

# Karaciğer Hücre Dizilerinde Paraoksonaz1 Ekspresyonu ve Aktivitesinin PPAR $\alpha$ ile Kontrolü

## [Regulation of Paraoxonase1 Expression and Activity By PPAR $\alpha$ in Liver Cell Lines]

Filiz Akbıyık<sup>1</sup>,  
Sevgi Çevik<sup>1</sup>,  
Tülin Bayrak<sup>2</sup>,  
A. Lale Doğan<sup>3</sup>,  
Ahmet Bayrak<sup>4</sup>,  
Ediz Demirpençe<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, Ankara

<sup>2</sup> Hacettepe Üniversitesi Kastamonu Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, Ankara

<sup>3</sup> Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji BD, Ankara

<sup>4</sup> Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ABD, Ordu

**Yazışma Adresi**  
[Correspondence Address]

**Doç.Dr. Filiz Akbıyık**

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı 06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye  
Tel: 312-305 16 52  
Faks: 312-324 58 85  
E-Mail: fakbiyik@hacettepe.edu.tr

Kayıt tarihi: 22.Mart.2010; Kabul tarihi: 18.Mayıs.2010

[Registered: 22.March.2010; Accepted: 18.May.2010]

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı insan hepatoselüler karsinoma ve rat hepatoma hücre dizilerinde, peroksizom proliferatörleri ile aktive olan reseptör-alfa (PPAR $\alpha$ ) ligandlarının paraoksonaz1 (PON1) enziminin ekspresyonuna ve aktivitesine etkisini araştırmak ve PPAR $\alpha$  ligandlarının kendi reseptör proteinlerinin ekspresyonunu nasıl etkilediğini incelemektir.

**Yöntem:** Kültürdeki insan hepatoselüler karsinoma (HepG2) ve rat hepatoma (MH-7777A) hücreleri PPAR $\alpha$  ligandları (WY-14,643 ve fenofibrat) ile inkübe edilmiştir. PON1 aktivitesi paraokson ve fenilasetat hidrolizi üzerinden spektrofotometrik olarak, PON1 ve PPAR $\alpha$  ekspresyonu ise western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Her iki PPAR $\alpha$  ligandının MH-7777A hücrelerinde PON1 ekspresyonunu artırdığı, HepG2 hücrelerinde ise sadece fenofibratın hafif artırıcı bir etkisi olduğu görülmüştür. Her iki hücre tipinde de WY-14,643 daha fazla olmak üzere kullanılan ligandlar PPAR $\alpha$  ekspresyonunu arttırmışlardır. PON1 ekspresyonundaki artışın aktiviteye aynı oranda yansımadağı görülmüştür.

**Sonuç:** HDL'nin ateroskleroza önleyici etkisinde önemli rolü olduğu düşünülen PON1 ekspresyonunun *in vitro* koşullarda PPAR $\alpha$  ligandları ile türe ve liganda özgü olarak değiştiği gösterilmiştir. Ateroskleroz mekanizmasında yer alan moleküller arasındaki etkileşimlerin iyi tanımlanması, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde önemli bir bilgi birikimi oluşturacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Paraoksonaz, PPAR (Peroksizom Proliferatörleri ile Aktive Olan Reseptörler), fenofibrat, ateroskleroz.

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study is to investigate the effect of peroxisome proliferator activated receptor- alpha (PPAR $\alpha$ ) ligands on the expression and activity of paraoxonase1 (PON1) enzyme and on the PPAR $\alpha$  receptor protein expression in human hepatocellular carcinoma and rat hepatoma cell lines.

**Materials and Methods:** Cultured human hepatocellular carcinoma (HepG2) and rat hepatoma (MH-7777A) cells were incubated with PPAR $\alpha$  ligands (WY-14,643 and fenofibrate). PON1 activity was measured spectrophotometrically through paraoxon and phenylacetate hydrolysis. PON1 and PPAR $\alpha$  expressions have been evaluated by western blotting.

**Results:** Both PPAR $\alpha$  ligands increased PON1 expression in MH-7777A cells. In HepG2 cells only fenofibrate slightly increased PON1 expression. In both cell lines, PPAR $\alpha$  ligands increased PPAR $\alpha$  expression, with WY-14,643 having a more prominent effect. It has been observed that the increase in PON1 expression did not correlate with the enzyme activity.

**Conclusion:** This study shows that PPAR $\alpha$  ligands regulate *in vitro* the expression of PON1 enzyme, that has a protective role against atherosclerosis, in a ligand and species dependent manner. A better understanding of interactions between molecules involved in atherosclerosis will provide crucial information in the therapy and prevention of cardiovascular diseases.

**Key Words:** Paraoxonase, PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptors), fenofibrate, atherosclerosis.

## Giriş

Aterosklerotik kalp hastalıkları tüm dünyada ve ülkemizde ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Bu hastalıkla ilgili risk faktörlerinin tanımlanması, hastalığın önlenmesi ve erken tanısı için büyük önem taşımaktadır. Aterosklerotik plak oluşumu sürecinde yer alan hücre ve moleküllerin gösterilmesi ve bunlarda meydana gelen değişikliklerin tanımlanması yapılan çalışmaların temelini oluşturmaktadır (1). Aterosklerotik plakta bulunan ve oluşumunda rolü olan başlıca moleküller lipidler ve lipoproteinlerdir. Lipid-protein içerikleri ve yoğunluklarına göre sınıflandırılan lipoproteinlerin sentez yerleri ve işlevleri birbirinden farklılık gösterir. Buna göre lipoproteinlerin dokulara kolesterol taşıyan bir grubu (LDL) risk faktörü olarak tanımlanırken, dokulardan kolesterolü alan bir diğer grubu (HDL) koruyucu olarak nitelendirilmiştir (2). HDL'nin bu etkiyi göstermesinde yapısında bulunan bazı proteinlerin (apolipoproteinler ve enzimler) rol oynadığı bilinmektedir (3). Bu enzimlerden biri olan paraoksonaz 1 (PON1) öncelikle organofosfatlara karşı etkinliği tanımlanmış, daha sonra ise HDL ile olan etkileşimi ve lipid peroksidleri hidroliz etmedeki fonksiyonu gösterilmiş olan bir enzimdir (4). HDL'nin kolesterolün ters taşınmasını sağlayarak ateroskleroza önlediği bilinen bir gerçektir (5). HDL, hem zardaki kolesterol düzeyini regüle ederek, hem de LDL'nin oksidasyonunu ve inflamatuvar yanıtı baskılayarak LDL'nin proaterojenik hale gelmesini engellemektedir (6). HDL ayrıca endotel hücre disfonksiyonunu ve aktivasyonunu önlemekte, endotelin bütünlüğünü koruyarak okside LDL'nin zararlı etkilerini azaltmaktadır. HDL'nin bu etkileri, yapısındaki lipidler ve biyoaktif lizosfingolipidlerin yanı sıra çeşitli aktivitelere sahip olan proteinlerden de kaynaklanmaktadır. Bunlar arasında, zardaki taşıyıcı bir protein (ABCA1, *ATP binding cassette transporter A1*) aracılığıyla hücrelerden kolesterolü alan Apo A1'e ek olarak çeşitli enzimler de bulunmaktadır (3). Yapılan çalışmalarda LDL'de oluşan lipid peroksidlerin, HDL varlığında azaldığı ve bu etkinin ortamdaki çözünür antioksidanlar tükendiği durumlarda da uzun süre devam ettiği gösterilmiştir (7). Bunun HDL üzerinde yer alan bir takım enzimatik aktivitelere ilgili olabileceği düşünülmüştür. HDL'nin özellikle LDL'deki oksidatif değişiklikleri önleyici etkisinde rolü olan enzimler PON1, PAFAH (platelet aktive edici faktör asit hidrolaz) ve glutatyon peroksidaz'dır (8). Bu enzimlerden özellikle HDL'ye özgü olması bakımından PON1 ön plana çıkmaktadır. Başlangıçta organofosfatları hidroliz eden bir enzim olarak tanımlanan PON1'in kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu rolü olabileceğini düşündüren de, HDL ile birlikte bulunması ve LDL'deki lipoperoksidleri hidroliz edebilmesidir (9). Ligandları aracılığı ile aktive olan nükleer reseptörler, önemli hücre fonksiyonlarında rol alan proteinlerin sentezini transkripsiyon düzeyinde kontrol eden faktörlerdir. Hücrelerde çok geniş bir protein grubunun sentezini regüle eden PPAR'lar diyabet, obezite, metabolik

sendrom, ateroskleroz, kronik inflamatuvar hastalıklar ve kanserin patogeneğinde rol almaktadırlar (10-12). Bu nedenle bu hastalıkların tedavisine yönelik araştırmaların hedefi haline gelmişlerdir ve PPAR ligandları klinik kullanımda yer almışlardır. Özellikle PPAR $\alpha$  ligandları hipolipidemik etkileri nedeniyle yaygın klinik kullanıma sahiptirler. Bu ilaçların ayrıca hipoglisemik ve anti-diyabetik etkileri de vardır (13). Ayrıca yapılan çalışmalarda PPAR $\alpha$  ligandlarının kendi reseptör protein ekspresyonunu ve hücrede yağ asidi oksidasyonunu artırdığı gösterilmiştir (14).

Bu çalışma kapsamında, ateroskleroz mekanizmasında ve lipid metabolizmasında önemli rol oynayan bazı moleküllerin transkripsiyon düzeyinde sentezini regüle eden ve halen klinikte yaygın olarak kullanılan PPAR $\alpha$  ligandlarının, PON1 ekspresyonu ve aktivitesine olan etkileri incelenmiştir. HDL yapısında yer alan ve oksidatif değişiklikleri önleyen PON1 enzim sentezinin ve aktivitesinin, PPAR $\alpha$  hedef genlerinden birinin işlevi olup olmadığının araştırılması kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmesini sağlayacaktır.

## Gereç ve Yöntemler

### Kimyasallar

Triton X-100, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), gliserol, Na-deoksikolat, tris-HCl, protein inhibitör kokteyli, sodyum klorür (NaCl), fetal sıvı serumu (FBS), akrilamid/bisakrilamid,  $\beta$ -merkaptotanol, sodyum dodesil sülfat (SDS), metanol, amonyum per sülfat (APS), *phosphate buffered saline* (PBS), temed, glisin, *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), penisilin-streptomisin, L-glutamin, tripsin, fenofibrat, WY-14,643, dimetil sülfoksit (DMSO), etanol (EtOH), fare anti- $\beta$ -aktin antikor (Ab) ve BCA (*bicinchoninic acid*) protein tayin kiti Sigma Chemical Company'den alındı. Keçi anti-PON1 Ab, tavşan anti-PPAR $\alpha$  Ab, tavşan anti-keçi peroksidaz bağlı Ab Santa Cruz Biotechnology'den, peroksidaz bağlı anti-tavşan Ab, peroksidaz bağlı anti-sıçan Ab ve ECL western blot analiz kiti Amersham Bioscience' dan sağlandı.

### Hücrelerin Kültür Ortamında Ligandlarla İnkübasyonu

Rat karaciğer hepatoma (MH-7777A) ve insan karaciğer hepatoselüler karsinoma (HepG2) hücre serileri DSMZ'den (Braunschweig, Almanya) alındı. Hücreler DMEM kültür ortamında 2 mM glutamin, 4,5 g/L glukoz, %1 (v/v) antibiyotik çözeltisi ve %10 FBS eklenerek çoğaltıldı. Her üç günde bir besi yeri değiştirilerek ve haftada bir kez tripsinle pasaj edilerek hücrelerin kültür ortamında devamlılığı sağlandı. Deneylerde ilk 20 pasajdaki hücreler kullanıldı daha sonra yeni hücreler açıldı. Hücreler her bir T<sub>25</sub> flaskta 2x10<sup>6</sup> sayıda olacak şekilde ekildi. Bir gün sonra hücreler serumsuz besiyeri ve ligandlarla inkübe edildi. Ligandlar, WY-14,643 etanolde, fenofibrat ise DMSO içinde çözülerek son konsantras-

yonları sırasıyla 50 µM ve 30 µM olacak şekilde kültür ortamına (maksimum %0,1 (v/v) etanol veya DMSO olacak şekilde) eklendi. Hücreler 48 saat sonra kazınarak eppendorf tüplere toplandı. Hücreler lizat oluşturulmadan önce PBS ile homojenize edildi ve 20 µl protein tayini için ayrıldı. Kalan hücreler 2000 xg'de +4°C'de 2dk santrifüjlendi. Süpernatant atılıp pellet %2 Triton X-100 içeren 50 mM Tris HCl (pH 7.4) tamponu ile homojenize edildi ve aktivite tayini için kullanıldı. Western blot için ise, hücre pelleti proteaz inhibitör kokteyli içeren lizis tamponu (%1 Triton X-100, 1 mM EDTA, %10 gliserol, %0,5 Na-deoksikolat, %0,08 SDS, tris-HCl) ile homojenize edildikten sonra deneyler yapılmaya kadar -80 C'de saklandı.

### **Hücrelerde PON1 Aktivitesinin Ölçümü**

PON 1 aktivitesi ölçümleri ön deneylerde hem kültür ortamında hem de hücre homojenatında yapıldı. Ancak homojenatta ölçülen aktivite değerleri daha yüksek bulunduğu için deneylere hücre homojenatı ile devam edildi. PON1 aktivitesi, substrat olarak paraoksonun kullanıldığı yöntemde paraoksonaz aktivitesi, fenilasetatın kullanıldığı yöntemde ise arilesteraz aktivitesi olarak verildi. Her bir yöntem için kontrol (DMSO ve etanol) dahil her koşul çift çalışıldı ve deneyler iki kez tekrarlandı. PON1 aktivitesinin ölçümü için paraoksonun enzimatik hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenolün spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanan yöntem kullanıldı. 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> ve 1 mmol/L NaCl içeren 0,1 mol/L pH:8 Tris-HCl çözeltisi ile reaksiyon ortamı oluşturuldu. Reaksiyon ortamına son konsantrasyonu 1,2 mmol/L olacak şekilde paraokson ve uygun oranda sulandırılmış örnek eklenerek reaksiyon başlatıldı ve oluşan reaksiyon ürünü 4-nitrofenol 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü (15). Arilesteraz aktivitesi ise substrat olarak kullanılan fenilasetatın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan fenolün 270 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile elde edildi. 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> içeren 0,1 mol/L pH:8 Tris-HCl çözeltisi ile reaksiyon ortamında oluşan fenol 270 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü (16).

### **Hücrelerde PON1 ve PPARα Protein Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi ile Gösterilmesi**

Farklı ligandlar ile muamele edilmiş olan hücre lizatlarında BCA (*Bicinchoninic Acid*) kiti ile protein tayini yapıldı. Her bir örnekten 30 µg protein, %10'luk poliakrilamid jel elektroforezine yüklendi ve 2 saat süresince yürütüldü. Daha sonra jel üzerindeki proteinler PVDF membrana (Amersham Bioscience) transfer edildi. Membranlar önce tavşan poliklonal anti-PPARα Ab (1:1000) ile daha sonra anti-tavşan ikincil Ab (1:5000) ile inkübe edildi. Membran üzerinde işaretlenmiş olan bantlar ECL kiti kullanılarak görünür hale getirildi ve film üzerinde görüntüledi. Aynı membranlar, yıkılarak bağlanmış olan antikolar uzaklaştırıldıktan sonra, keçi poliklonal anti-PON1 Ab (1:1000) ve tavşan anti-

keçi ikincil Ab (1:5000) ile inkübe edildi ve bantlar film üzerinde görüntüledi. Son olarak membranlar monoklonal fare anti-β-aktin Ab ile ve anti-fare ikincil Ab ile inkübe edildi ve görüntüledi. Her bir deney en az beş kez tekrarlandı ve burada elde edilen sonuçlardan en iyi görüntülenebilenler sunuldu. Image J programı kullanılarak bilgisayar destekli dansitometrik analiz yapıldı.

### **İstatistiksel Analizler**

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 5.0.1 programı ve 'Student t Test' kullanılarak yapıldı. P≤0,05 değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

### **Bulgular**

#### **PPARα Ligandlarının Karaciğer Hücrelerinde PON1 Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri**

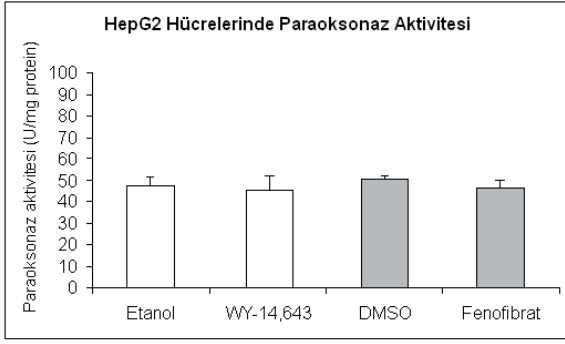
PON1 aktivitesi sonuçları, substrat olarak paraoksonun kullanıldığı yöntemde paraoksonaz aktivitesi, fenilasetatın kullanıldığı yöntemde ise arilesteraz aktivitesi olarak verildi. Enzim aktiviteleri ünite/mg protein olarak hesaplandı. HepG2 hücre serisinde substrat olarak paraoksonun ve fenilasetatın kullanıldığı her iki ölçümde, kontroller (etanol ve DMSO) ile karşılaştırıldığında WY-14,643 ve fenofibrat ile PON1 aktivitesinde anlamlı bir değişim izlenmedi (Şekil 1 ve 2). Aynı şekilde, MH-7777A hücrelerinde, substrat olarak paraoksonun kullanıldığı yöntemle, kontroller ile karşılaştırıldığında her iki ligandla muamele edilen hücrelerde PON1 aktivitesinde herhangi bir artış gözlenmedi (Şekil 3). Ancak MH-7777A hücrelerinde, WY-14,643 ligandının arilesteraz aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu gösterildi (p=0,047) (Şekil 4).

#### **PPARα Ligandlarının Karaciğer Hücrelerinde PON1 ve PPARα Ekspresyonları Üzerine Olan Etkileri**

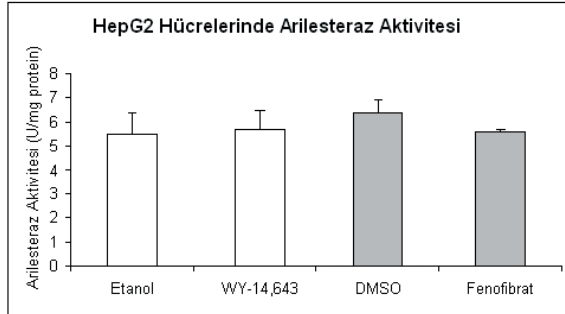
PPARα ve PON1 ekspresyonu western blot yöntemi ile tespit edildi. HepG2 ve MH-7777A hücrelerinde PPARα bandının ~52 kDa büyüklüğünde ve PON1 bandının ~43 kDa büyüklüğünde oldukları gözlemlendi. HepG2 hücrelerinde WY-14,643 ile muamele edilen hücrelerde kontrol ile karşılaştırıldığında PPARα ekspresyonunda artış izlenirken PON1 protein ekspresyonunda herhangi bir değişim gözlenmedi. Fenofibrat ile muamele edilen hücrelerde ise PON1 protein ekspresyonunda artış izlenirken PPARα protein ekspresyonunda herhangi bir etki görülmeydi. MH-7777A hücrelerinde her iki ligand ile muamele edilen hücrelerde kontroller ile karşılaştırıldığında hem PPARα hem de PON1 protein ekspresyonlarında artış izlendi (Şekil 5A, 6A).

#### **PPARα ve PON1 Protein Ekspresyonlarının Dansitometrik Analizleri**

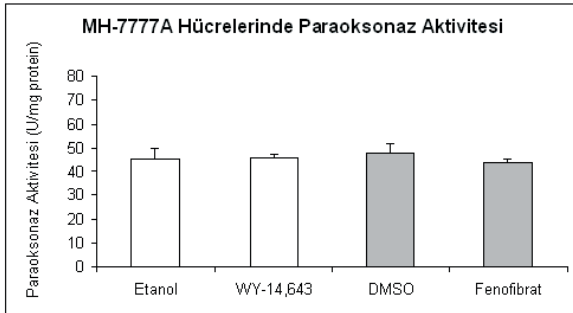
PPARα ve PON1 protein ekspresyonlarını gösteren bantların dansitometrik analizleri 'Image J' programı kullanılarak yapıldı. Kontroller ve ilaçlar ile muamele edilen



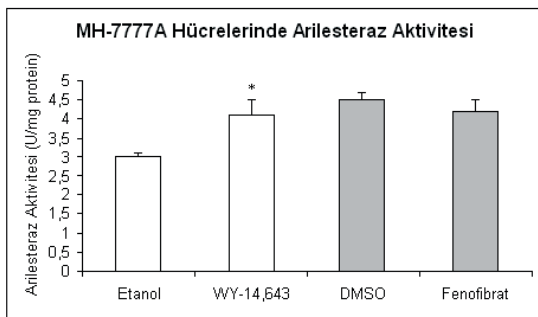
**Şekil 1.** HepG2 hücre serisinde paraoksonaz (PON1) aktivitesi. WY-14,643 etanolde, fenofibrat ise DMSO içinde çözülerek son konsantrasyonları sırasıyla 50  $\mu$ M ve 30  $\mu$ M olacak şekilde kültür ortamına eklendi.



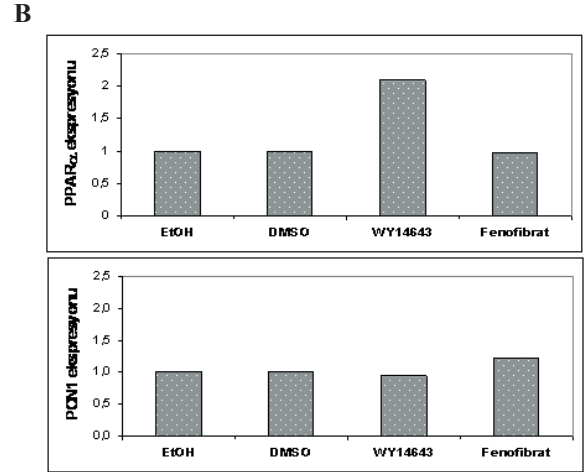
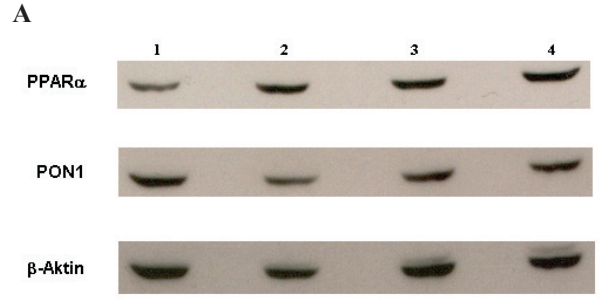
**Şekil 2.** HepG2 hücre serisinde arilesteraz aktivitesi. WY-14,643 etanolde, fenofibrat ise DMSO içinde çözülerek son konsantrasyonları sırasıyla 50  $\mu$ M ve 30  $\mu$ M olacak şekilde kültür ortamına eklendi.



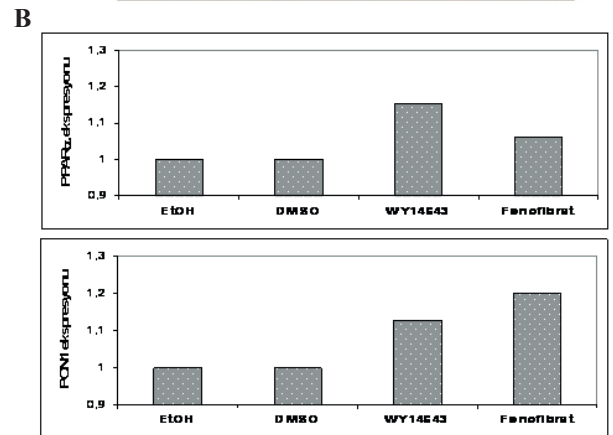
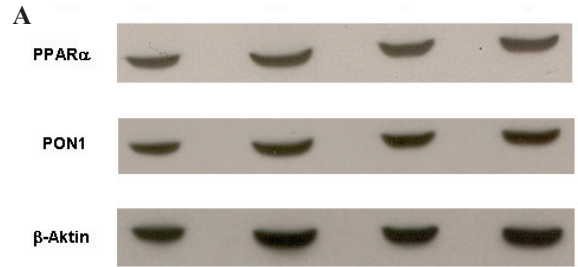
**Şekil 3.** MH-777A hücre serisinde paraoksonaz (PON1) aktivitesi. Kültür ortamına, WY-14,643 etanolde, fenofibrat ise DMSO içinde çözülerek ve son konsantrasyonları sırasıyla 50  $\mu$ M ve 30  $\mu$ M olacak şekilde eklendi.



**Şekil 4.** MH-777A hücre serisinde arilesteraz aktivitesi. Kültür ortamına, WY-14,643 etanolde, fenofibrat ise DMSO içinde çözülerek ve son konsantrasyonları sırasıyla 50  $\mu$ M ve 30  $\mu$ M olacak şekilde eklendi. \* p=0,047



**Şekil 5A.** HepG2 hücrelerinde protein ekspresyonları. Hücreler etanol, DMSO, 50  $\mu$ M WY-14,643 ve 30  $\mu$ M fenofibrat ile 48 saat inkübe edildikten sonra PPAR $\alpha$  ve PON1 protein ekspresyonlarına bakıldı.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1: Etanol, 2: DMSO, 3: WY-14,643, 4: Fenofibrat. **5B.** HepG2 hücrelerinde PPAR $\alpha$  ve PON1 protein ekspresyonlarının dantsimetrik analizleri.



**Şekil 6A.** MH-777A hücrelerinde protein ekspresyonları. Hücreler, etanol, DMSO, 50  $\mu$ M WY-14,643 ve 30  $\mu$ M fenofibrat 48 saat inkübe edildikten sonra PPAR $\alpha$  ve PON1 protein ekspresyonlarına bakıldı.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1: Etanol, 2: DMSO, 3: WY-14,643, 4: Fenofibrat. **6B.** MH-777A hücrelerinde PPAR $\alpha$  ve PON1 protein ekspresyonlarının dantsimetrik analizleri.



hücrelerdeki protein bant yoğunlukları,  $\beta$ -aktine ait bant yoğunluklarına oranlanarak protein ekspresyonları sayısal olarak ifade edildi. Etanol ve DMSO ile muamele edilen örneklerin sonuçları 1 (bir) kabul edilerek diğer örneklerin hesaplamaları yapıldı (Şekil 5B, 6B).

## Tartışma

Koroner arter hastalıklarında yaş, cinsiyet, aile öyküsü, genetik yatkınlık ve doğum ağırlığı gibi faktörler değiştirilemez risk faktörleri olarak tanımlanırken; yüksek total kolesterol, yüksek LDL, düşük HDL, yüksek kan basıncı, sigara, egzersiz eksikliği, obezite, diyabet ve glukoz intoleransı gibi faktörler değiştirilebilir kabul edilmektedir (7). Ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde HDL önemli bir yere sahiptir ve HDL düzeylerinin düşük olması kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olarak değerlendirilir.

Yapılan bir çok çalışma, çeşitli mekanizmalarla etki gösteren hipolipidemik ilaçların, serum PON1 aktivitesini etkileyerek veya HDL ve LDL üzerindeki okside lipidleri uzaklaştırarak antiaterojenik etki yaptığı hipotezini desteklemektedir. PON1 enzimi ve PPAR $\alpha$  reseptörünün kardiyovasküler hastalıkların gelişimi ve tedavisinde çok önemli rolleri olduğu öne sürülmektedir. Bu iki proteinin birbiri ile olan etkileşimi çeşitli çalışmalarla ortaya konulmaya çalışılmıştır. Fare hepatoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada PPAR $\alpha$  ligandlarının NF $\kappa$ B tarafından baskılanan PON1 ekspresyonunda artışa neden olduğu belirtilmiştir (18). Bizim çalışmamızda da PPAR $\alpha$  ligandlarının özellikle rat hepatoma hücrelerinde PON1 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bazı *in vivo* çalışmalarda plazma lipid düzeyleri normal olan ratlara PPAR $\alpha$  agonisti fenofibratın verilmesi ile plazma PON1 aktivitesinin önemli derecede azaldığı gözlenmiştir (19, 20). İnsan hepatoma hücre dizilerinde yapılan diğer çalışmalarda ise fenofibrat ve statinlerin PON1 geni üzerine zıt etkiler meydana getirdikleri, fenofibratın PON1 enzim aktivitesini artırdığı, farklı statinlerin ise azalttığı öne sürülmüştür (21, 22). Bizim çalışmamızda ise fenofibratın, PON1 ekspresyonunu, insan hepatoselüler karsinoma hücrelerinde hafif düzeyde, rat hepatoma hücrelerinde ise belirgin düzeyde artırdığı görülmüştür.

Bu çalışmada hiperlipidemide yaygın olarak kullanılan fenofibratın ve potent bir PPAR $\alpha$  ligandı olan WY-14,643'ün, insan (HepG2) ve rat (MH-7777A) kaynaklı karaciğer hücre dizilerinde PON1 enzim aktivitesi ve protein ekspresyonuna etkileri incelenmiştir. Daha önce yaptığımız bir çalışmada rat ve insan kaynaklı hücre gruplarında farklı ligandlarla farklı hücreliler yanıtı oluşturduğu gösterilmiştir (23). O nedenle bu çalışmamızda da, PON1 ekspresyonu ve aktivitesi açısından karaciğer hücrelerinde hem türe hem de liganda özgü bir cevap olup olmadığı incelenmiştir.

HepG2 hücrelerinde WY-14,643 ile muamele edilen hücrelerde kontrol ile karşılaştırıldığında PON1 ekspresyonunda herhangi bir değişim gözlenmezken fenofibrat ile muamele edilen hücrelerde bir artış izlenmiştir. Bu so-

nuç ile klinikte kullanılan fibrat analogu ilaçların PON1 protein miktarını artırarak HDL'nin antiaterojenik etkisine katkıda bulunabileceği düşünülmüştür. MH-7777A hücrelerinde ise her iki ligand PON1 ekspresyonunu belirgin bir şekilde artırmıştır. Dolayısıyla PON1 ekspresyonu açısından da türler arasında liganda özgü farklı etkiler olabileceği görülmüştür. Çalışmamızda ayrıca bu ligandların kendi bağlandıkları reseptör proteinlerinin (PPAR $\alpha$ ) ekspresyon düzeylerine etkileri değerlendirilmiştir. Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda, fibrat grubu ligandların hem rat hepatoma hücrelerinde hem de *in vivo* koşullarda karaciğer hücrelerinde PPAR $\alpha$  ekspresyonunu belirgin düzeyde artırdığı gösterilmiştir (14, 23). Bu çalışmamızda da her iki ligand ile muamele edilen MH-7777A hücrelerinde kontroller ile karşılaştırıldığında hem PPAR $\alpha$  hem de PON1 protein ekspresyonlarında artış izlenmiştir. HepG2 hücrelerinde PPAR $\alpha$  protein ekspresyonunun, kendi ligandı olan WY-14,643 ile arttığı ancak fenofibrat ile değişmediği gözlenmiştir. Bu sonuç, daha önceki çalışmamızda gösterdiğimiz WY-14,643'ün her iki türe ait hücrede de güçlü bir etkisi olduğu, ancak fibratların rat hücrelerinde çok etkili olmalarına karşılık insan kaynaklı hücrelerde yağ asitleri ile kıyaslandığında daha zayıf bir PPAR $\alpha$  indükleyicisi oldukları sonucuyla uyumludur (23).

PON1 enzim aktivitesi, hem paraokson hem de fenilasetatın substrat olarak kullanıldığı paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteyi üzerinden tayin edilmiştir. Bu çalışmada PON1 aktivitesi ölçümlerinde kullanılan substratlardan paraokson PON1'e özgüdür, fenilasetat ise PON dahil tüm arilesterazların ölçümünde yaygın olarak kullanılmaktadır. Paraokson kendi kendine hidroliz olabilmekte iken fenilasetat daha stabildir (24). Ayrıca paraoksonla yapılan aktivite tayinlerinde, kullanılan çözücüye bağlı olarak bile farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu nedenle PON1 aktivitesi ölçümlerinde her iki substrat da kullanılmıştır. HepG2 hücrelerinde PON1 aktivitesinde her iki ligandla herhangi bir aktivite artışı gözlenmezken, MH-7777A hücrelerinde sadece WY-14,643'ün PON1 arilesteraz aktivitesini artırdığı izlenmiştir.

Protein ekspresyonundaki artışın, anlamlı bir aktivite artışı meydana getirememesi, PPAR $\alpha$  üzerine etkili ajanların PON1 enzimi ile etkileşebilecek başka birçok proteinin de sentezini etkilemesi nedeniyle olabileceğini düşündürmektedir. PPAR $\alpha$ , metabolizma ile ilgili bir çok proteinin transkripsiyon düzeyinde ekspresyonunu düzenlemektedir. Ancak sentezini regüle ettiği proteinlerin çoğu henüz bilinmemektedir. PPAR $\alpha$  ligandları hücrelerde PON1 protein sentezini artırırken bu enzimi inhibe eden başka birçok proteinin sentezini de gerçekleştiriyor olabilir. Protein-protein etkileşimleri nedeniyle *in vitro* koşullarda PON1 ortamda bulunmasına rağmen aktivitesinde bir artışa izin vermiyor olabilir. İnhibitör bir protein enzime direkt bağlanarak ya da yapısal bir değişiklik meydana getirerek aktivitesini engelliyor olabilir. Diğer bir neden ise PON1 sentezi gerçekleştikten sonra, post-translasyonel modifikasyonlardaki farklılıklar nedeniyle

le aktif forma dönüşmemesi olarak düşünülmüştür (25). Bu çalışma kapsamında ateroskleroz mekanizmasında yer alan bazı molekülleri hedefleyen PPAR $\alpha$  ligandlarının yine aynı mekanizmada önemli rol oynayan PON1 proteininin ekspresyonu ve aktivitesine olan etkileri incelenmiştir. İnsan ve rat kaynaklı karaciğer hücrelerinde farklı ligandların türe özgü farklı yanıtlar oluşturduğu gözlenmiştir. Hiperlipidemi tedavisinde kullanılan fenofibratin hem insan hem de rat kaynaklı karaciğer hücrelerinde PON1 protein miktarını artırıcı etkisi görülmüştür. Potent bir PPAR $\alpha$  ligandı olan WY-14,643 her iki hücre dizisinde PPAR $\alpha$  protein miktarını artırırken sadece rat kaynaklı karaciğer hücrelerinde PON1 ekspresyonunu indüklemiştir. PON1 protein miktarındaki artışın *in vitro* ortamda aktivitede herhangi bir artışa neden olmaması, *in vivo* koşullarda da aynı etkinin ortaya çıkacağı anlamına gelmemektedir. Bu çalışmalarda biyolojik model olarak kültürde çoğaltılabilen tümör kaynaklı hücreler kullanıldığı için normal hepatositlerin farklı bir gen ekspresyonu örüntüsüne sahip olabileceği unutulmamalıdır. PPAR $\alpha$  ligandları ile *in vivo* koşullarda yapılacak olan aktivite çalışmalarında, serumda HDL'ye bağlı olan PON1 enzim aktivitesi sonuçları protein miktarı ile paralellik gösteriyor olabilir. Bu nedenle PPAR $\alpha$ 'ya bağlanarak etki eden ligandların PON1 proteininin ekspresyonu ve aktivitesine olan etkilerinin, *in vivo* ve klinik çalışmalarla gösterilmesi gerekmektedir. Ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde daha potent ajanların geliştirilmesi ve bu konuda tüm mekanizmaların açıklık kazanması bu hastalıklar nedeniyle ölümlerin azalmasını sağlayacaktır.

## Bilgi ve teşekkür:

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından, 105S402 no'lu proje ile desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- [1]. Homma, Y. (2004). Predictors of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 11: 265-270.
- [2]. Mertens A, Holvoet, P. (2001). Oxidized LDL and HDL: antagonists atherothrombosis. *FASEB J* 15: 2073-2084.
- [3]. Von Eckardstein A, Hersberger M, Rohrer L. (2005). Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. *Curr Opin Clin Nutr* 8: 147-152.
- [4]. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connely PW, Hegele RA. (1996). Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 7: 69-76.
- [5]. Assmann G, Gotto AM. (2004). HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 109 (3): 1118-1114.
- [6]. Negre-Salvayre A, Dousset N, Ferretti G, Bacchetti T, Curatola G, Salvayre R. (2006). Antioxidant and cytoprotective properties of high density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic Biol Med* 41: 1031-1040.
- [7]. Mackness MI, Abbott C, Arrol S, Durrington PN (1993). The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 294: 829-834.
- [8]. Mackness MI, Durrington PN. (1995). HDL, its enzymes and its potential influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 115: 243-253.
- [9]. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. (1991). Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein. *FEBS Lett* 286: 152-154.
- [10]. Kliewer SA., Xu HE, Lambert MH, Wilson TM. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Rec Prog Horm Res* 56: 239-263.
- [11]. Ray DM, Akbiyik F, Bernstein SH, Phipps RP. (2005). CD40 engagement prevents peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist-induced apoptosis of B lymphocytes and B lymphoma cells by an NF-kappaB-dependent mechanism. *J Immunol* 174: 4060-4069.
- [12]. Akbiyik F, Ray DM, Gettings KF, Blumberg N, Francis CW, Phipps RP. (2004). Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPAR (gamma), and PPAR (gamma) agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. *Blood* 104: 1361-1368.
- [13]. Terra SG, Fracone OL, Contant CF, Gao X, Lewin AJ, Nguyen TT. (2008). Efficacy and safety of a potent and selective peroxisome proliferator activated receptor alpha agonist in subjects with dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 102: 434-439.
- [14]. Akbiyik F, Cinar K, Demirpence E, Ozsullu T, Tunca R, Haziroglu R, Yurdaydin C, Uzunalimoglu O, Bozkaya H. (2004). Ligand-induced expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and activation of fatty acid oxidation enzymes in fatty liver. *Eur J Clin Invest*. 34: 429-35.
- [15]. Lourdes R, Bharti M, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. (2001). Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 354: 1-7.
- [16]. Juretic D, Tadjanovic M, Rekić B, Simeon-Rudolf V, Reiner E, Barićić M. (2001). Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: Cohort study. *Croat Med J* 42: 146-150.
- [17]. Poulter N. (2003). Global risk of cardiovascular disease. *Heart*. 89 (2): 112-115.
- [18]. Han CY, Chiba T, Campbell JS, Fausto N, Chaisson M, Orasanu G, Plutzky J, Chait A. (2006). Reciprocal and coordinate regulation of serum amyloid A versus Apolipoprotein A-I and Paraoxonase-1 by inflammation in murine hepatocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26: 1806-1813.
- [19]. Beltowski J, Wojcicka G, Mydlarczyk M. (2002). The effect of PPARalpha agonist, fenofibrate on lipid peroxidation, total antioxidant capacity and plasma PON1 activity. *J Physiol Pharmacol* 53: 463-475.
- [20]. Paragh G, Seres I, Harangi M, Balogh Z, Illyés L, Boda J, Szilvássy Z, Kovács P. (2003) The effect of micronised fenofibrate on paraoxonase activity in patients with coronary heart disease. *Diabetes Metab* 29: 613-618.
- [21]. Gouédard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y. (2003). Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 63: 945-956.
- [22]. van Wijk J, Coll B, Cabezas MC. (2006). Rosiglitazone modulates fasting and post-prandial paraoxonase 1 activity in type II diabetic patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 1134-1137.
- [23]. Akbiyik F, Ray D, Bozkaya H, Demirpence E. (2004). Ligand and species-dependent activation of PPARalpha. *Cell Physiol Biochem* 14: 269-76.
- [24]. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN (1991). Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos* 19: 100-106.
- [25]. Satoh T, Taylor P, Bosron WF, Sanghani SP, Hosokawa M, La Du BN.(2002). Current progress on esterases: From molecular structure to function. *Drug Metab Dispos* 30 (5): 488-493.