kopyasını içerir (Lin vd., 2014). Birden fazla X kromozomunun varlığı ve Y kromozomundan türetilmiş herhangi bir dizi izinin bulunmaması, kaynak fetüsün dişi olduğunu göstermektedir. 293T hücre hattı, Stanford'daki Michele Calos laboratuvarında, HEK 293 hücre hattının, SV40 büyük T antijeninin sıcaklığa duyarlı bir mutantını kodlayan bir plazmit ile stabil transfeksiyonu yoluyla oluşturulmuş ve başlangıçta 293/tsA1609neo olarak adlandırılmıştır (DuBridgde vd., 1987).



Şekil 1. 1. Sunulan tez çalışmasında kullanılan HEK293T hücrelerine ait inverted mikroskopi görüntüsü (A. Boyama kullanılmamıştır, 20X büyütmede fotoğraflanmıştır, B. Janus yeşili ile boyanmıştır, 40X büyütmede fotoğraflanmıştır).

1.1.2. İlaçlar

Çalışmamızda kullanılan ilaçlar Hidroksiklorokin (HCQ), Favipiravir (FVP) ve Valproik Asit (VPA)' tir.

1.1.2.1. Hidroksiklorokin (HCQ)

Antimalaryal bir ajan olan Hidroksiklorokin (HCQ) antiinflamatuvar özelliğinden dolayı günümüzde otoimmün hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Farmokokinetiği büyük ölçüde açıklanmış olsa da etki mekanizmasında halen belirsizlikler mevcuttur (Both, van de Peppel ve Zillikens, 2018).

Dünya çapında ülkerin sert önlemler almasını gerektiren COVID-19 Pandemisine sebep olan şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARSCoV-2)' ye karşı bir aşı veya özel olarak geliştirilmiş bir antiviral mevcut olana kadar, hastalığı kontrol etme ve mortaliteyi azaltmak için tıp camiası harekete geçmiştir. Daha önce mevcut olan ilaçlardan Hidroksiklorokin (HCQ) bu amaçlarla kullanılması önerilen ilaçlar arasındadır. (Ibáñez, Martínez, Valenzuela, Silva ve Valenzuela, 2020)

HCQ ve klorokin'in bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi iyi bilinmektedir. Anti-enflamatuar mekanizmalarının birçoğu; lizozomal asitleştirme ve antijen sunumuna müdahale, fosfolipaz A2'nin inhibisyonu, absorpsiyon ve UV ışığı kutanöz reaksiyonları bloke etme, DNA'yı bağlama ve stabilize etme, toll benzeri reseptör sinyallerinin inhibisyonu, T ve B hücre

reseptörlerinin inhibisyonu ve özellikle interlökin 1 ve interlökin 6 gibi makrofajlar tarafından üretilen sitokinlerin azalması şeklindedir.

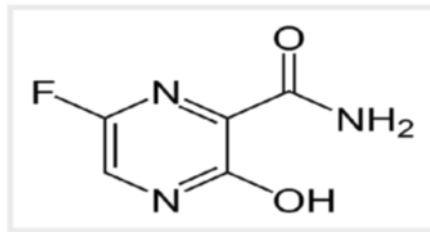
Toll benzeri reseptörler ve T hücresi reseptörleri ile etkileşim, hidrosiklorokin'i enflamatuar yanıtta sinyal kaskadının farklı bölgelerinde etkili kılar. Bu etkileşimler, hastada bağışıklığı baskılamadan otoimmüniteyi önler.

Hidrosiklorokin T hücrelerinde ve monositlerde IL-1 ve IL-6'nın inhibisyonunu ve tümör nekroz faktörü alfa inhibisyonunu ile inflammatuar etkiyi zayıflatabildiği gösterilmiştir. IL-6, IL-1 ve TNF- α gibi enflamatuar sitokinlerin etkili inhibisyonu, doku hasarını ve endotelial enflamasyonu azaltır, böylece otoimmün enflamasyonun başlamasını ve yayılmasını önler. Bu sitokin inhibisyonu, şu anda büyük önem taşımaktadır, çünkü birkaç virüsün *invitro* olarak IL-1, IL-6 ve TNF- α ekspresyonunu yukarı regüle ettiği gösterilmiştir. (Sinha ve Balayla, 2020)

1.1.2.2. Favipiravir (FVP)

Favipiravir; viral RNA'ya bağımlı RNA polimerazı seçici olarak inhibe eden ve dahil edildiğinde virüs RNA'sında ölümcül mutajeneze neden olan, bir nükleotid analogu gibi davranan etkili bir ajandır.

Kimyasal adı; 6-Floro-3-okso-3,4-dihidropirazin-2-karboksamid olan Favipiravir, T-705, Fapilavir ve favilavir isimleri ile de anılmaktadır. (Şekil 1. 2.) Favipiravir-RTP etki mekanizması nihai olarak viral transkripsiyonu ve replikasyonu önleyen RNA-bağımlı RNA polimerazına (RdRp) bağlanması ve inhibe etmesi ile açıklanmaktadır. İlacın yarı ömrü 2-5,5 saat, biyoyararlanımı %97,6'dır. %54 oranında plazma proteinlerine bağlanır, bir ön ilaç olarak işlev görür ve hücre içinde ribozilasyon ve fosforilasyona uğradığı bildirilmiştir.



Şekil 1. 2. Favipiravir kimyasal yapısı (Ghasemnejad-Berenji ve Pashapour, 2021)

2019 yılının sonunda Çin'in Wuhan kentinde görülmesinin ardından dünyada hızla yayılan akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARSCoV-2)' ye karşı spesifik bir antiviral

tedavi yoktur. Diğer viral enfeksiyonlar için onaylanmış veya geliştirilmekte olan ajanları kullanmak potansiyel olarak en hızlı yol olarak tercih edilmiştir. Favipiravir de bunlardan biridir. Favipiravirin, influenza viral RNA polimerazının seçici ve güçlü bir inhibitörü oluşu, nöraminidazlara duyarlı veya dirençli olanlar dahil diğer diğer RNA virüslerine karşı gösterdiği anti-viral aktiviteler ve sadece influenza değil oldukça geniş yelpazede RNA virüsüne karşı etkili olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında bir grup araştırmacı yaptığı çalışmalarda *invitro* olarak SARS-CoV-19 ile enfekte olmuş Vero E6 hücrelerinde favipiravirin viral replikasyonun azalttığını görmüştür. Hastalarıyla yapılan klinik deneylerde klirens süresinde azalma ve 7 gün sonunda ateş, öksürük insidansını daha etkili bir şekilde azaldığı görülmüştür. Ancak bu ilacın göz önünde bulundurulması gereken hematopoietik dokular üzerinde azalmış kırmızı kan hücreleri, karaciğer fonksiyon parametrelerindeki artışlar, testis toksisitesi, hamilelik durumunda teratojenik etkileri ile gibi yan etkileri vardır (Ghasemnejad-Berenji ve Pashapour, 2021).

Dünya çapında devam eden klinik çalışmalar ile Favipiravir'in klinik etkinliği, güvenliği ve COVID-19 pandemisinde terapötik yeri araştırılmaya devam etmektedir (Joshi vd.,2021).

1.1.2.3. Valproik Asit (VPA)

Valproik asit, bipolar bozukluğu olan kişilerde maniyi, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu olan çocuklarda saldırganlık patlamaları gibi belirli nöbet türlerini tedavi etmek; migren tipi baş ağrılarını önlemek için kullanılan antikonvülsanlar adı verilen bir ilaç sınıfındadır (<https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682412.html#side-effects>).

VPA, düşük moleküler ağırlıklı bir karboksilik asit olan valerik asitten türetilen dallanmış kısa zincirli bir yağ asididir. VPA'nın biyoyararlanımı, normal ve sürekli salımlı tabletler, film kaplı tabletler, kapsüller ve oral veya intravenöz solüsyonları içeren yaygın olarak kullanılan tüm formülasyonlar için %96 ila 100 arasında değişir. İnsanlarda VPA; glukuronidasyon, beta-oksidasyon ve sitokrom P450 (CYP) aracılı oksidasyon olmak üzere üç ana yolla metabolize edilmektedir. Keşfedilmesinden üzerinden bir asırdan fazla bir süre geçmesine rağmen hala en etkili antiepileptik ilaçlardandır. VPA'nın anti-epileptik, ruh halini dengeleyici ve nöroprotektif özelliklerini sağlayan geniş bir etki mekanizma yelpazesi bulunmaktadır. VPA'nın ana etki mekanizmalarından biri, gama-aminobütirik asidin ergic iletiminin pre-postsinaptik modülasyonu ile ilgilidir. Spesifik olarak, VPA, sinaptik GABA'nın

mevcudiyetini teşvik etmenin yanı sıra GABA aracılı tepkileri kolaylaştırarak hem pre-sinaptik hem de sinaptik sonrası mekanizmalarla GABA inhibe edici aktivitesini artırır. VPA'nın antiepileptik etkisinden bağımsız olarak hipokampus ve striatumdaki hücre dışı serotonin ve dopamin seviyesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle duygu durum bozukluklarının tedavisinde psikiyatri kliniğinde de sıklıkla kullanılmaktadır.

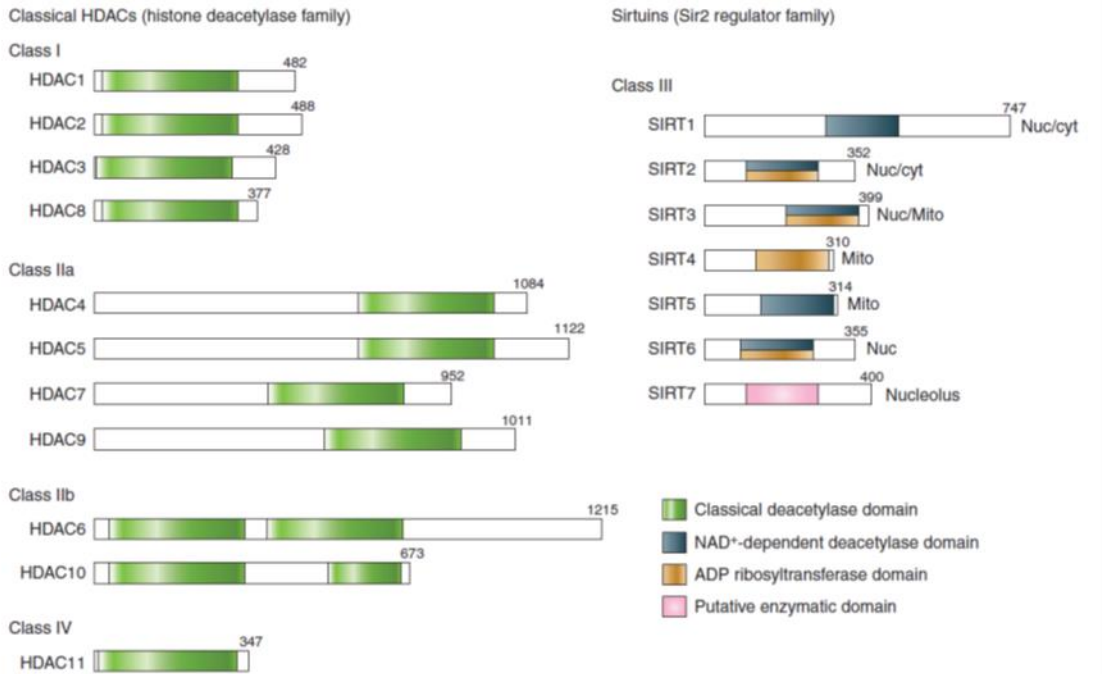
VPA iyon kanalları üzerinede etkili bir ilaçtır. VPA'nın antikonvülsan özelliği için kritik olan bu etki, sodyum, kalsiyum ve potasyum kanallarının modülasyonu ile, özellikle içe doğru sodyum akımlarında kullanıma bağlı bir azalma ile bağlantılıdır. Spesifik olarak, VPA özellikle nöronlarda hem kalıcı hem de hızlı sodyum akımlarını bloke eder. Bu özelliği nedeni ile de iskemik hasar durumunda nöron koruyucu bir tedavi sağlamak amacı ile de reçete edilmektedir.

Sinaptik yollar üzerindeki doğrudan modülasyonunun ötesinde, VPA'nın uzun vadeli etkileri de bulunmaktadır. VPA'nın epigenetik etki mekanizması; antikonvülsan aktivite, nöroprotektif etki ve nörogenezi düzenleme yeteneği gibi çeşitli özelliklerinin belirleyicisidir. VPA epigenetik etkilerinin ana yolları histon deasetilaz inhibisyonu ve beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BDNF) modülasyonudur. VPA, HDAC inhibisyonu yoluyla, DNA demetilasyonunu ve histon asetilasyonunu modüle ederek nükleozom durumunun ve kromatin yapısının yeniden düzenlenmesine neden olur. Ayrıca, VPA HDAC'ler aracılığıyla DNA transkripsiyonunu modüle ettiği için kanser tedavisinde kemoterapinin pozitif bir modülatörü olarak da etki gösterir (Romoli vd, 2019). Tüm bu etkilerinin yanı sıra HDAC inhibitörlerinin, SARS-CoV-2'nin hücreye girişini etkili bir şekilde engelleyebildiği de bildirilmiştir (Liu vd., 2020).

1.1.3. Histon Deasetilaz

Histonların posttranslasyonel modifikasyonu, gen ifadesinde veya kromatin yapısında işlevsel bir değişikliğe neden olabilmektedir. Histon modifikasyonunun yaygın bir biçimi ve aslında ilk keşfedilenlerden biri, lizinlerin amino grubunda, büyük ölçüde histonların amino-terminal kuyruğunda meydana gelen asetilasyondur. Birçok çalışmanın sonuçları, histon asetilasyonunun gen transkripsiyonunu düzenlediğini göstermektedir. Hücrede kendi kendini devam ettiren ve kalıtsal olan histonlarda meydana gelen asetillenmiş lizin kalıntılarının tam sayısı ve kombinasyonu bilinmemektedir. Bununla birlikte, histon asetilasyonunun bol miktarda potansiyel epigenetik bilgi kaynağı olduğu açıktır.

Histonlardaki lizin asetilasyonu oldukça geri dönüşümlüdür. Bir lizin yanzinciri, histon/lizin asetiltransferaz enzimlerinin (HAT'ler/KAT'ler) etkisiyle asetillenir ve histon deasetilazlar tarafından çıkarılır. İnsanlarda, dört sınıfa ayrılan 18 HDAC enzimi vardır: Sınıf I Rpd3 benzeri proteinler (HDAC1, HDAC2, HDAC3 ve HDAC8); Sınıf II Hda1 benzeri proteinler (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 ve HDAC10); Sınıf III Sir2 benzeri proteinler (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 ve SIRT7); ve Sınıf IV proteini (HDAC11) (Şekil 1. 3.). HAT'ler gibi, bazı HDAC'ler de substrat özgüllüğüne sahiptir. Yapılan çalışmalar, HDAC'lerin hepsi olmasa da birçoğunun histon olmayan proteinleri de asetile edebildiğini göstermektedir. Bu nedenle, bir HDAC'nin işlevini belirlemeye çalışırken bu gerçeği dikkate almak önemlidir.



Şekil 1. 3. İnsan HDAC'lerinin etki alanı organizasyonu. Her bir HDAC'deki toplam amino asit kalıntısı sayısı, her bir proteinin sağ tarafında gösterilir. Birçok HDAC'nin birden fazla izoformu vardır ve basit olması için yalnızca en uzun izoform gösterilmiştir. Enzimatik alanlar (veya varsayılan enzimatik alanlar) renklerle gösterilmiştir. Sirtuin yerelleştirmeleri: Nuc, nükleer; sit, sitoplazmik; Mito, mitokondial (Seto ve Yoshida, 2014).

Sınıf I ve II HDAC'ler ile insan klasik HDAC'leri ile önemli homoloji paylaşan farklı türlerden HDAC homologları arasındaki yapısal karşılaştırmalar, korunmuş bir aktif bölge bulunduğunu ortaya çıkararak asetillenmiş substratların metale bağlı hidrolizi için ortak bir mekanizma olduğunu göstermiştir.

HDAC'ler, proteinlerin lizinlerinden asetil gruplarını çıkararak, yalnızca transkripsiyonu değiştirmekle kalmaz, aynı zamanda metilasyon, ubikuitinasyon ve sumilasyon gibi alternatif posttranslasyonel lizin modifikasyonlarının kurulmasını veya silinmesini de destekler. Ek olarak, histon modifikasyonunun "çapraz konuşma" dinamiklerini değiştirebilirler. Birçok önemli hücrel enzim gibi, HDAC'ler de protein-protein etkileşimleri ve posttranslasyonel modifikasyonlar dahil olmak üzere çeşitli kontrol mekanizmalarına tabidir.

Kritik hücrel fonksiyonlarda yer alan hemen hemen tüm enzimler gibi, HDAC'lerin aktiviteleri de yüksek oranda düzenlenir. Bu düzenleme, transkripsiyon, posttranskripsiyon, translasyon ve posttranslasyonel düzeylerde çeşitli ve farklı mekanizmalar tarafından sağlanır. HDAC düzenlemesinin en iyi tanımlanmış mekanizmaları, protein-protein etkileşimleri ve posttranslasyonel modifikasyonlardır. Daha az çalışılan ancak belki de eşit derecede önemli olan, bazı HDAC'lerin ekspresyon kontrolü, alternatif RNA ekleme, kofaktörlerin mevcudiyeti, hücre içi lokalizasyon ve proteolitik işleme yoluyla düzenlenmesidir.

Anormal HDAC'ler birçok insan hastalığında önemli bir rol oynar. HDAC'lerin işlev ve mekanizmalarının tam olarak anlaşılması, bu enzim ailesinin insan sağlığı ve hastalığı üzerindeki etkilerini daha iyi anlamamız için bir önkoşul karşımıza çıkmaktadır. HDAC inhibitörlerinin mevcudiyeti, HDAC fonksiyonlarını ve etki mekanizmasını anlamamızı sağlayacak birçok çalışmanın yapılabilmesini sağlamıştır. HDAC aktivitesini inhibe eden bir dizi bileşik geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir. VPA gibi HDAC aktivitesini inhibe eden bu ajanlar hücre büyümesinin durmasına, farklılaşmasına ve/veya apoptosise neden olurlar ve hayvanlarda tümör büyümesini kısıtlarlar. Buna paralel olarak araştırmalar, epigenetik anormalliklerin çok sayıda insan hastalığıyla sıkı bir şekilde ilişkili olduğunu giderek daha fazla göstermekte ve bu da HDAC inhibitörleri gibi epigenetik tabanlı tedavilerin kullanımı için bir gerekçe sağlamaktadır (Seto ve Yoshida, 2014).

1.1.4. Sitokinler

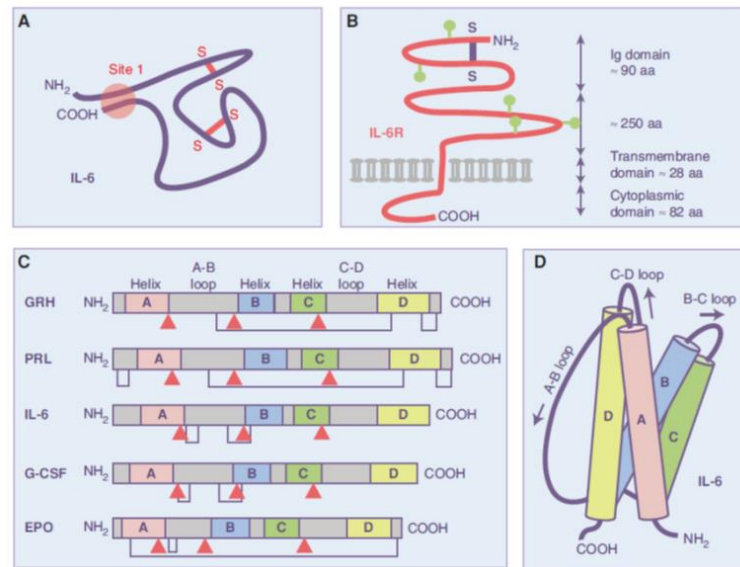
Sitokinler otokrin, parakrin ve endokrin sinyalleşmede önemli rol oynayan kısa ömürlü küçük (15-20 kDa) proteinlerdir. Sitokinler bağışıklık sisteminin gelişimi ve aktivitesini koordine eder. Birçok sitokin, benzer topolojiye sahip dört alfa-sarmal zinciri içerir (Şekil 1.4.). Ayrıca sitokinler, reseptör komplekslerinin yapısına, özgüllüğüne ve bileşimine göre aileler halinde gruplandırılır. Sitokinler sıklıkla diğer sitokinler için bir alt birimin de bulunduğu

multimerik reseptör komplekslerine bağlanır. Çünkü ortak reseptör alt birimleri, hücre içi sinyal iletiminde benzerlik ve hatta özdeşlik anlamına gelir. Dört sarmal sitokin sınıfı, 35'ten fazla interlökin ve büyüme hormonu, prolaktin, leptin, eritropoietin, trombopoietin, lösemi inhibitör faktör (LIF) ve onkostatın M (OSM) gibi adlara sahip birçok aracından oluşur. Ayrıca, tüm interferonlar ve birçok koloni uyarıcı faktör, toplamda 60'tan fazla üye içeren bu sitokin sınıfına aittir.

İnterlökin (IL)-6 ailesi sitokinleri, ortak sinyalleme reseptörü alt birimi glikoprotein 130 kDa (gp130) kullanan sitokinler olarak tanımlanır. Şu anda, sekiz sitokin bu kriteri karşılamaktadır, ancak aşağıda açıklanacağı gibi, IL-6 familyası sitokin grubu hala genişlemektedir ve gp130 içeren komplekslerin tanımının revize edilmesi gerekmektedir.

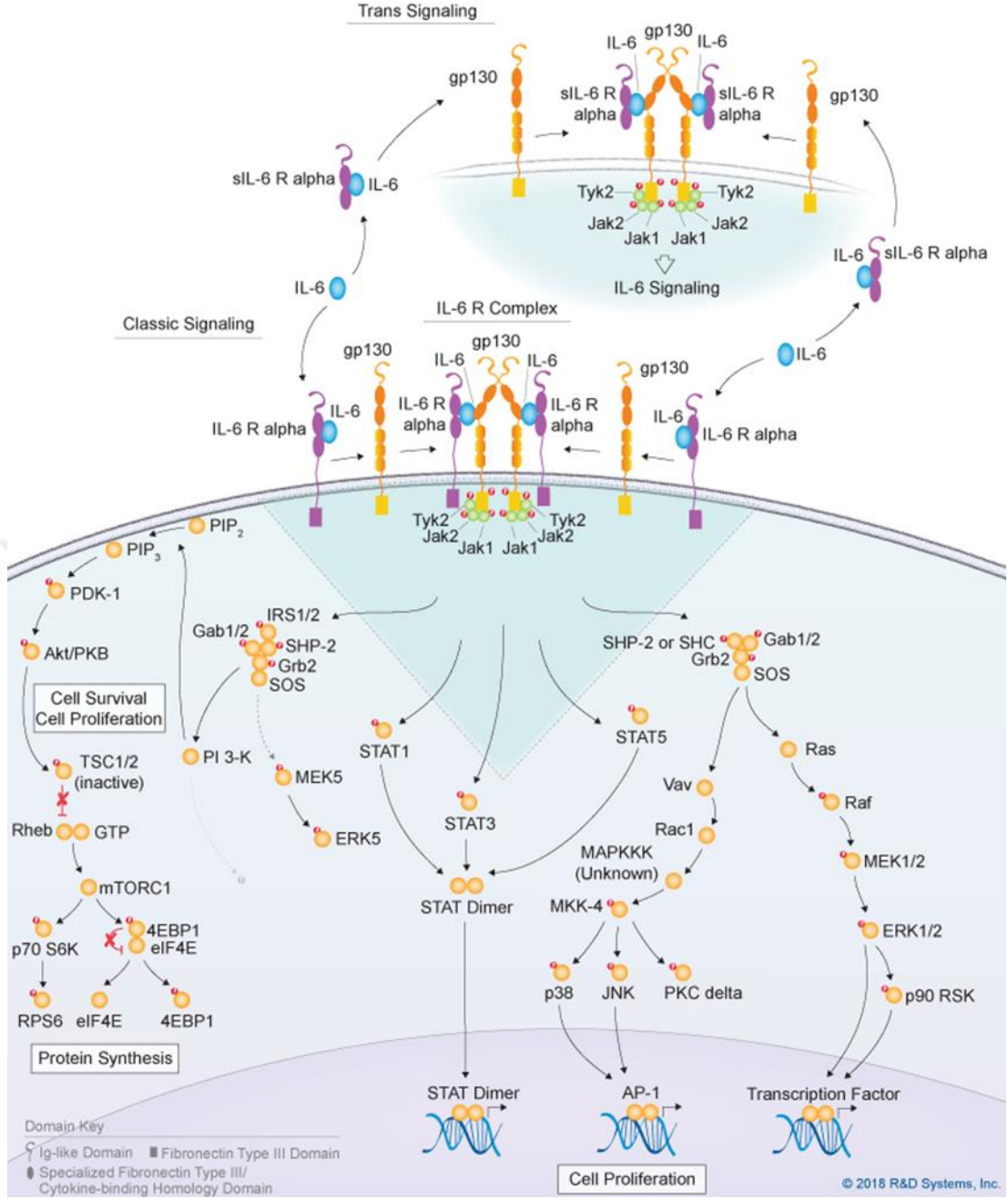
1.1.4.1. İnterleukin 6 (IL-6)

İnflamasyon, immün yanıt ve hematopoez üzerinde pleiotropik etkiye sahip çözünür bir araçtır. IL-6 ailesi sitokinleri, B hücresi uyarımı ve hepatik akut faz proteinlerinin uyarılması dahil olmak üzere birçok fonksiyonda yer almıştır. Ayrıca, bu sitokin grubuna metabolik fonksiyonlar ve nörotrofik fonksiyonlar atfedilmiştir (Rose-John, 2018).



Şekil 1. 4. İnterlökin-6'nın topolojisi (A) IL-6 fonksiyonel yapısı; NH₂ terminali ile COOH terminalinin biyolojik aktif IL-6 proteininde birbirine yakın bulunmaktadır. Varsayılan disülfid köprüleri kırmızı ile gösterilmiştir. (B) IL-6 reseptörünün (IL-6R) yapısı; Varsayılan tek bir disülfid köprüsü mavi renkle gösterilmiştir. Öngörülen N-glikosilasyon bölgeleri yeşil renkle gösterilmiştir. (C) büyüme hormonu (GRH), prolaktin (PRL), IL-6, granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) ve eritropoietin (EPO) protein domen benzerlikleri;(kırmızı ok) ekzon-intron sınırı (D) IL-6'nın yukarı/yukarı-aşağı/aşağı topolojili dört sarmallı bir sitokin modeli.

Klasik IL-6 sinyali, IL-6'nın, sinyal ileten gp130 reseptör alt birimi ile ilişkisini tetikleyen IL-6'ya özgü reseptör alfa alt biriminin (IL-6 R α) zara bağlı formuna bağlanmasıyla başlatılır. gp130'un IL-6-IL-6 R alfa kompleksi ile birleşmesi, gp130 dimerizasyonunu ve 2:2:2 oranında IL-6/ IL-6 R alfa ve gp130'dan oluşan bir heteroheksamerik kompleksin oluşumunu teşvik eder. Klasik IL-6 sinyali, zara bağlı IL-6 R alfanın ifadesine dayandığından, birincil olarak hepatositler, makrofajlar, nötrofiller ve dinlenme lenfositlerinde bulunmaktadır. Bununla birlikte IL-6, gp130'u ifade eden ancak IL-6 R alfa ifadesi olmayan hücrelerde trans-sinyali aktive edebilir. Bu, IL-6'nın, alternatif eklemeye veya proteolitik bölünme ile üretilen çözünür bir IL-6 R alfa formuna bağlanmasını gerektirir. IL-6/çözünür IL-6 R alfa kompleksi daha sonra gp130 ekspresyon eden hücrelerde IL-6 sinyal yollarını trans-aktive edebilir. gp130 her yerde ifade edildiğinden, trans-sinyalleme daha geniş bir hücre aralığının IL-6'ya yanıt vermesine izin verir. IL-6 klasik veya trans-sinyal ligand-reseptör komplekslerinin oluşumu, Jak-STAT yolu, Ras-MAPK yolu, p38 ve JNK MAPK yolları, PI 3-K dahil olmak üzere çoklu hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar. Hem klasik hem de trans-sinyal alıcı kompleksleri, benzer hücre içi sinyal yollarını aktive etse de birkaç çalışma, IL-6'nın anti-inflamatuar ve rejeneratif etkileri için klasik sinyalin gerekli olduğunu, IL-6 trans-sinyalinin ise pro-inflamatuar yanıtları desteklediğini öne sürmektedir (Şekil 1. 5.).



Şekil 1. 5. IL-6 sitokini tarafından uyarılan sinyal yollarının şematik gösterimi. (Anonim: <https://www.rndsystems.com/pathways/il-6-family-signaling-pathways>)

IL-6 İfadesi hücrede transkripsiyonel olarak kontrol edilmesine rağmen ve transkripsiyon sonrası mekanizmalar, IL-6'nın düzensiz sürekli sentezi kronik inflamasyon ve otoimmünite üzerinde patolojik bir etki yapar. (Tanaka, Narazaki ve Kishimoto, 2014). IL-6 ailesi sitokinlerinin blokajının otoimmün hastalıklarda faydalı olduğu görülmüştür ancak bakteriyel enfeksiyonlar ve metabolik yan etkiler ortaya çıkmıştır (Rose-John, 2018).

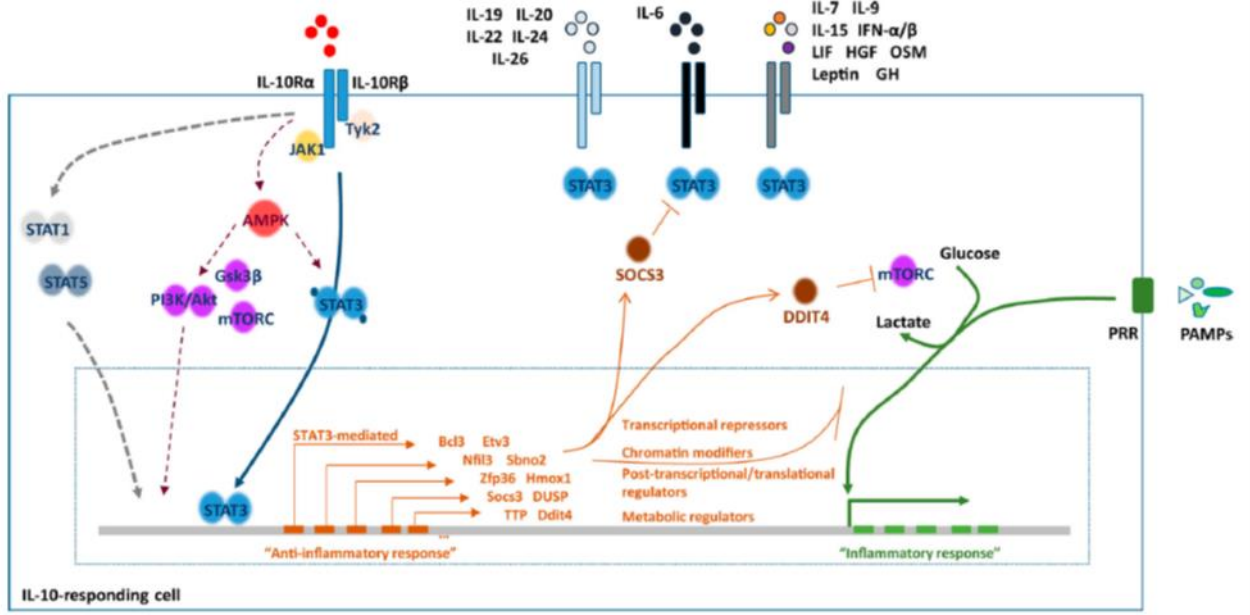
1.1.4.2. İnterleukin 10 (IL-10)

Bağışıklık sistemi, enfeksiyonla savaşırken konak hasarını en aza indirmek üzerine evrimleşmiştir. Etkili bir bağışıklık tepkisi ile doku patolojisinin ortaya çıkışı arasındaki hassas dengeyi sağlamak için çeşitli düzenleyici mekanizmalar mevcuttur. IL-10'un oluşturduğu anti-inflamatuar yanıt, böyle bir mekanizmadır. IL-10; IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28A, IL-28B ve IL-29 'u da içeren bir sitokin ailesinin kurucu üyesidir. IL-10'un birçok hastalığa dahil olduğu, hem hayvan modellerinde hem de IL-10/IL-10R ekseninde mutasyonlara sahip insanlarda gösterilmiştir.

IL-10'un ilk olarak yardımcı T (Th) hücre klonları tarafından üretilen ve salgılanan bir sitokin sentezi inhibe edici faktör olduğu ve sitokin üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Daha sonra CD4 ve CD8 T hücrelerinde bu sitokini salgıladıkları belirlenmiştir. Sitokin IL-10, bir konağın patojenlere aşırı tepkilerden korunmasını sağlayan önemli bir anti-inflamatuar araçtır.

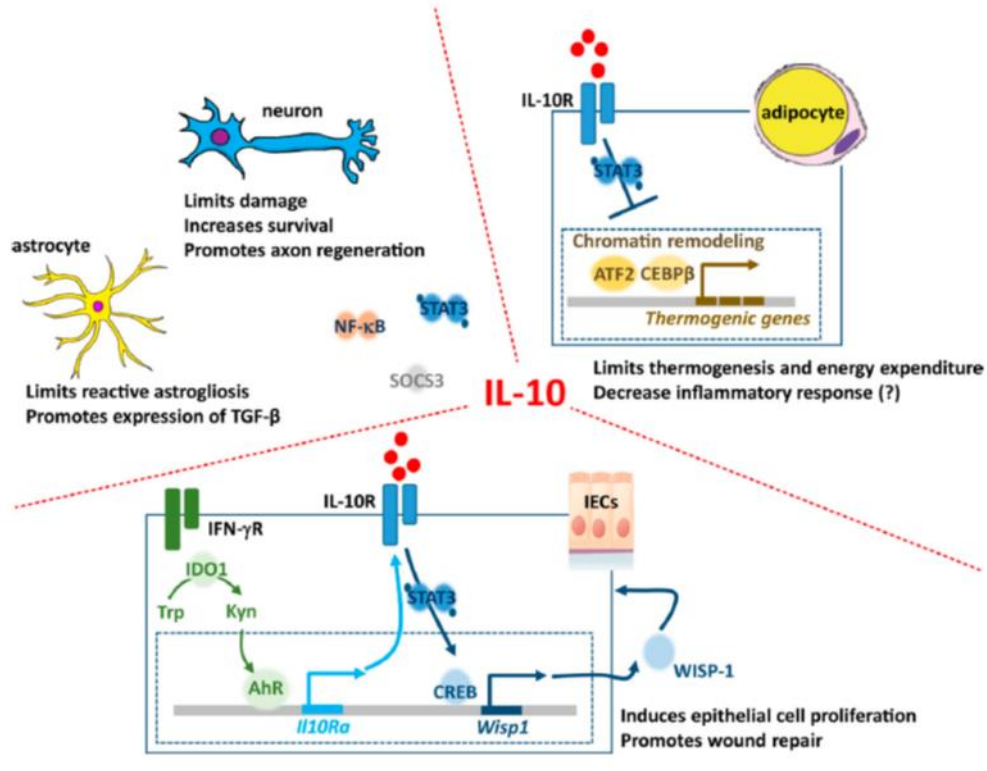
IL-10'un ekspresyonu, fazlalığı veya eksikliği ile ilgili hastalıkları önlemek için sıkı bir şekilde düzenlenir. Spesifik sinyal yollarının tetiklenmesi, belirli transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu ve aktivasyonu ve transkripsiyon sonrası ve epigenetik düzenleme dahil olmak üzere hem yaygın hem de hücreye özgü düzenleyici mekanizmalar, IL-10'un uygun üretimini sağlar. MAPK, IL-10'u düzenleyen anahtar yollar arasındadır. NF- κ B ailesi üyeleri ve fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) /serin/treonin protein kinaz B (Akt) kaskadı da IL-10 ekspresyonunu düzenler.

IL-10'a hücreyel yanıt, IL-10R'nin ve hücre içi sinyalleşme kaskadlarının bağlanmasına bağlıdır (Şekil 1.6). IL-10, diğer aile üyeleri gibi, bir heterodimerik reseptör aracılığıyla sinyal verir. IL-10R α 'ya ligand bağlanması, IL-10R β alt birimi ile oligomerizasyonuna yol açar. Bu da, IL-10R α alt birimi ile ilişkili JAK1'in ve IL-10R β alt birimi ile ilişkili tirozin kinaz 2'nin (TYK2) fosforilasyonuna izin verir. Bu kinazlar STAT3'ün fosforilasyonu ile aktivasyonu ve çekirdeğe translokasyonu ile IL-10 aracılı anti-enflamatuar yanıtı büyük ölçüde tanımlayan spesifik bir transkripsiyonel programın başlatılmasını sağlamaktadır.



Şekil 1. 6. IL-10'un yanıt veren hücrelerdeki etkileri ve anti-imflamatuar yanıt

Anti-inflamatuar yanıt dışında IL-10'un farklı hücre tiplerinde alışlagelmişin dışında etkileri olduğuda belirlenmiştir. IL-10'un önemli homeostatik roller oynadığı hematopoietik olmayan hücrelerde de etki ettiği artık açıktır. Bunun bir örneği, IL-10'a ve diğer IL-10 ailesi üyelerine yanıt veren merkezi sinir sistemi (CNS) ve periferik sinir sistemi hücrelerinde gösterilmiştir. IL-10, homeostatik süreçlerin düzenlenmesinin yanı sıra enfeksiyon veya diğer enflamatuar süreçler sırasında nöronal hasarın engellenmesinde de önemli roller oynar. IL-10, artan nöronal hayatta kalma ve yetişkin nörojenezinin düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. Son olarak, IL-10'un nöronları iskemi ve travmaya karşı koruduğu da gösterilmiştir. IL-10'un işlev gördüğü başka bir klasik olmayan fonksiyonu yağ dokusunun düzenlenmesi ile ilgilidir. Adipositlerdeki IL-10 sinyalinin, termojenezi ve enerji harcamasını sınırladığı çarpıcı bir şekilde gösterilmiştir (Şekil 1. 7.). Ayrıca IL-10'un bir rolüde epitelyal yara onarımını destekleyici işleviyle ilgilidir. Bu işlevin IL-10 aracılı antiinflamatuar etki ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir ve son kanıtlar IL-10'un epitelyal yara onarımının düzenleyicisi olarak ek bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.



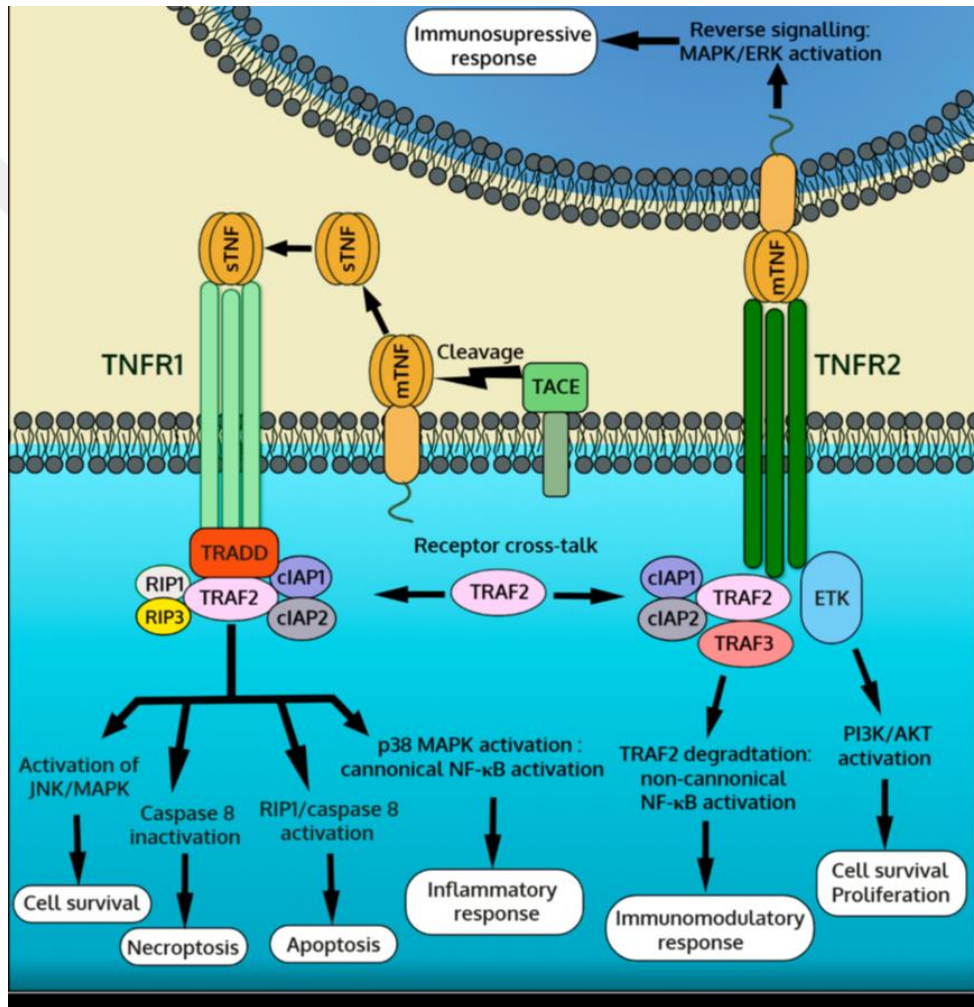
Şekil 1. 7. IL-10'un antiinflamatuvar etki dışındaki fonksiyonları (Saraiva, Vieira ve O'garra, 2020)

1.1.4.3. Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF- α)

Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), çeşitli hücre tipleri üzerinde pleiotropik etkileri olan bir sitokindir. Enflamatuvar yanıtların ana düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır ve bazı enflamatuvar ve otoimmün hastalıkların patogeneğinde yer aldığı bilinmektedir. TNF- α özellikle aktive edilmiş makrofajlar, T-lenfositler ve doğal öldürücü hücreler tarafından üretilen, yapısal olarak 157 amino asitten oluşan bir homotrimer proteindir. Diğer sitokinler ve kemokinler dahil olmak üzere bir dizi çeşitli enflamatuvar molekülü uyardığı bilinmektedir. TNF- α çözünebilir ve transmembran formda bulunur. Transmembran TNF- α (tmTNF- α), başlangıçta sentezlenen öncü formdur ve çözünebilir TNF- α (sTNF- α) olarak salınması için, zara bağlı bir disintegrin metaloproteinaz olan TNF- α dönüştürücü enzim (TACE) tarafından işlenmesi gerekir. İşlenen sTNF- α daha sonra tip 1 reseptörler (TNFR1, TNFRSF1A, CD120a ve p55 olarak da bilinir) ve tip 2 reseptörler (TNFR2, TNFRSF1B, CD120b ve p75 olarak da bilinir) aracılığıyla çeşitli biyolojik aktiviteleri gerçekleştirir (Şekil 1. 8.).

tmTNF- α aynı zamanda hem TNFR1 hem de TNFR2 üzerinde etkilidir, ancak biyolojik aktivitelerinin esas olarak TNFR2 aracılığıyla olması beklenmektedir. TNFR1, tüm insan

dokuları tarafından eksprese edilir ve TNF- α için anahtar sinyal reseptörüdür. TNFR2 genellikle bağışıklık hücrelerinde eksprese edilir ve sınırlı biyolojik tepkileri kolaylaştırır. Genel olarak TNF- α , başta TNFR1 ve TNFR2 olmak üzere reseptörlerine bağlanır ve daha sonra enflamasyon ve hücre ölümü gibi biyolojik işlevler için moleküler sinyaller iletir. TNFR1, hem sTNF- α hem de mTNF- α tarafından aktive edilir (Jang vd.,2021). TNF- α uyarımı hücrelerde sağ kalım, nekroptosis, apoptozis, inflamatuvar yanıt, immün düzenleyici cevap ve proliferasyon ile ilgili birçok yolağın aktive olması ve bu süreçler ile ilgili genlerin ifade edilmesini sağlamaktadır (Rolski ve Błyszczuk, 2020).



Şekil 1. 8. İki TNF- α reseptörü, TNFR1 ve TNFR2 ve TNF- α (mTNF- α) aracılık ettiği tümör nekroz faktörü-a (TNF- α) sinyal yolağına genel bakış (Rolski ve Błyszczuk, 2020).

Bir diğer inflamatuvar sitokinin olan IL-6 ile beraber TNF- α , COVID-19’da aşırı üretim ile inflamasyon, hiperkoagülasyon ve çoklu organ disfonksiyonu sendromuna neden olur (Pecly vd., 2021).

1.2. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Bu araştırmada, histon deasetilaz enzim inhibitörü olan Valproic acid ile birlikte COVID-19 tedavisinde sıklıkla kullanılan hydroxychloroquine ve favipiravirin bir insan embriyonik böbrek hücre hattı olan HEK293T kültürlerinde invitro etkileri değerlendirilmiştir.

Çalışmada HEK293T kültürlerine VPA, HCQ ve FVP uygulanması bu uygulamaların hücre canlılığı, çoğalması ve ekstra selüler matriks (ESM) yapısı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla MTT analizi ve AO/PI boyamaları kullanılmıştır. Aynı zamanda uygulama yapılan kültürlerde HDAC aktivitesinde ve inflamasyon belirteci olan IL-6, IL-10 ve TNF- α düzeylerinde değişim olup olmadığı ELİSA yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarının pandemi sırasında sıklıkla ve yüksek dozlarda kullanılan bu ilaçların olası etkilerinin değerlendirilmesi açısından literatüre katkı sağlaması beklenmektedir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Kullanılan Cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (Class II), Nüve, Türkiye
- Buzdolabı, Profilo, Türkiye
- CO2 etüv, Thermo, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)
- Çalkalayıcı su banyosu, Nüve, Türkiye
- Derin dondurucu -20°C , Vestel, Türkiye
- Distile su cihazı, GFL, Almanya
- Isısal döngüleme cihazı, Techne TC5000, İngiltere
- İnvirt mikroskop, Olympus, Almanya
- Kırık buz makinasi, Fiocchetti, İtalya
- Mini mikrosantrifüj, Cleaver, Güney Kore
- Neubauer lamı, Marienfeld, Almanya
- Optik mikroskop, Leica DM 2500, Almanya
- Otoklav, Hirayama, Japonya
- Otomatik pipet seti, Axygen axypet, Kanada
- Soğutmalı santrifüj, Nüve, Türkiye
- Vorteks, WiseMix, Kore

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Amfoterisin B, Multicell, Kanada
- Etanol, Sigma, ABD
- Fetal Sığır Serum (FBS), Multicell, Kanada
- L-glutamin, Multicell, Kanada
- Penisilin/Streptomisin, Sigma, ABD
- DMEM, Sigma, ABD
- Tripan mavisi, Fluka, ABD
- Plaquenil 200 mg (Etkin madde: Hidroksiklorokin sülfat), Sanofi İlaç, TR
- Depakin Chrono BT 500 mg, (Etkin madde: Sodyum valproat 333 mg, Valproik asit 145 mg), Sanofi İlaç, TR
- Favicovir 200 mg (Etkin madde: Her bir tablet 200 mg Favipiravir). Atabay İlaç,TR

2.3. Kullanılan Kitlerin İçerikleri

2.3.1. Human IL-6 ELİSA Kiti

Human IL-6 ELİSA kitinin içeriği Çizelge 2. 1’de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Human IL-6 ELİSA kit içeriği

| İçerik | Miktar | Hacim |
|---|---------------|-------------------------|
| Anti-Human IL-6 Pre-coated 96-well Strip | 1 | 12 sıra 8 kuyu |
| Human IL-6 Standard | 2 | 10 ng/tube |
| Human IL-6 Biotinylated Antibody (100x) | 1 | 130 µl |
| Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (100x) | 1 | 130 µl |
| Sample Diluent | 1 | 30 ml |
| Antibody Diluent | 1 | 12 ml |
| Avidin-Biotin-Peroxidase Diluent | 1 | 12 ml |
| Color Developing Reagent (TMB) | 1 | 10 ml |
| Stop Solution | 1 | 10 ml |
| Wash Buffer (25x) | 1 | 1000 ml için toz paketi |
| Plate Sealers | 4 | Adet |

2.3.2. Human IL-10 ELİSA Kiti

Human IL-10 ELİSA kiti içeriği Çizelge 2. 2.'de verilmiştir.

izelge 2. 2. Human IL-10 ELİSA kiti içeriği

| İçerik | Adet | Hacim |
|---|-------------|-------------------------|
| Anti-Human IL-10 Pre-coated 96-well Strip microplate | 1 | 12 sıra 8 kuyu |
| Human IL-10 Standard | 2 | 10 ng/tube |
| Human IL-10 Biotinylated Antibody (100x) | 1 | 130 µl |
| Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (100x) | 1 | 130 µl |
| Sample Diluent | 1 | 30 ml |
| Antibody Diluent | 1 | 12 ml |
| Avidin-Biotin-Peroxidase Diluent | 1 | 12 ml |
| Color Developing Reagent (TMB) | 1 | 10 ml |
| Stop Solution | 1 | 10 ml |
| Wash Buffer | 1 | 1000 ml için toz paketi |
| Plate Sealers | 4 | Adet |

2.3.3. Human TNF- α ELİSA Kiti

Human TNF- α ELİSA kitinin içeriği Çizelge 2. 3.'te verilmiştir.

Çizelge 2. 3. Human TNF- α ELİSA kiti içeriği

| İçerik | Adet | Hacim |
|---|------|-------------------------|
| Anti-Human TNF Pre-coated 96-well Strip microplate | 1 | 12 sıra 8 kuyu |
| Human TNF Standard | 2 | 10 ng/tube |
| Human TNF Biotinylated Antibody (100x) | 1 | 130 μ l |
| Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (100x) | 1 | 130 μ l |
| Sample Diluent | 1 | 30 ml |
| Antibody Diluent | 1 | 12 ml |
| Avidin-Biotin-Peroxidase Diluent | 1 | 12 ml |
| Color Developing Reagent (TMB) | 1 | 10 ml |
| Stop Solution | 1 | 10 ml |
| Wash Buffer | 1 | 1000 ml için toz paketi |
| Plate Sealers | 4 | Adet |

2.3.4. HDAC Aktivite Kolorimetrik Test Kiti

HDAC aktivite kolorimetrik test kitinin içeriği Çizelge 2. 4.'te verilmiştir.

Çizelge 2. 4. HDAC aktivite kolorimetrik test kitinin içeriği

| İçerik | 100 Tahlil İçin Miktar |
|---------------------------------------|------------------------|
| HDAC Substrate | 500 μ l |
| 10X HDAC Assay Buffer | 1.0 ml |
| Lysine Developer | 1.0 ml |
| HDAC Inhibitor (Trichostatin A, 1 mM) | 10 μ l |
| HeLa Nuclear Extract (5 mg/ml) | 50 μ l |
| Deacetylated Standard (10 mM) | 20 μ l |

2.3.5. MTT Hücre Proliferasyon Test Kiti

MTT hücre proliferasyon test kiti içeriği Çizelge 2. 5.'te verilmiştir.

Çizelge 2. 5. MTT hücre proliferasyon test kiti içeriği

| Madde | Adet | Hacim |
|---|---------|--------|
| MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MW = 414) | 10 şişe | 5 mg |
| SDS sodyum dodesil sülfat (MW = 288) | 10 şişe | 1 gram |

2.4. Kullanılan Besiyeri

2.4.1. DMEM (Sigma, ABD)

- %10 fetal sığır serum
- %1 L-glutamin
- 100 µg/ml Penisilin – streptomisin
- 100 µg/ml Amfoterisin B

500 ml steril DMEM bulunan beher içerisine 50 ml FBS, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penisilin-streptomisin ve 5 ml amfoterisin B ilave edildi.

2.5. Kullanılan Solüsyonlar

2.5.1. %70 Etanol

70 ml etanol üzerine 30 ml distile su ile tamamlandı.

2.5.2. Stok BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma)

0,1 gram toz BSA tartılıp ve son hacim 10 ml olacak şekilde bidistile suyla tamamlandı. -20°C'de saklandı.

2.5.3. AO/PI Boyama Solüsyonu

0g sodyum-etilendiamintetraasetik asit, 4 mg PI ve 50 ml FBS ile hazırlanan AO/PI boyası, 4 mg AO (2ml %99 ETOH içinde çözülmüş) iyice karıştırılmış ve 200 ml nihai hacme ulaşmak için steril damıtılmış su ilave edilmiştir.

2.5.4.NETN Lizis Tamponu

Hücre lizatlarının hazırlanmasında kullanılan NETN Lizis tamponu Çizelge 2. 6.'da belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 2. 6. NETN lizis tamponu içeriği

| Stok | Hacim | Final Hacim |
|-----------------------|---------|-------------|
| 5 M NaCl | 5 mL | 250 mM |
| 0.5 M EDTA, pH 8.0 | 1 mL | 5 mM |
| 1 M Tris-HCl, pH 8. | 0.5 mL | 50 mM |
| NP-40 (IGEPAL CA-630) | 0.5 mL | 0.5% |
| dH ₂ O | 88.5 mL | |

2.5.5. IL-6 ELİSA Solüsyonları

2.5.5.1. Kitte Hazır Olmayan Malzemelerin Hazırlanması

- Yıkama tamponu (nötr PBS veya TBS)
- 0.01M TBS hazırlanması: 1.2g Tris, 8.5g NaCl; 450 µl saflaştırılmış asetik asit veya 700 µl konsantre HCl 1000 ml suya tamamlanır.
- 0.01M PBS hazırlanması: 8.5g NaCl, 1.4 NaH₂PO₄ 1 litre distile su ile hazırlanır. pH 7.2'ye ayarlanır.

2.5.5.2. Seyreltme Protokolü

- 1-8 numaralı tüpler nihai konsantrasyonları; 1. Tüpte 300 pg/ml, 2. tüpte 150 pg/ml, 3. tüpte 75 pg/ml, 4. tüpte 37.5 pg/ml, 5. tüpte 18.75 pg/ml, 6. tüpte 9.38 pg/ml, 7. tüpte 4.69 pg/ml, 8. tüpte 0 pg/ml Sample Diluent ile sıfır standart olacak şekilde hazırlanır.
- Standart 1'i oluşturmak için 10 ng/ml'lik sulandırılmış standart stok solüsyonundan 30 µl ve sample diluentten 970 µl ile toplam hacim 1000 µl olacak şekilde 1 numaralı tüpe konur. İyi karıştırılır.
- 2. tüpten 7. tüpe kadar hepsine 300 µl örnek seyreltici eklenir.
- Standart 2'yi oluşturmak için, 600 µl'lik bir son hacim olacak şekilde standart 1'den 2. tüpe 300 µl konur. İyi karıştırılır.
- Standart 3'ü oluşturmak için, 600 µl'lik bir son hacim olacak şekilde standart 2'den 3. tüpe 300 µl konur. İyi karıştırılır.
- 4. tüpten 7. tüpe kadar seri seyreltmeye devam edilir.

2.5.6. IL-10 ELISA Solüsyonları

2.5.6.1. Kitte Hazır Olmayan Malzemelerin Hazırlanması

- Yıkama tamponu (nötr PBS veya TBS)
- 0.01M TBS hazırlanması: 1.2g Tris, 8.5g NaCl; 450 µl saflaştırılmış asetik asit veya 700 µl konsantre HCl 1000 ml suya tamamlanır.
- 0.01M PBS hazırlanması: 8.5g NaCl, 1.4 NaH₂PO₄ 1 litre distile su ile hazırlanır. pH 7.2'ye ayarlanır.

2.5.6.2. Seyreltme Protokolü

- 1-8 numaralı tüpler nihai konsantrasyonları; 1. Tüpte 500 pg/ml, 2. tüpte 250 pg/ml, 3. tüpte 125 pg/ml, 4. tüpte 62.5 pg/ml, 5. tüpte 31.25 pg/ml, 6. tüpte 15.625 pg/ml, 7. tüpte 7.825 pg/ml, 8. tüpte 0 pg/ml Sample Diluent ile sıfır standart olacak şekilde hazırlanır.
- Standart 1'i oluşturmak için 10 ng/ml'lik sulandırılmış standart stok solüsyonundan 50 µl ve sample diluentten 950 µl ile toplam hacim 1000 µl olacak şekilde 1 numaralı tüpe konur. İyi karıştırılır.
- 2. tüpten 7. tüpe kadar hepsine 300 µl örnek seyreltici eklenir.
- Standart 2'yi oluşturmak için, 600 µl'lik bir son hacim olacak şekilde standart 1'den 2. tüpe 300 µl konur. İyi karıştırılır.
- Standart 3'ü oluşturmak için, 600 µl'lik bir son hacim olacak şekilde standart 2'den 3. tüpe 300 µl konur. İyi karıştırılır.
- 4. tüpten 7. tüpe kadar seri seyreltmeye devam edilir.

2.5.7. TNF-α ELISA Solüsyonları

2.5.7.1. Kitte Hazır Olmayan Malzemelerin Hazırlanması

- Yıkama tamponu (nötr PBS veya TBS)
- 0.01M TBS hazırlanması: 1.2g Tris, 8.5g NaCl; 450 µl saflaştırılmış asetik asit veya 700 µl konsantre HCl 1000 ml suya tamamlanır.
- 0.01M PBS hazırlanması: 8.5 NaCl, 1.4 Na O ile pH 7.2-7 'ye ayarlanır.

2.5.7.2. Seyreltme Protokolü

- 1-8 numaralı tüpler nihai konsantrasyonları; 1. Tüpte 500 pg/ml, 2. tüpte 250 pg/ml, 3. tüpte 125 pg/ml, 4. tüpte 62.5 pg/ml, 5.tüpte 31.25 pg/ml, 6. tüpte 15.625 pg/ml, 7. tüpte 7.825 pg/ml, 8. tüpte 0 pg/ml Sample Diluent ile sıfır standart olacak şekilde hazırlanır.
- Standart 1'i oluşturmak için 10 ng/ml'lik sulandırılmış standart stok solüsyonundan 50 µl ve sample diluentten 950 µl ile toplam hacim 1000 µl olacak şekilde 1 numaralı tüpe konur. İyi karıştırılır.
- 2. tüpten 7. tüpe kadar hepsine 300 µl örnek seyreltici eklenir.
- Standart 2'yi oluşturmak için, 600 µl'lik bir son hacim olacak şekilde standart 1'den 2. tüpe 300 µl konur. İyi karıştırılır.
- Standart 3'ü oluşturmak için, 600 µl'lik bir son hacim olacak şekilde standart 2'den 3. tüpe 300 µl konur. İyi karıştırılır.
- 4. tüpten 7. tüpe kadar seri seyreltmeye devam edilir.

2.6. Yöntemler

2.6.1. Hücre Kültürü

İnsan embriyonik böbrek hücre hattı olan HEK293T hücreleri kullanıldı. -80 °C'de kriyotüp içerisinde bulunan HEK293T hücreleri sıcak su banyosunda çözdürüldü. Çözülen hücrelerin üzerine 5 ml besiyeri ilave edilerek 1200 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

Hücreler %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 Penisilin streptomisin ve L glutamin eklediğimiz DMEM içerisinde kültüre edildi. Hücreleri kültüre etmek için 25 cm² yüzey alanına sahip T-25 hücre kültürü kapları kullanıldı. Hücreler buldukları flastaki çoğalma durumuna bakılarak pasajlandı. Pasajlama işleminde hücrelerimiz adherent özellikte oldukları için 2 ml tripsin ile muamele edildi. Flast yüzeyinden otomatik pipet ile toplanan hücreler santrifüj tüpü içerisine alındı. Tripsini inaktif etmek için 3 ml DMEM eklenerek 1300 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Elde edilen pellet, 5ml DMEM besiyeri bulunan yeni bir flast içerisinde inkübasyona bırakıldı.

2.6.2. Hücre Lizatı Eldesi

6 well plate çoğaltılan hücreler üzerine 300 µl NETN solüsyon ilave edildi. Pipetaj yapılarak tüm hücrelerin plate yüzeyinden kalkması ve parçalanması sağlandı. Temiz bir ependorf tüpe alınan lizatlar 10000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve hücrel proteinleri

içeren süpernatant ile çalışmaya devam edildi. Tüm örneklerden elde edilen lizatlar için protein miktar tayini gerçekleştirildi.

2.7. İlaç Uygulanması

İki adet 60 mm petriye kontrol grubu için İnsan embriyonik böbrek hücre hattı olan HEK293T hücrelerinin ekimi yapıldı. Doksanaltı kuyucuklu hücre kültürü plakalarına AO/PI boyama ve MTT hücre canlılık analizi için 3.2×10^4 hücre ekimi yapılarak bu kültürlere Çizelge 2. 7.'de verilen dozlarda VPA, HCQ ve FVP uygulaması gerçekleştirildi.

Valproic acid uygulaması için 10 mg/ml stok çözelti hazırlanıp 0.5 mM final konsantrasyonu elde edildi. Hidroksiklorokin uygulaması için 4 mg/ml stok çözelti hazırlanıp 5 µg/ml final konsantrasyonu elde edildi. Favipiravir uygulaması için 4 mg /ml stok çözelti hazırlanıp 52 µg/ml olacak şekilde final konsantrasyonu sağlandı.

Dozlar kültürlere 0., 24., 48. Saatlerde uygulandı. Uygulamalar üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

ELİSA deneyleri için uygulama süreleri sonunda kültür süpernatantları toplanarak IL-6, IL-10, TNF-α elisa kitleri firma direktifleri doğrultusunda uygulanmıştır

HDAC ELİSA deneyleri ise uygulama süresi sonunda süpernatantları toplanan kültürlerden elde edilen hücre lizatları ile gerçekleştirilmiştir. ELİSA analizleri için Çizelge 2.8'de verilen dozlarda Valproic acid (VPA), hydroxychloroquine (HCQ) ve Favipiravir (FVP) uygulanmıştır.

Çizelge 2.7.MTT ve AO/PI testleri için Valproic acid (VPA), hydroxychloroquine (HCQ) ve Favipiravir (FVP) uygulama dozları

| | 96 well plate | | | | | | Uygulama miktarı/100µl besiyeri için |
|-----|---------------|---------|---------|--------|---------|---------|--------------------------------------|
| | MTT | | | AO/PI | | | |
| | 0.Saat | 24.Saat | 48.Saat | 0.Saat | 24.Saat | 48.Saat | |
| VPA | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 2.32 µl |
| HCQ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 2.5 µl |
| FVP | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 2.6 µl |

Çizelge 2. 8. ELİSA analizleri için uygulanan Valproic acid (VPA), hydroxychloroquine (HCQ) ve Favipiravir (FVP) uygulama dozları

| | 0. Saat | | 24.Saat | | 48.Saat | | Uygulama miktarı/1ml besiyeri için |
|-----|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|------------------------------------|
| | supernatant | lizat | supernatant | lizat | supernatant | lizat | |
| VPA | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 23.2 µl |
| HCQ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 25 µl |
| FVP | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 26 µl |

2.8. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] Hücre Canlılık Analizi

Bu yöntemde MTT formazana indirgenir. Bu sırada oluşan renk kolorimetrik olarak ölçülür. Oluşan formazan miktarından canlı hücre sayısına ulaşılır Valproic acid (VPA), hydroxychloroquine (HCQ) ve Favipiravir (FVP)'belirlenen miktar aralığındaki morfolojik değişimleri gözlemlemek amacıyla MTT analizi gerçekleştirildi. Oluşturulan 24, 48 saatlik kültürler MTT analizi sonucu 540 nm dalga boyunda okundu, Valproic acid (VPA), hydroxychloroquine (HCQ) ve Favipiravir (FVP)'in HEK293T hücre hattı üzerindeki etkileri değerlendirildi.

2.9. AO (Acridine Orange) /PI (Propidium Iodide) Boyama

Nükleik asit bağlayıcı boyalar Acridine orange (AO) ve Propidium Iodide (PI) ile hücre canlılığı belirlenebilir. AO canlı hücrelerin çekirdeklerini yeşil, cansız hücrelerin çekirdeklerini ise kırmızı renkli görünüm almasını sağlayan hücre canlılığı boyasıdır.

PI boyası cansız hücrelerin hücre membranından geçerek nükleik asitlerini boyar ve kırmızı floresan bir görüntü almalarını sağlar.

AO/PI boyama solusyonu uygulanmış ve AO/PI plakalar, Leica, DM 2500 floresan mikroskobu ile gözlemlenmiştir.

AO, hem canlı hem de ölü hücelere nüfuz edebilen bir boyadır. AO, tüm çekirdekli hücreleri boyar ve yeşil floresan üretir. PI yalnızca zayıf zar bütünlüğüne sahip ölü hücelere girebilir ve kırmızı floresan oluşturmak için tüm ölü çekirdekli hücreleri boyayabilir. Her iki AO/PI ile boyanmış hücrelerden tüm canlı çekirdekli hücrelerin floresan yeşil ve tüm ölü hücrelerin çekirdeklerinin floresan kırmızı olduğu görülür.

2.10. Hücre Sayımı

Kültürü yapılan hücrelerin sayımı yapıldı. HEK293T hücrelerinin bulunduğu flask 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra 1100 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Pellet üzerine 2 ml besiyeri eklendi. Süspand edilen hücrelerden steril eppendorf içerisine 100 µl aktarıldı ve üzerlerine 100'er µl tripan mavisi eklendi. Oluşan karışımdan 10 µl neubauer lamına alındı ve hücre sayımı gerçekleştirildi.

MTT ve AO/ PI boyamalar için 96 kuyulu plakalara kuyu başına 32000; ELISA IL-6, ELISA IL-10, ELISA TNF ve HDAC testleri için 6 kuyulu plakalara kuyu başına 200000 hücre ekim yapıldı.

2.11. Protein Miktar Tayini ve Standart Grafik Hazırlanışı

Protein miktar tayini BSA (Bovine Serum Albumin) ile hazırlanan standart grafik kullanılarak yapıldı. Miktar tayini için BioRad marka Protein Assay Kit kullanıldı.

2.12. Kullanılan Kitlerin Uygulanışı

Her uygulama en az iki tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

2.12.1. IL-6 ELİSA Uygulama Protokolü

Deneyden önce tüm reaktifler ve malzemelerin oda sıcaklığına (18-25°C) dengelendi.

1. Tüm reaktifleri ve çalışma standartlarını daha önce belirtildiği gibi hazırlandı.

2. Plaka çerçevesinden fazla mikrolaka şeritlerini çıkarıldı ve bunlar orijinal ambalajında kapatılıp saklandı.

3. Kuyu başına 100 µl standart numune eklendi. Sıfır kuyusuna 100 µl Sample Diluent eklendi. Her birinin standart numune iki kopyası hazırlandı.

4. Hazırlanan plakamın üstü kapatıcı ile örtüldü ve oda sıcaklığında 120 dakika inkübe edildi.

5. Kapağı çıkarıldı ve kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevirilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı ancak kuyucukların bu esnada tamamen kurumamasına dikkatedildi.

6. Her bir kuyucuğa 100 µl hazırlanmış 1x Biotinylated Anti-Human IL-6 antikoru eklendi.

7. Üzeri plaka kapatıcı ile örtüldü ve oda sıcaklığında 90 dakika inkübe edildi.

8. Plaka 1x yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.

- a. Kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevirilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı.
- b. Her test kuyucuğuna 300 µl 1x yıkama tamponu eklendi. Daha temiz bir arka plan için her yıkama arasında 60 saniye inkübe edildi.
- a-b adımlarını 2 kez daha tekrarlandı.
- Kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevirilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı.

9. Her bir kuyucuğa 100 µl hazırlanmış 1x Avidin-Biotin-Peroxidase Complex eklendi. Plaka kapatıcı ile örtüldü ve 40 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

10. Plaka 1x yıkama tamponu ile 5 kez yıkanır.

- a. Kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevirilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı.
- b. Her test kuyucuğuna 300 µl 1x yıkama tamponu eklendi. Daha temiz bir arka plan için her yıkama arasında 60 saniye inkübe edildi.
- a-b adımları 2 kez daha tekrarlandı.
- Kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevirilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı.

11. Her kuyucuğa 90 µl Renk Geliştirme Reaktifi (Color Developing Reagent (TMB)) eklendi. Plaka kapatıcı ile örtüldü ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon için önemli bir nitel gözlem olarak diğer kuyular açık kalırken ilk dört standardın mavi gölgelenmesi görüldü.

12. Her kuyucuğa 100 µl Stop Solution eklendi ve rengin hemen sarıya döndüğü görüldü.

13. Reaksiyonun durdurulmasından sonraki 30 dakika içinde 450 nm dalga boyunda absorbands bir mikroplaka okuyucu ile okundu ve Optik Densite (OD) belirlendi.

2.12.2. IL-10 İçin ELİSA Uygulama Protokolü

Deneyden önce tüm reaktifler ve malzemelerin oda sıcaklığına (18-25°C) dengelendi.

1. Tüm reaktifleri ve çalışma standartlarını daha önce belirtildiği gibi hazırlandı.

2. Plaka çerçevesinden fazla mikroplaka şeritlerini çıkarıldı ve bunlar orijinal ambalajında kapatılıp saklandı.

3. Kuyu başına 100 µl standart numune eklendi. Sıfır kuyusuna 100 µl Sample Diluent eklendi. Her birinin standart numune iki kopyası hazırlandı.

4. Hazırlanan plakamım üstü kapatıcı ile örtüldü ve oda sıcaklığında 120 dakika inkübe edildi.

5. Kapağı çıkarıldı ve kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevirilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı ancak kuyucukların bu esnada tamamen kurumamasına dikkat edildi.

6. Her bir kuyucuğa 100 µl hazırlanmış 1x Biotinylated Anti-Human IL-10 antikoru eklendi.

7. Üzeri plaka kapatıcı ile örtüldü ve oda sıcaklığında 90 dakika inkübe edildi.

8. Plaka 1x yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.

- a. Kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevirilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı.
- b. Her test kuyucuğuna 300 µl 1x yıkama tamponu eklendi. Daha temiz bir arka plan için her yıkama arasında 60 saniye inkübe edildi.
- a-b adımları 2 kez daha tekrarlandı.
- Kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevirilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı.

9. Her bir kuyucuğa 100 µl hazırlanmış 1x Avidin-Biotin-Peroxidase Complex eklendi. Plaka kapatıcı ile örtüldü ve 40 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

10. Plaka 1x yıkama tamponu ile 5 kez yıkanır.

- a. Kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevirilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı.
- b. Her test kuyucuğuna 300 µl 1x yıkama tamponu eklendi. Daha temiz bir arka plan için her yıkama arasında 60 saniye inkübe edildi.
- a-b adımları 2 kez daha tekrarlandı.
- Kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevirilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı.

11. Her kuyucuğa 90 µl Renk Geliştirme Reaktifi(Color Developing Reagent (TMB)) eklendi. Plaka kapatıcı ile örtüldü ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon için önemli bir nitel gözlem olarak diğer kuyular açık kalırken ilk dört standardın mavi gölgelenmesi görüldü.

12. Her kuyucuğa 100 µl Stop Solution eklendi ve rengin hemen sarıya döndüğü görüldü.

13. Reaksiyonun durdurulmasından sonraki 30 dakika içinde 450 nm dalga boyunda absorbanans bir mikrolpaka okuyucu ile okundu ve Optik Densite (OD) belirlendi.

2.12.3. TNF- α için ELISA Uygulama Protokolü

Deneyden önce tüm reaktifler ve malzemelerin oda sıcaklığına (18-25°C) dengelendi.

1. Tüm reaktifleri ve çalışma standartlarını daha önce belirtildiği gibi hazırlandı.

2. Plaka çerçevesinden fazla mikrolpaka şeritlerini çıkarıldı ve bunlar orijinal ambalajında kapatılıp saklandı.

3. Kuyu başına 100 μ l standart numune eklendi. Sıfır kuyusuna 100 μ l Sample Diluent eklendi. Her birinin standart numune iki kopyası hazırlandı.

4. Hazırlanan plakamım üstü kapatıcı ile örtüldü ve oda sıcaklığında 120 dakika inkübe edildi.

5. Kapağı çıkarıldı ve kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevirilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı ancak kuyucukların bu esnada tamamen kurumamasına dikkatedildi.

6. Her bir kuyucuğa 100 μ l hazırlanmış 1x Biotinylated Anti-Human TNF- α antikoru eklendi.

7. Üzeri plaka kapatıcı ile örtüldü ve oda sıcaklığında 90 dakika inkübe edildi.

8. Plaka 1x yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.

- a. Kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevirilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı
- b. Her test kuyucuğuna 300 μ l 1x yıkama tamponu eklendi. Daha temiz bir arka plan için her yıkama arasında 60 saniye inkübe edildi.
- a-b adımları 2 kez daha tekrarlandı.
- Kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevirilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı.

9. Her bir kuyucuğa 100 μ l hazırlanmış 1x Avidin-Biotin-Peroxidase Complex eklendi. Plaka kapatıcı ile örtüldü ve 40 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

10. Plaka 1x yıkama tamponu ile 5 kez yıkanır.

- a. Kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevrilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı.
- b. Her test kuyucuğuna 300 µl 1x yıkama tamponu eklendi. Daha temiz bir arka plan için her yıkama arasında 60 saniye inkübe edildi.
- a-b adımları 2 kez daha tekrarlandı.
- Kuyulardaki sıvı atık kabına boşaltıldı. Tezgahın üzerindeki plak kağıt havlu üzerine ters çevrilip plakaya hafifçe vurularak kalan sıvı boşaltıldı.

11. Her kuyucuğa 90 µl Renk Geliştirme Reaktif (Color Developing Reagent (TMB)) eklendi. Plaka kapatici ile örtüldü ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon için önemli bir nitel gözlem olarak diğer kuyular açık kalırken ilk dört standardın mavi gölgelenmesi görüldü.

12. Her kuyucuğa 100 µl Stop Solution eklendi ve rengin hemen sarıya döndüğü görüldü.

13. Reaksiyonun durdurulmasından sonraki 30 dakika içinde içinde 450 nm dalga boyunda absorbans bir mikrolaka okuyucu ile okundu ve Optik Densite (OD) belirlendi.

2.12.4. HDAC Aktivite Kolorimetrik Test Kiti

2.12.4.1 HDAC Aktivite Kolorimetrik Test Kiti Uygulama Protokolü

1. Test numunelerini 200 µg hücre lizatı 85 µl son hacime seyreltildi. Pozitif kontrol için, 10 µl HeLa nükleer özütü 75 µl ddH₂O ile seyreltildi. Negatif kontrol için, 83 µl ddH₂O içine numune 2 µl Trichostatin ekleyerek seyreltildi.

2. Her kuyucuğa 10 µl 10X HDAC Test Tamponu eklendi.

3. Her kuyucuğa 5 µl HDAC kolorimetrik substrat eklendi ve iyice karıştırıldı.

4. Plakaları 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

5. 10 µl Lysine Developer ekleyerek reaksiyonu durduruldu ve iyice karıştırıldı. Plaka 37°C 30 dk inkübe edildi.

6. Örneği bir ELISA plak okuyucusunda 400 nm'de okundu. HDAC aktivitesi değeri, µg protein örneği başına bağlı Optik Densite (OD) olarak ifade edilebilir.

2.12.5. MTT Hücre Proliferasyon Test Kiti

2.12.5.1. Kite Hazır Olmayan Malzemeler

Kit içeriğindeki formazan steril 1mm 1xPBS ile çözülerek kullanıma hazır hale getirdi.

2.12.5.2. MTT Hücre Proliferasyon Test Kiti Uygulama Protokolü

1. 96 kuyucuklu kültür kabından besi yeri tamamen uzaklaştırıldı.
2. Hücrelerin üzerine 100 µl MTT solisyonu eklendi.
3. 3 saat süre ile 37°C'de karanlıkta inkübe edildi.
4. İnkübasyon süresi sonunda MTT solisyonunun 25 µl'si çekildi.
5. Tüm kuyucuklara 50 µl DMSO eklendi ve pipetle iyice karıştırıldı.
6. 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.
7. Süre sonunda ELİSA plate readerda 540 nm/d absorbansı belirlendi.

2.12.6. Protein Assay Kit (BioRad)

Her 1 µl protein için 1 ml kit kullanılarak Shimadzu marka spektrofotometrede 595 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

2.12.6.1. Standart Grafik Hazırlanışı

1. Stok BSA 10 kez seri sulandırıldı. Bunun için stok BSA çözeltisinden 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 µl alınarak 8 adet ependorf tüpe kondu. Tüm bu işlemler buz içinde yapıldı.
2. Her tüpe protein miktar tayin kitinden 1 ml eklenip, 5 dakika karanlıkta inkübe edildi.
3. Süre sonunda 595 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerleri spektrofotometrede okundu.
4. Standart grafik elde edilen bu değerlere göre X ekseninde protein miktar= $\mu\text{g}/\text{ml}$ ve Y ekseninde absorbans değerleri olacak şekilde sigmaplot yazılımı kullanılarak hazırlandı.

2.12.6.2. Hücree lizatlarında Protein Miktar Tayini

1. Hücree lizatlarından 1 µl ependorf tüpe konuldu
2. Üzerlerine 1 ml kit konularak 5 dakika karanlıkta inkübe edildi.
3. İnkübasyon süresi sonunda absorbans değeri spektrofotometrik olarak ölçüldü.
4. Örnek içerisindeki protein miktarı hesaplandı. Standart grafikte örneğin verdiği absorbans değeri karşılık gelen µg/ml cinsinden BSA miktarı örneğin içerdiği protein miktarını vermektedir. Hesaplamaların hepsi sigmaplot yazılımı kullanılarak yapılmıştır.
5. ELİSA kitler ile çalışma miktarları hesaplandı. Her bir örnekten 200 µg protein içerecek kadar lizat ile çalışmaya devam edildi.

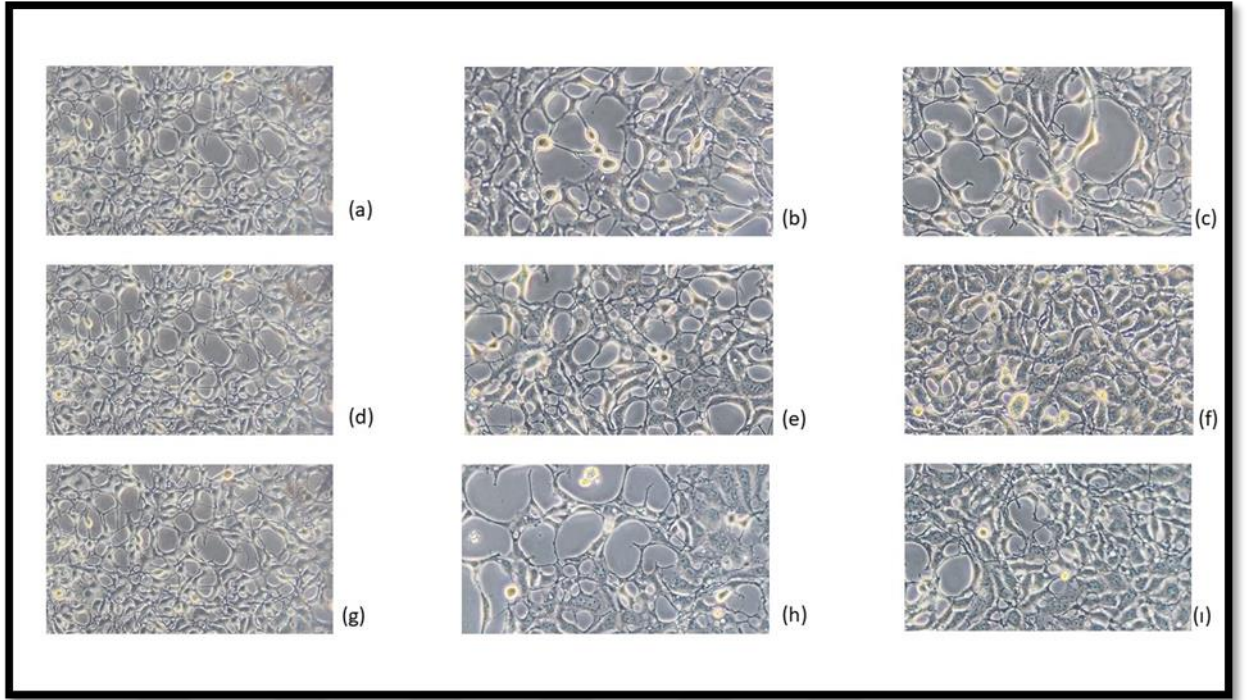
3. BULGULAR

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Moleküler Biyoloji laboratuvarında stok halde bulunan insan embriyonik böbrek hücre hattı HEK293T hücreleri ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Stok HEK293T hücreleri çözülerek T75 flasklarda çoğaltılmıştır. Yüzde 70 konfluent hale gelen bu kültürlerden ilaç uygulamaları, MTT analizi, AO/PI boyama ve hücre lizati eldesi için uygun kültür kaplarına pasajlama işlemi yapılmış ve deneyler pasajlanan bu hücreler ile tamamlanmıştır.

Tripan mavisi kullanılarak hücre sayımı yapıldıktan sonra MTT ve AO/ PI boyamalar için 96 kuyulu plakalara kuyu başına 32.000; ELISA IL-6, ELISA IL-10, ELISA TNF ve HDAC testleri için 6 kuyulu plakalara kuyu başına 200.000 hücre ekim yapılmıştır. Bu kültürlerle final konsantrasyonu 0,5 mM olacak şekilde VPA, final konsantrasyonu 5 µg/ml olacak şekilde HCQ ve final konsantrasyonu 52 µg/ml olacak şekilde FVP 0., 24., 48. saatlerde uygulanmıştır. Uygulamalar üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

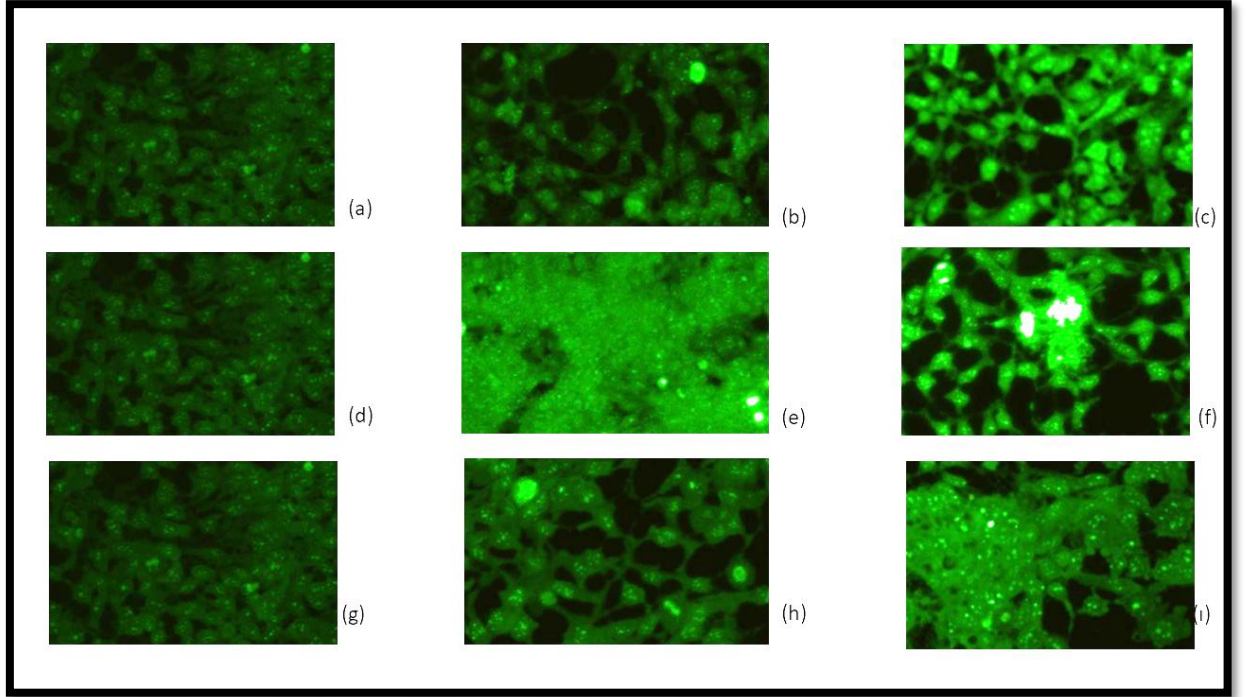
3.1. Hücre Kültürlerinde Hücre Canlılığı ve Proliferasyonunun Morfolojik Olarak Değerlendirmesi

VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde, uygulama süresi sonunda kültürler invert mikroskop altında hücre canlılığı, yoğunluğu ve ekstraselüler matriks gelişimi açısından morfolojik olarak değerlendirilmiş ve fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 3. 1.). Uygulama yapılan tüm kültürlerde hücre canlılığının devam ettiği gözlenmiştir. Ancak VPA uygulanan kültürlerde hücre proliferasyonunun 24 ve 48. Saatte (Şekil 3.1. b ve c), ayrıca FVP uygulanan kültürlerde özellikle 24. Saatte azalmış olduğu gözlenmiştir. (Şekil 3.1. h)



Şekil 3. 1. VPA, HCQ ve FVP uygulanan HEK293T hütlürlerinde invert mikroskobi ile hücre morfolojisi ve canlılığı; (a) VPA 0. Saat, (b) VPA 24. Saat, (c) VPA 48. Saat, (d)HCQ 0. Saat, (e) HCQ 24.Saat, (f) HCQ48.Saat, (g) FVP 0.Saat, (h)FVP 24. Saat, (i) FVP 48. Saat

VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde hücre canlılığı, uygulama süresi sonunda kültürler AO/PI ile boyanarak florasana mikroskop ile incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. (Şekil 3.2). Uygulama yapılan tüm kültürlerde hücre canlılığının devam ettiği herhangi bir hücre ölümü olmadığı gözlenmiştir. Ancak VPA uygulanan kültürlerde hücre proliferasyonunun 24 ve 48. Saatte (Şekil 3. 2. b ve c) azaldığı HCQ uygulanan kültürlerde 48. Saatte hücre proliferasyonunun aynı uygulamanın 0 ve 24. Saatlere oranla daha az olduğu (Şekil 3. 2. e ve f), ancak FVP uygulanan kültürlerde 24. Saatte hücre proliferasyonunun azaldığı fakat 48. Saatte tekrar artmış olduğu gözlenmiştir (Şekil 3. 2. h ve i).



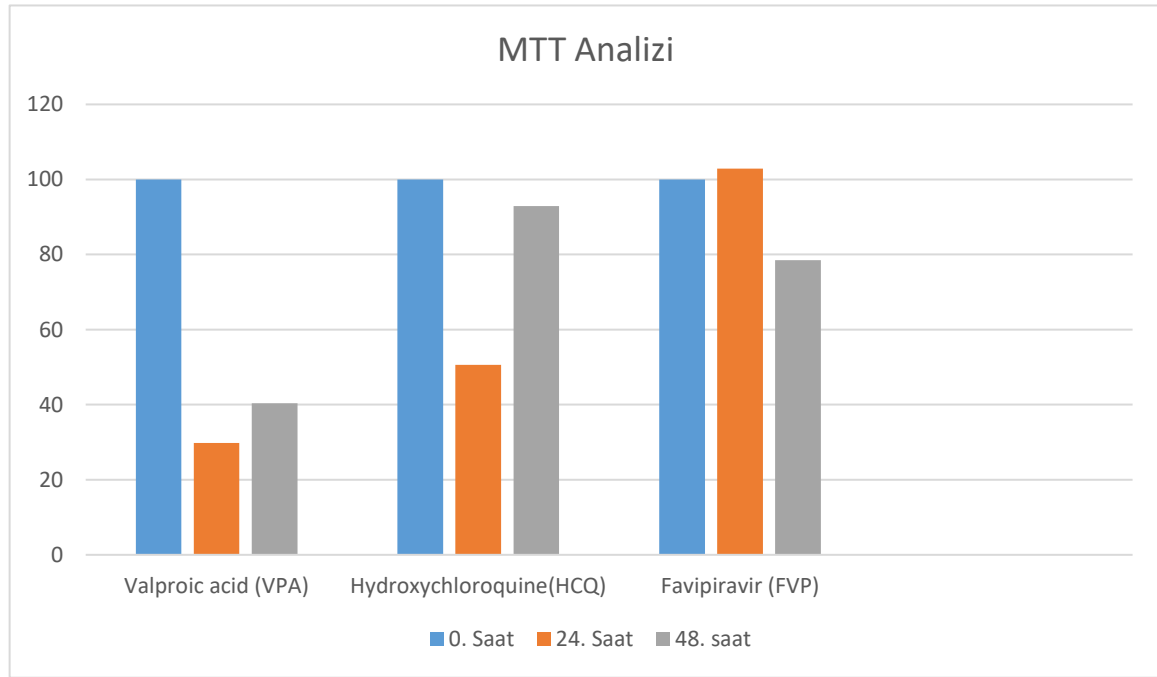
Şekil 3.2. VPA, HCQ ve FVP uygulanan HEK293T hütlürlerinde floraslan mikroskobi ile AO/PI boyamaların incelenmesi; (a) VPA 0. Saat, (b) VPA 24. Saat, (c) VPA 48. Saat, (d)HCQ 0. Saat, (e) HCQ 24.Saat, (f) HCQ48.Saat, (g) FVP 0.Saat, (h)FVP 24. Saat, (i) FVP 48. Saat

3.2. Hücre Kültürlerinde Hücre Canlılığı ve Proliferasyonunun MTT Analizi ile Değerlendirmesi

VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde hücre canlılığı, uygulama süresi sonunda kültürlerde MTT analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Uygulama yapılmayan 0.saat kültürlerdeki hücre canlılığı %100 kabul edilerek uygulamalar sonrası canlı hücre yüzdeleri hesaplanak Çizelge 3. 1.'de verilmiştir. Elde edilen % canlılık verilerine ait grafik Şekil 3.3.'teki gibidir. Buna göre VPA uygulanan kültürlerde 24. saatte %70,16 ve 48. saatte %59,58 azaldığı belirlenmiştir. HCQ uygulanan kültürlerde 24. saatte %49.37 azalmış ardından 48. saate kadar geçen süreçte hücre sayısında bir miktar artış gerçekleşmiş ancak başlangıç miktarına göre hücre sayısının %7,05 daha az olduğu görülmüştür. FVP uygulanan kültürlerde 24. saatte %2,93 artış, 48. saatte %21,51 azalma görülmüştür.

Çizelge 3.1.VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde MTT analizi sonucunda belirlenen % hücre canlılığı değerleri

| | Valproic acid (VPA) | Hydroxychloroquine(HCQ) | Favipiravir (FVP) |
|----------|---------------------|-------------------------|-------------------|
| 0. Saat | 100 | 100 | 100 |
| 24. Saat | 29,83 | 50,63 | 102,93 |
| 48. Saat | 40,41 | 92,95 | 78,49 |



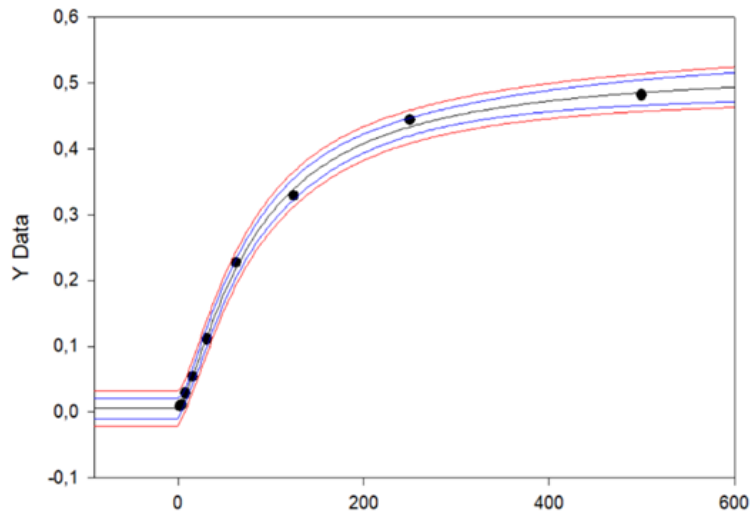
Şekil 3.3. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde MTT analizi sonucunda belirlenen % hücre canlılığı değerlerine ait bar grafik

3.3. Standart Grafik

Tüm örneklerde protein miktar tayini yapabilmek için toz BSA seri sulandırılmış, bradford yöntemi ile her bir konsantrasyonun OD değeri belirlenmiştir (Çizelge 3.2). Bu değerler kullanılarak standart grafik sigmaplot yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 3.4).

Çizelge 3. 2. Protein miktar tayini için standart grafik oluşturulmasında kullanılan BSA konsantrasyonları ve elde edilen OD değerleri

| $\mu\text{g/ml}$ | OD |
|------------------|--------|
| 500 | 0,4815 |
| 250 | 0,4435 |
| 125 | 0,3285 |
| 62,5 | 0,2270 |
| 31,2500 | 0,1110 |
| 15,6250 | 0,0545 |
| 7,8125 | 0,0285 |
| 3,9063 | 0,0120 |
| 1,9531 | 0,0085 |



Şekil 3.4. Sigmaplot yazılımı kullanılarak oluşturulan standart grafik.

3.4. Protein Miktar Tayini

Tüm örneklerde protein miktarı hem kültür süpernatantında hemde hücre lizatlarında sigmaplot yazılımı kullanılarak standart grafiğe göre hesaplanmıştır. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kütürlerde kültür süpernatantında protein miktarı ($\mu\text{g/ml}$) Çizelge 3. 3'te ve hücre lizatında protein miktarı ($\mu\text{g/ml}$) Çizelge 3. 4.'te verilmiştir.

Çizelge 3. 3. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde kültür süpernatantında total protein miktarı (µg/ml)

| | Valproic acid (VPA) | Hydroxychloroquine (HCQ) | Favipiravir (FVP) |
|----------|----------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 0. Saat | 66 | 64 | 64 |
| 24. Saat | 80 | 62 | 52 |
| 48. Saat | 72 | 60 | 64 |

Çizelge 3. 4. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde hücre lizatında total protein miktarı

| | Valproic acid (VPA) (µg/ml) | Hydroxychloroquine (HCQ) (µg/ml) | Favipiravir (FVP) (µg/ml) |
|----------|------------------------------------|---|----------------------------------|
| 0. Saat | 64 | 64 | 64 |
| 24. Saat | 50 | 38 | 30 |
| 48. Saat | 46 | 38 | 23 |

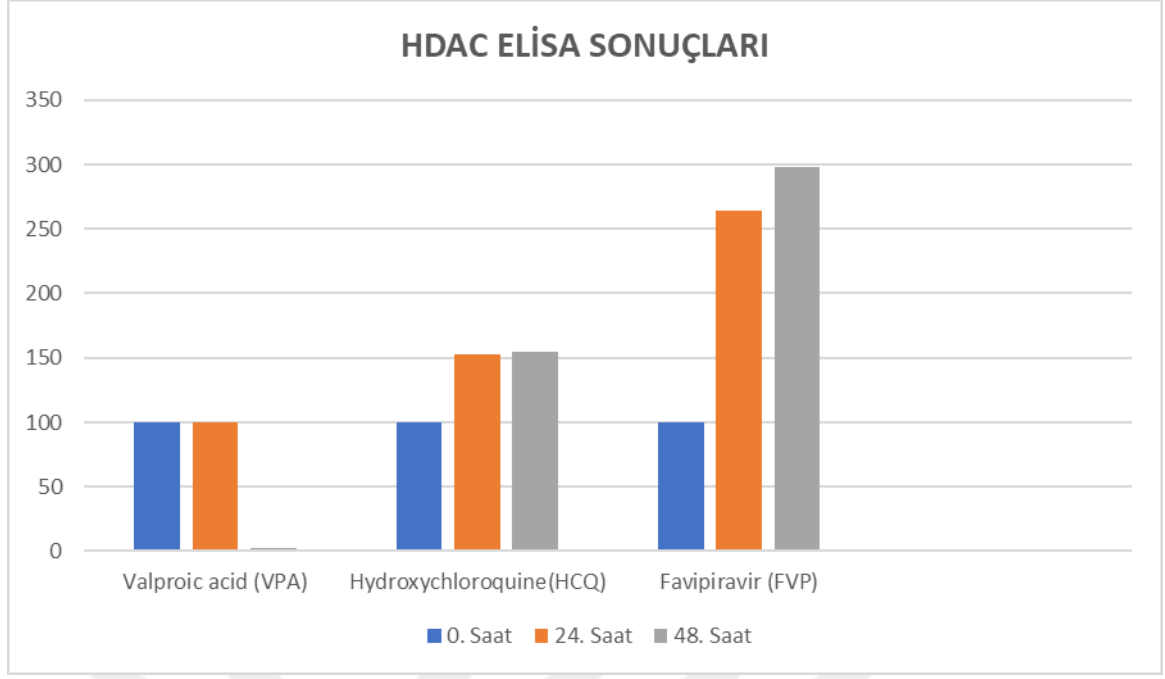
3.5. HDAC ELİSA Sonuçları

VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde uygulama süresi sonunda HDAC miktarında gerçekleşen değişim değerlendirilmiştir. Uygulama yapılmayan 0.saat kültürlerdeki HDAC miktarı %100 kabul edilerek uygulamalar sonrası HDAC miktarı yüzdeleri hesaplanmış ve Çizelge 3. 5’de verilmiştir. Elde edilen HDAC % miktar verilerine ait grafik Şekil 3. 5.’teki gibidir.

Buna göre VPA uygulanan kültürlerde HDAC miktarının başlangıca göre 24. Saatte %20,42 ve 48. saatte %5,77 daha fazla olduğu belirlenmiştir. HCQ uygulanan kültürlerde 24. saatte % 53,16 ve 48. saatte %54,43 artış olduğu görülmüştür. FVP uygulanan kültürlerde 24. saatte %164,22 ve 48. saatte % 198,16 artış gerçekleşmiştir.

Çizelge 3. 5. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde HDAC miktarı yüzde değerleri

| | Valproic acid (VPA) | Hydroxychloroquine (HCQ) | Favipiravir (FVP) |
|----------|----------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 0. Saat | 100 | 100 | 100 |
| 24. Saat | 120,42 | 153,16 | 264,22 |
| 48. Saat | 105,77 | 154,43 | 298,16 |



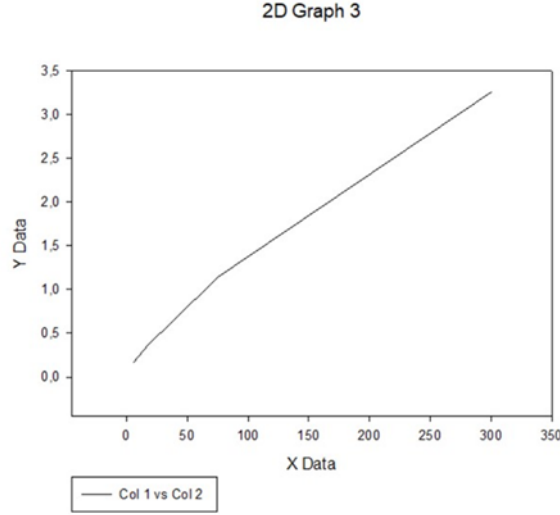
Şekil 3. 5.VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde HDAC miktarı yüzde değerlerine ait bar grafik

3.6. IL-6 ELISA Sonuçları

VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde uygulama süresi sonunda IL-6 miktarında gerçekleşen değişim değerlendirilmiştir. IL-6 miktarı (pg/ml) kit içeriğinde bulunan standart kullanılarak hesaplanmıştır. Kit içeriğinde bulunan standart kullanılarak yapılan ölçümler sonucu elde edilen OD değerleri Çizelge 3. 6'da gösterilmiştir. Bu değerler kullanılarak IL-6 standart grafiği sigmaplot yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 3. 6.)

Çizelge 3. 6. Kit içeriğinde bulunan standart kullanılarak yapılan ölçümler sonucu elde edilen OD değerleri

| IL6 pg/ml | OD |
|------------------|-----------|
| 300 | 3,258 |
| 75 | 1,1415 |
| 37,5 | 0,6365 |
| 18,75 | 0,38 |
| 4,69 | 0,1535 |



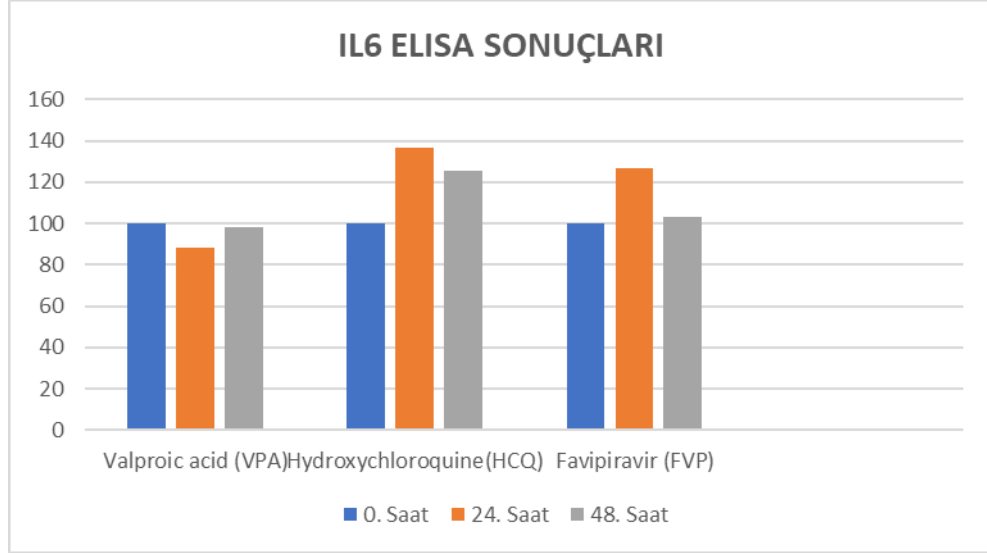
Şekil 3. 6. IL-6 standart grafiği

Standart grafik kullanılarak her bir örnekteki IL-6 miktarı hesaplanmıştır. Uygulama yapılmayan 0.saat kültürlerdeki IL-6 miktarı %100 kabul edilerek uygulamalar sonrası IL-6 miktarı yüzdeleri hesaplanmış ve Çizelge 3. 7.'de verilmiştir. Elde edilen IL-6 % miktar verilerine ait grafik Şekil 3. 7'deki gibidir.

Buna göre VPA uygulanan kültürlerde 24. saatte %11,61 ve 48. saatte %1.79 azaldığı belirlenmiştir. HCQ uygulanan kültürlerde 24. saatte % 36,86 ve 48. saate %25,71 artış olduğu görülmüştür. FVP uygulanan kültürlerde 24. saatte %26,92 ve 48. saatte % 3,12 artış gerçekleşmiştir.

Çizelge 3.7. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde IL-6 miktarı yüzde değerleri

| | Valproic acid (VPA) | Hydroxychloroquine (HCQ) | Favipiravir (FVP) |
|----------|--------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| 0. Saat | 100 | 100 | 100 |
| 24. Saat | 88,39 | 136,86 | 126,92 |
| 48. Saat | 98,21 | 125,71 | 103,12 |



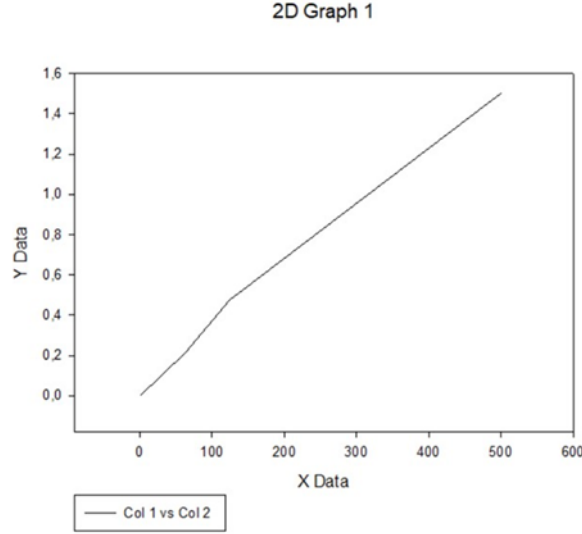
Şekil 3. 7. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde IL-6 miktarı yüzde değerlerine ait bar grafik

3.7. IL-10 ELISA SONUÇLARI

VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde uygulama süresi sonunda IL-10 miktarında gerçekleşen değişim değerlendirilmiştir. IL-10 miktarı (pg/ml) kit içeriğinde bulunan standart kullanılarak hesaplanmıştır. Kit içeriğinde bulunan standart kullanılarak yapılan ölçümler sonucu elde edilen OD değerleri Çizelge 3. 8'de gösterilmiştir. Bu değerler kullanılarak IL-10 standart grafiği sigmaplot yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 3. 8.).

Çizelge 3. 8. Kit içeriğinde bulunan standart kullanılarak yapılan ölçümler sonucu elde edilen OD değerleri

| IL6 pg/ml | OD |
|------------------|-----------|
| 500 | 1,5025 |
| 125 | 0,476 |
| 62,5 | 0,214 |
| 31,25 | 0,104 |
| 0 | 0 |



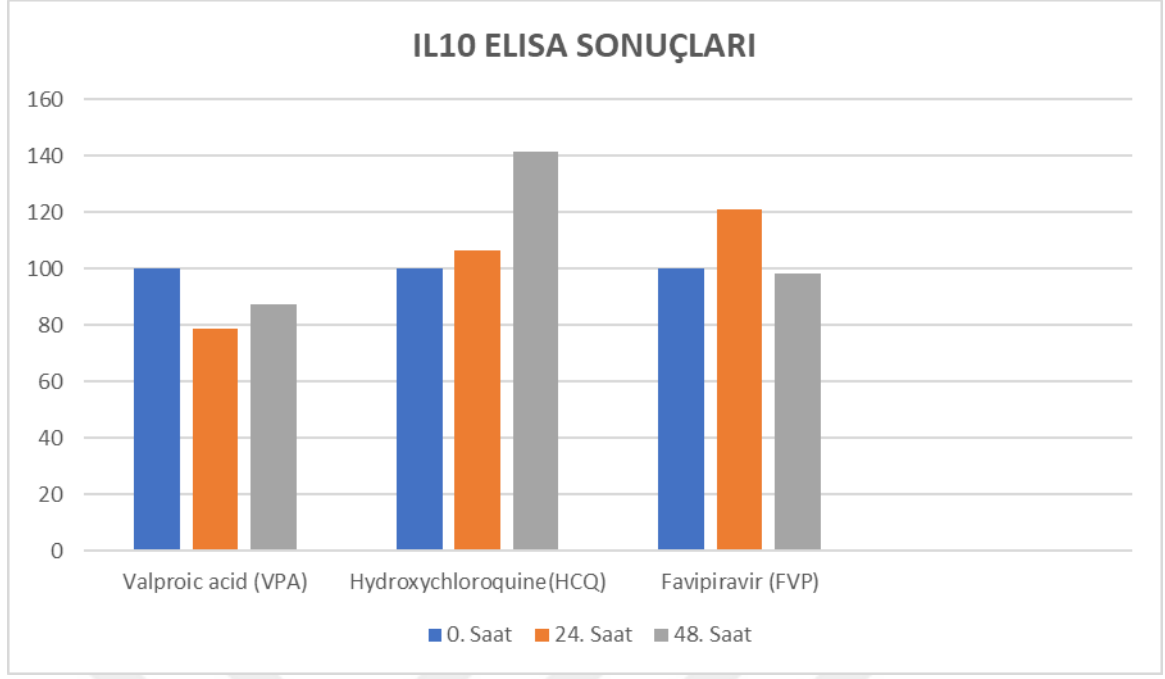
Şekil 3.8. IL-10 standart grafiği

Standart grafik kullanılarak her bir örnekteki IL-6 miktarı hesaplanmıştır. Uygulama yapılmayan 0.saat kültürlerdeki IL-10 miktarı %100 kabul edilerek uygulamalar sonrası IL-10 miktarı yüzdeleri hesaplanmış ve Çizelge 3. 9.'da verilmiştir. Elde edilen IL-10 % miktar verilerine ait grafik Şekil 3. 9. 'daki gibidir.

Buna göre VPA uygulanan kültürlerde 24. saatte %21,43 ve 48. saatte %12,7 azaldığı belirlenmiştir. HCQ uygulanan kültürlerde 24. saatte %6,45 ve 48. saate %41,42 artış olduğu görülmüştür. FVP uygulanan kültürlerde ise 24. saatte %20,87 artış görülürken ve 48. saatte başlangıca göre %1,79 azalma belirlenmiştir.

Çizelge 3. 9. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde IL-10 miktarı yüzde değerleri

| | Valproic acid (VPA) | Hydroxychloroquine (HCQ) | Favipiravir (FVP) |
|----------|--------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| 0. Saat | 100 | 100 | 100 |
| 24. Saat | 78,57 | 106,45 | 120,87 |
| 48. Saat | 87,30 | 141,42 | 98,21 |



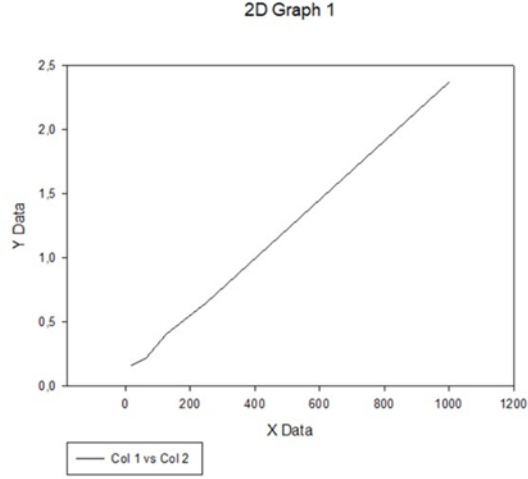
Şekil 3.9. VPA, HCQ ve FVP Uygulanan Kültürlerde IL-10 miktarı yüzde değerlerine ait bar grafik

3.8. TNF- α ELİSA SONUÇLARI

VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde uygulama süresi sonunda TNF- α miktarında gerçekleşen değişim değerlendirilmiştir. TNF- α miktarı (pg/ml) kit içeriğinde bulunan standart kullanılarak hesaplanmıştır. Kit içeriğinde bulunan standart kullanılarak yapılan ölçümler sonucu elde edilen OD değerleri Çizelge 3. 10.'da gösterilmiştir. Bu değerler kullanılarak TNF- α standart grafiği sigmaplot yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 3.10.).

Çizelge 3. 10. Kit içeriğinde bulunan standart kullanılarak yapılan ölçümler sonucu elde edilen OD değerleri

| TNF- α pg/ml | OD |
|---------------------|--------|
| 1000 | 2,3655 |
| 250 | 0,6505 |
| 125 | 0,4085 |
| 62,5 | 0,2185 |
| 15,6 | 0,158 |



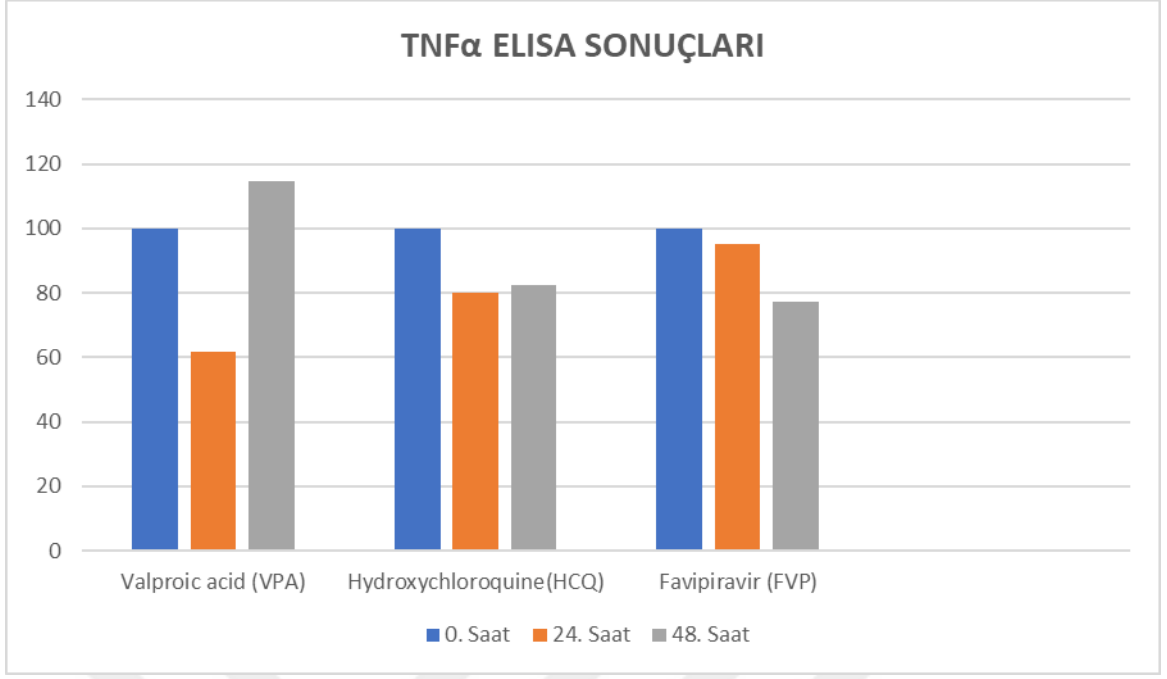
Şekil 3.10. TNF- α Standart Grafiği

Standart grafik kullanılarak her bir örnekteki TNF- α miktarı hesaplanmıştır. Uygulama yapılmayan 0. saat kültürlerdeki TNF- α miktarı %100 kabul edilerek uygulamalar sonrası TNF- α miktarı yüzdeleri hesaplanmış ve Çizelge 3. 11’de verilmiştir. Elde edilen TNF- α % miktar verilerine ait grafik Şekil 3.11’deki gibidir.

Buna göre VPA uygulanan kültürlerde 24. saatte %38.13 azalmış, 48. saatte kadar geçen süreçte artış göstermiş ve başlangıç miktarından % 14,58 fazla olduğu belirlenmiştir. HCQ uygulanan kültürlerde 24. saatte % 20,17 ve 48. saatte %17,5 azalma olduğu görülmüştür. FVP uygulanan kültürlerde ise 24. saatte %4,81 azalma görülürken ve 48. saatte azalma %22,66 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3. 11. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde TNF- α miktarı yüzde değerleri

| | Valproic acid (VPA) | Hydroxychloroquine (HCQ) | Favipiravir (FVP) |
|----------|--------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| 0. Saat | 100 | 100 | 100 |
| 24. Saat | 61,87 | 79,83 | 95,19 |
| 48. Saat | 114,58 | 82,50 | 77,34 |



Şekil 3. 11. VPA, HCQ ve FVP Uygulanan Kültürlerde TNF- α miktarı yüzde değerlerine ait bar grafik

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İlaçlarla ilgili yapılan birçok farmako-moleküler çalışma, birçok farklı sinyal yolunun ilaç etkinliği veya ilaçların yan etkileri ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada öncelikle VPA, HCQ ve FVP uygulamasının HEK293T insan böbrek epitel hücre üzerinde sitotoksik etkisinin olup olmadığı değerlendirilmiştir. VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde, uygulama süresi sonunda kültürler invert mikroskop altında hücre canlılığı, yoğunluğu ve ekstraselüler matriks gelişimi açısından morfolojik olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1.). Uygulama yapılan tüm kültürlerde hücre canlılığının devam ettiği gözlenmiştir. Ancak VPA uygulanan kültürlerde hücre proliferasyonunun 24 ve 48. Saatte (Şekil 3.1. b ve c), ayrıca FVP uygulanan kültürlerde özellikle 24. Saatte azalmış olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.1. h). VPA, HCQ ve FVP uygulanan kültürlerde hücre canlılığı, uygulama süresi sonunda kültürler AO/PI ile boyanarak florasan mikroskop ile incelenmiştir (Şekil 3. 2.). Uygulama yapılan tüm kültürlerde hücre canlılığının devam ettiği herhangi bir hücre ölümü olmadığı gözlenmiştir. Ancak VPA uygulanan kültürlerde hücre proliferasyonunun 24 ve 48. saatte (Şekil 3. 2. b ve c) azaldığı, HCQ uygulanan kültürlerde 48. saatte hücre proliferasyonunun aynı uygulamanın 0 ve 24. Saatlere oranla daha az olduğu (Şekil 3. 2. e ve f), ancak FVP uygulanan kültürlerde 24. Saatte hücre proliferasyonunun azaldığı fakat 48. saatte tekrar artmış olduğu gözlenmiştir (Şekil 3. 2. h ve ı). Yapılan MTT analizleri de elde edilen bu morfolojik veriyi doğrular niteliktedir. MTT analizi sonucunda VPA uygulanan kültürlerde hücre canlılığının 24. saatte %70,16 ve 48. saatte %59,58 azaldığı belirlenmiştir. HCQ uygulanan kültürlerde 24. saatte % 49.37 azalmış ardından 48. saate kadar geçen süreçte hücre sayısında bir miktar artış gerçekleşmiş ancak başlangıç miktarına göre hücre sayısının %7,05 daha az olduğu görülmüştür. FVP uygulanan kültürlerde 24. saatte %2,93 artış, 48. saatte %21,51 azalma görülmüştür. Elde edilen sonuçlar literatür verilerini desteklemektedir (Yılmaz vd., 2022).

Çalışmanın devamında VPA, HCQ ve FVP uygulamasının HDAC aktivitesi üzerine etkisi ve bu etkinin inflamasyondan kaynaklanıp kaynaklanmadığı HEK293T hücre hattı modelinde araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmada HDAC değişiminin IL-6, IL-10 ve TNF- α ifadesinde değişim oluşturup oluşturmadığı ELİSA yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Literatür incelendiğinde, HCQ ve Favipiravir ile ilgili çok fazla sayıda araştırma bulunmasına rağmen, bu ilacın, HDAC inhibitörü ilaç olan VPA varlığında veya yokluğunda, HEK293T insan böbrek epitel hücrelerinde sitotoksik etkilerinin, ayrıca IL-6, IL-10 ve TNF- α

ifadesine etkilerinin araştırıldığı herhangi bir araştırmaya rastlanmamaktadır. Bu yüzden bu araştırmadan elde edilen verilerin literatüre büyük katkılar sağlayacağı yadsınamaz bir gerçektir.

HCQ; konak hücrede anjiyotensin konverting enzim 2'nin glikosilasyonunu inhibe ederek virüsün hücreye girişini engeller (Pahan ve Pahan, 2020). Ayrıca zayıf alkali özellikleri sayesinde endozom pH'sını arttırarak asidifikasyonu engelleyerek de inhibitör etki gösteriren bir ilaçtır (Pahan ve Pahan, 2020). Oral yoldan alındıktan sonra hızlı emilim göstererek yüksek bir doku konsantrasyonuna ulaşmakta ve dokularda birikebilmektedir (Browning, 2014; Collins, Jackson ve Gustafson, 2018). Antiromatizmal hastalıklarda antienflamatuar ve analjezik olarak yıllardır kullanılan HCQ'nun, SARS-COV-1 ve MERS-CoV virüslerine karşı *in-vitro* etkinliğide gösterilmiştir (Karaarslan vd., 2020; Lu, 2020; Bleibtreu vd., 2018). HCQ kan konsantrasyonu, absorpsiyon fazından kısa bir süre sonra zirve yapar ve organlara hızla dağılması nedeniyle nispeten hızlı bir şekilde düşer (Tett, Cutler ve Day, 1990). Spesifik olarak, absorpsiyon hızı sabitinin, ortalama 3 saat içinde neredeyse tamamen absorpsiyona ulaştığı literatürde birçok araştırmada raporlanmıştır (Collins, Jackson ve Gustafson, 2018). İnsanlarda oral emilimi oldukça iyi olan HCQ'nun, sağlıklı bireylerde 200 mg'lık tek doz oral yoldan uygulanmasının bile, 3.26 (tmax) saat sonra, ortalama maksimum kan konsantrasyonuna (Cmax) 129,6 ng/ mL ulaştığı bilimsel olarak ispat edilmiştir (Tett, Cutler ve Day, 1990; Collins, Jackson ve Gustafson, 2018). Çalışmamızda bu literatür verilerinden yararlanılarak 5 µg/ml final konsantrasyonu 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır.

Favipiravir (T-705, FVP), bir CYP2C8 inhibitörüdür. Birçok antiretroviral ilaç gibi RNA polimerazın kontrolü yoluyla viral replikasyonu inhibe eden bir pürin nükleotidi olan FVP'de dar bir terapötik indekse sahiptir. Ancak 2019 yılından beri sıklıkla COVID-19 olarak bilinen şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) tedavisi için reçete edilmektedir. FVP'nin plazma yarı ömrü yaklaşık 4 saat olup, kovid tedavisinde ilaçlar 3×900 mg/1 gün yükleme dozu, ardından 2×300 mg/4 gün idame dozları olmak üzere toplam beş gün oral olarak verilir. Sunulan bu çalışmada FVP'nin son konsantrasyonu 52 µg/ml olarak alınmıştır (Yılmaz vd., 2022).

Histon deasetilazlar; histon-DNA ve histon-histon ilişkisi, DNA paketlenmesi, replikasyonu, onarımı ve gen ifadesinin kontrolü gibi birçok biyolojik olayın kontrolünde rol oynamaktadır (Zhao ve Shilatifard, 2019). HDAC enzimlerini inhibe edebilen bileşiklerin hücre bölünmesinin durdurulması, apoptoz ve farklılaşmanın indüklenmesi gibi biyolojik olaylarda etkili olduğunu göstermiştir. Asetilasyon kaybı, kromatin yapıyı yoğunlaştırmaktadır,

böylece gen ifadelenmesi baskılanmaktadır (Hu, Greene ve Heller, 2020). HDAC inhibitörü olan VPA HEK293T kültürlerine final konsantrasyonu 0,5 mM olacak şekilde uygulanmıştır (Yılmaz vd., 2022).

VPA, HCQ ve FVP uygulamasının HDAC aktivitesi üzerine etkisi değerlendirildiğinde VPA uygulanan kültürlerde HDAC aktivitesinin başlangıca göre 24. Saatte %20,42 ve 48. saatte %5,77 daha fazla olduğu belirlenmiştir. HCQ uygulanan kültürlerde 24. saatte % 53,16 ve 48. saate %54,43 artış olduğu görülmüştür. FVP uygulanan kültürlerde 24. saatte %164,22 ve 48. saatte % 198,16 artış gerçekleşmiştir. Çalışmamızda kullandığımız HDAC aktivite test kiti HDAC tipi ayırt etmeksizin toplam aktiviteyi değerlendirebilmektedir. Testin çalışma prensibi hücre lizatı eldesi ve lizatta açığa çıkan HDAC'ların baskılanmasını ölçmek şeklindedir. VPA lizat üzerine uygulandığında testin kontrolü olan inhibitör TCA ile aynı düzeyde HDAC aktivitesini baskılamıştır. Ancak VPA kültüre uygulandığında HDAC aktivitesinin devam ettiği görülmektedir. Elde edilen verilerin literatürle uyumlu olduğu görülmektedir (Yılmaz vd., 2022). Ayrıca HCQ ve FVP'ninde HDAC aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir.

İlaç yan etkisi olarak gözlenen doku patogenezinin IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler dahil olmak üzere stresle ilişkili bir dizi uyaran tarafından tetiklenebileceği bilinmektedir. İnsan hücrelerinin birçoğu, IL-10'u sentezler ve yüzeylerinde IL-10R ifade eder. IL-10, IL-1 ve TNF- α ekspresyonunu inhibe ettiğinden, IL-10'daki artış, IL-6 ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin katabolik etkilerine karşı dokuyu koruyabilir.

Yaptığımız çalışmada 0.saat kültürlerdeki IL-6 miktarı %100 kabul edilerek uygulamalar sonrası IL-6 yüzdeleri hesaplanmıştır. Buna göre VPA uygulanan kültürlerde 24. saatte %11,61 ve 48. saatte %1.79 azaldığı belirlenmiştir. HCQ uygulanan kültürlerde 24. saatte %36,86 ve 48. saate %25,71 artış olduğu görülmüştür. FVP uygulanan kültürlerde 24. saatte %26,92 ve 48. saatte %3,12 artış gerçekleşmiştir. Benzer şekilde IL-10 yüzdeleri VPA uygulanan kültürlerde 24. saatte %21,43 ve 48. saatte %12,7 azaldığı belirlenmiştir. HCQ uygulanan kültürlerde 24. saatte %6,45 ve 48. saate %41,42 artış olduğu görülmüştür. FVP uygulanan kültürlerde ise 24. saatte %20.87 artış görülürken ve 48. saatte başlangıca göre % 1,79 azalma belirlenmiştir. TNF- α yüzdeleri ise VPA uygulanan kültürlerde 24. saatte %38.13 azalmış,48. saatte kadar geçen süreçte artış göstermiş ve başlangıç miktarından %14,58 fazla olduğu belirlenmiştir. HCQ uygulanan kültürlerde 24. saatte % 20,17 ve 48. saate %17,5 azalma

olduğu görülmüştür. FVP uygulanan kültürlerde ise 24. saatte %4,81 azalma görülürken ve 48. saatte azalma %22,66 olarak belirlenmiştir.

HDAC aktivitesinin %20 oranında arttığı 24 saat VPA uygulanan kültürlerde TNF- α ifadesinin %39 oranında azaldığı görülmüştür. Ancak HDAC aktivitesinin normale döndüğü 48 saatlik kültürlerde ise TNF- α miktarı %14 artmıştır. Bu sonuç VPA uygulamasının TNF- α zerine etkili olduğu, bu değişimin HDAC ile ilişkili olabileceği ancak IL-10 ve IL-6 ifadesinden bağımsız farklı bir hücresel yolağın etkisi olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.çalışmamız HCQ uygulamasının HDAC aktivitesinde artışa bununla özellikle antiinflamatuvar IL-10 ifadesinde artışa neden olabileceğini göstermiştir. Ayrıca FVP uygulaması HDAC aktivitesinde artışa bu artışa paralel olarak antiinflamatuvar IL-10 ifadesinde fakat beraberinde IL-6 seviyesinde de artışa neden olabileceğini göstermiştir. Sonuç olarak bu araştırmada literatürde henüz yer almayan önemli bulgular raporlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Anonim: IL-6 Signaling Pathways. 25 Aralık 2023, Erişim adresi: <https://www.rndsystems.com/pathways/il-6-family-signaling-pathways>
- Bleibtreu, A., Jaureguiberry, S., Houhou, N., Boutolleau, D., Guillot, H., Vallois, D., Lucet, J.C., Robert, J., Mourvillier, B., Delemazure, J., Jaspard, M., Lescure, F.X., Rioux, C., Caumes, E. and Yazdanapanah, Y. (2018). *Clinical management of respiratory syndrome in patients hospitalized for suspected Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in the Paris area from 2013 to 2016*. BMC Infect Dis.; 18:331.
- Both, T., van de Peppel, H.J. and Zillikens, M.C. (2018). *Hydroxychloroquine decreases human MSC-derived osteoblast differentiation and mineralization in vitro*. J Cell Mol Med. ;22(2):873-882.
- Boulware, D.R., Pullen, M.F., Bangdiwala, A.S., Pastick, K.A., Lofgren, S.M., Okafor, E.C., Skipper, C.P., Nascene, A.A., Nicol, M.R., Abassi, M., Engen, N.W., Cheng, M.P., LaBar, D., Lother, S.A., MacKenzie, L.J., Drobot, G., Marten, N., Zarychanski, R., Kelly, L.E., Schwartz, I.S., McDonald, E.G., Rajasingham, R., Lee, T.C. and Hullsiek, K.H. (2020). *A Randomized Trial of Hydroxychloroquine as Postexposure Prophylaxis for Covid-19*. N Engl J Med.;383(6):517-525.
- Browning, D.J. (2014). *Pharmacology of Chloroquine and Hydroxychloroquine. Hydroxychloroquine and Chloroquine Retinopathy*. ;35-63.
- Chen, S., Ye, J., Chen, X., Shi, J., Wu, W., Lin, W., Lin, W., Li, Y., Fu, H. and Li, S. (2018). *Valproic acid attenuates traumatic spinal cord injury-induced inflammation via STAT1 and NF- κ B pathway dependent of HDAC3*. J Neuroinflammation. ;15(1):150.
- Collins, K.P., Jackson K.M. and Gustafson, D.L. (2018). *Hydroxychloroquine: A Physiologically-Based Pharmacokinetic Model in the Context of Cancer-Related Autophagy Modulation*. J Pharmacol Exp Ther. ;365(3):447-459.
- Draker, R., Ng, M. K., Sarcinella, E., Ignatchenko, V., Kislinger, T., and Cheung, P. (2012). *A combination of H2A. Z and H4 acetylation recruits Brd2 to chromatin during transcriptional activation*. PLoS genetics, 8(11), e1003047.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. and Calos, M.P. (Jan 1987). *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system*. Mol. Cell. Biol. 7 (1): 379–387.
- Ghasemnejad-Berenji, M. and Pashapour, S. (2021). *Favipiravir and COVID-19: a simplified summary*. Drug research, 71(03), 166-170.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (July 1977). *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. The Journal of General Virology. 36 (1): 59–74.
- Harrison, I.F. and Dexter, D.T. (2013). *Epigenetic targeting of histone deacetylase: therapeutic potential in Parkinson's disease?* Pharmacol Ther. ;140(1):34-52.

- Hu, Q., Greene, C.S. and Heller E.A. (2020). *Specific histone modifications associate with alternative exon selection during mammalian development*. *Nucleic Acids Res.*;48(9):4709-4724.
- Ibáñez, S., Martínez, O., Valenzuela, F., Silva, F., and Valenzuela, O. (2020). *Hydroxychloroquine and chloroquine in COVID-19: should they be used as standard therapy?* *Clinical rheumatology*, 39(8), 2461-2465.
- Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B. and Yang, S. H. (2021). *The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2719.
- Joshi, S., Parkar, J., Ansari, A., Vora, A., Talwar, D., Tiwaskar, M. and Barkate, H. (2021). *Role of favipiravir in the treatment of COVID-19*. *International Journal of Infectious Diseases*, 102, 501-508.
- Karaarslan, N., Dogan, M., Yilmaz, I., Bilir, B., Hacıoglu, F., Onar, L.C. and Özbek, H. (2020). *Evaluation of Treatment of Patients with SARS-CoV-2 in line with Literature*. *Maltepe Med J.*; 12(2): 49-58.
- Kavsan, V. M., Iershov, A. V., and Balynska, O. V. (2011). *Immortalized cells and one oncogene in malignant transformation: old insights on new explanation*. *BMC cell biology*, 12(1), 1-2.
- Lin, Y.C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N. and Soete, A. (September 2014). *Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations*. *Nature Communications*. 5 (8): 4767.
- Liu, K., Zou, R., Cui, W., Li, M., Xueying, W., Dong, J., Li, H., Li, H., Wang, P., Shao, X., Su, W., Chan, H.C.S., Li, H. and Yuan, S. (2020). *Clinical HDAC Inhibitors Are Effective Drugs to Prevent the Entry of SARS-CoV2*, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, 3, 1361–1370
- Louis, N., Eveleigh, C. and Graham, F.L. (July 1997). *Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line*. *Virology*. 233 (2): 423–9.
- Lu, H. (2020). *Drug treatment options for the 2019-new coronavirus (2019-nCoV)*. *Biosci Trends*. 16;14(1):69-71.
- Meo, S. A., Klonoff, D. C. and Akram, J. (2020). *Efficacy of chloroquine and hydroxychloroquine in the treatment of COVID-19*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 4539-4547.
- Pahan, P. and Pahan, K. (2020). *Smooth or Risky Revisit of an Old Malaria Drug for COVID-19?* *J Neuroimmune Pharmacol.*;15(2):174-180.
- Pecly, I. M. D., Azevedo, R. B., Muxfeldt, E. S., Botelho, B. G., Albuquerque, G. G., Diniz, P. H. P. and Rodrigues, C. I. (2021). *COVID-19 and chronic kidney disease: a comprehensive review*. *Brazilian Journal of Nephrology*, 43, 383-399.
- Rolski, F. and Błyszczuk, P. (2020). *Complexity of TNF- α signaling in heart disease*. *Journal of clinical medicine*, 9(10), 3267.

- Romoli, M., Mazzocchetti, P., D'Alonzo, R., Siliquini, S., Rinaldi, V. E., Verrotti, A. and Costa, C. (2019). *Valproic acid and epilepsy: from molecular mechanisms to clinical evidences. Current neuropharmacology*, 17(10), 926-946.
- Rose-John, S. (2018). *Interleukin-6 family cytokines. Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(2), a028415.
- Saraiva, M., Vieira, P. and O'garra, A. (2020). *Biology and therapeutic potential of interleukin-10. Journal of Experimental Medicine*, 217(1).
- Sartor, G.C., Malvezzi, A.M., Kumar, A., Andrade, N.S., Wiedner, H.J., Vilca, S.J., Janczura, K.J., Bagheri, A., Al-Ali, H., Powell, S.K., Brown, P.T., Volmar, C.H., Foster, T.C., Zeier, Z. and Wahlestedt, C. (2019). *Enhancement of BDNF Expression and Memory by HDAC Inhibition Requires BET Bromodomain Reader Proteins. J Neurosci.*; 39(4):612-626.
- Seto, E. and Yoshida, M. (2014). *Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(4), a018713.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. and Graham, F.L. (June 2002). *Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. FASEB Journal*. 16 (8): 869–71.
- Singh, A.K., Bishayee, A. and Pandey, A.K. (2018). *Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy. Nutrients.*;10(6):731.
- Sinha, N. and Balayla, G. (2020). *Hydroxychloroquine and covid-19. Postgraduate medical journal*, 96(1139), 550-555.
- Sixto-López, Y., Bello, M. and Correa-Basurto, J. (2020). *Exploring the inhibitory activity of valproic acid against the HDAC family using an MMGBSA approach. J Comput Aided Mol Des*; 34, 857–878.
- Starkova, T. Y., Artamonova, T. O., Ermakova, V. V., Chikhirzhina, E. V., Khodorkovskii, M. A. and Tomilin, A. N. (2019). *The profile of post-translational modifications of histone H1 in chromatin of mouse embryonic stem cells. Acta Naturae (англоязычная версия)*, 11(2 (41)), 82-91.
- Tanaka, T., Narazaki, M. and Kishimoto, T. (2014). *IL-6 in inflammation, immunity and disease. Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(10), a016295.
- Tett, S., Cutler, D. and Day, R. (1990). *Antimalarials in rheumatic diseases. Baillieres Clin Rheumatol.*; 4(3):467-89.
- Tian, S., Lei, I., Gao, W., Liu, L., Guo, Y., Creech, J. and Wang, Z. (2019). *HDAC inhibitor valproic acid protects heart function through Foxm1 pathway after acute myocardial infarction. EBioMedicine*, 39, 83-94.
- Tsai, C.H., Li, C.H., Liao, P.L., Chang, Y.W., Cheng, Y.W. and Kang J.J. (2020). *Aza-PBHA, a potent histone deacetylase inhibitor, inhibits human gastric-cancer cell migration via PKC α -mediated AHR-HDAC interactions. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.*;1867(2):118564.

Valproic Acid. 20 Aralık 2023, Erişim adresi:
<https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682412.html#side-effects>

Van der Eb, A. (2017). *USA FDA CTR For Biologics Evaluation and Research Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting*. Lines 14–22: USFDA. p. 81. Archived from the original.

Xie, M., Tang, Y. and Hill, J.A. (2019). *HDAC inhibition as a therapeutic strategy in myocardial ischemia/reperfusion injury*. *J Mol Cell Cardiol.*;129:188-192.

Yilmaz, I., Akalan, H., Sirin, D. Y., Karaarslan, N., Ozbek, H., and Ates, O. (2022). *Is Favipiravir a Potential Therapeutic Agent in the Treatment of Intervertebral Disc Degeneration by Suppressing Autophagy and Apoptosis?* *Turkish neurosurgery*, 32(4), 680–687.

Zhang, Q., Chakravarty, S., Gherzi, D., Zeng, L., Plotnikov, A. N., Sanchez, R. and Zhou, M. M. (2010). *Biochemical profiling of histone binding selectivity of the yeast bromodomain family*. *PloS one*, 5(1), e8903.

Zhao, Z. and Shilatifard, A. (2019). *Epigenetic modifications of histones in cancer*. *Genome Biol.*;20(1):245.