

# Fulvik asit, insan monositlerinde homosistein kaynaklı siklooksijenaz-2 ekspresyonunu zayıflatır

Shao-Ju Chien<sup>1</sup>, Te Chuan Chen<sup>2</sup>, Hsing-Chun Kuo<sup>3,4,5</sup>, Cheng-Nan Chen<sup>6\*</sup> ve Shun-Fu Chang<sup>7\*</sup>

## Soyut

**Arka plan:** Homosistein ve siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi proinflatuar mediatörler, vasküler disfonksiyon ve kardiyovasküler hastalık riskleri ile ilişkilendirilmiştir. Bir hümkik madde bileşikler sınıfı olan fulvik asit (FA), çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir. Bununla birlikte, FA'nın monositlerin enflatuar tepkileri üzerindeki etkisi belirsizliğini koruyor. FA'nın insan monositlerinde homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonu üzerindeki düzenleyici etkisini araştırdık.

**Yöntemler:** Tüm deneylerde periferik kan monositleri ve U937 hücreleri kullanıldı. Sırasıyla COX-2 mRNA ekspresyonunu ve PGE2 sekresyonunu analiz etmek için gerçek zamanlı PCR ve ELISA testi kullanıldı. Spesifik inhibitörler, homosistein aracılı COX-2 mRNA ekspresyonu ve PGE2 salgılanmasının mekanizmasını araştırmak için kullanıldı. Luciferase testi, transkripsiyon faktörü ELISA ve kromatin immünopresipitasyon, monositler üzerindeki homosistein etkisinin FA aracılı inhibisyonunda nükleer faktör-κB'nin rolünü belirlemek için kullanıldı.

**Sonuçlar:** Sonuçlar, monositlerin FA ile ön muameleye tabi tutulmasının homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. U937 monositlerinin homosistein ile uyarılması, ERK ve JNK fosforilasyonunda hızlı artışlara neden oldu; ERK ve JNK inhibitörü, homosistein kaynaklı nükleer faktör-κB aktivasyonunu ve COX-2 ekspresyonunu zayıflattı. Transkripsiyon faktörü ELISA ve kromatin immünopresipitasyon deneyleri, FA'nın monositlerde nükleer faktör-κB'nin bağlanma aktivitesinde ve in vivo promotör bağlanmasında homosistein kaynaklı artışları bloke ettiğini gösterdi.

**Sonuçlar:** Bulgularımız, FA'nın monositlerde homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonunu inhibe ettiği moleküler bir mekanizma ve FA'nın enflamasyona karşı farmasötik tedavide kullanılması için bir temel sağlar.

**Anahtar Kelimeler:** Anti-inflamasyon, Siklooksijenaz-2, Fulvik asit, Homosistein, Monositler

## Arka Plan

Hümkik maddelerin bir bileşik sınıfı olan Fulvik asit (FA), ölü bitkiler, mikroplar ve hayvanlar gibi organik maddelerin kimyasal ve biyolojik süreçlerle parçalanmasıyla oluşan polifenolik asit bileşiklerinin bir karışımıdır [1]. Son zamanlarda FA'nın insan vücudu üzerinde nutrasötik özelliklere ve fizyolojik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Nöroprotektif etkisi ile doğal olarak oluşan en ilginç fitokimyasallardan biridir [2,3]. FA'nın antimikrobiyal ve antiinflatuar özellikleri de bildirilmiştir [4,5]. ek olarak

Turbadan ekstrakte edilen FA, bir antioksidan aktiviteye ve bazofillerde kimyasal aracı salımını inhibe edici bir etkiye sahipti [6]. Bu sonuçlar, FA'nın biyolojik aktivitelerinde baskın bir role sahip olabileceğini ima eder. FA'nın hücresele ve biyolojik fonksiyonlar üzerindeki etkisine ilişkin çok sayıda çalışma olmasına rağmen, FA'nın düzenleyici etkisinin altında yatan ayrıntılı mekanizmalar belirsizliğini koruyor.

Aterosklerotik lezyonların oluşumu, kronik inflamatuar yanıtların bir süreci olarak kabul edilir [7]. Sigara içme, diabetes mellitus, hiperlipidemi, hipertansiyon ve hiperhomosistein mia dahil olmak üzere çeşitli risk faktörlerinin ateroskleroza teşvik etmede yer aldığı bilinmektedir. Hiperhomo sisteinimli hastalarda kandaki homosistein düzeylerinde anormal yükselme bildirilmiştir [8]. Şiddetli hiperhomosisteinemi (100 mmol/L'den yüksek homosistein plazma seviyeleri)

\* Yazışma: cnchen@mail.ncyu.edu.tw; sfc0415@ym.edu.tw

<sup>6</sup> Biyokimyasal Bilim ve Teknoloji Bölümü, Ulusal Chiayi Üniversitesi, Chiayi 600, Tayvan

<sup>7</sup> Biyofotonik ve Moleküler Görüntüleme Araştırma Merkezi, Ulusal Yang Ming Üniversitesi, No. 155, Sec. 2, Linong St. Beitou District, Taipei, Tayvan Yazar bilgilerinin tam listesi makalenin sonunda mevcuttur.

aşırı erken ateroskleroz ve erken tıkaçıcı vasküler hastalığı olan hastalarda bulunmuştur [9]. Hiperhomosisteinemi, ateroskleroz için bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmesine rağmen, homosisteinin vasküler hasara neden olma mekanizması henüz anlaşılammıştır. Endotel disfonksiyonu ve aktivasyon, homosistein ile ilişkili vasküler patolojideki anahtar olaylardan biridir [10]. Ayrıca oksidatif stres, inflamasyon ve düz kas hücresi proliferasyonu da bu sürece dahil olur.

Monositler, erken aterosklerotik plaklara sızan birincil enflamatuvar hücre tipidir. Monosit türevli makrofajlar tarafından proinflamatuvar mediatörlerin salınması, aterosklerotikte flamatuvar yanıtlarda çok önemli bir rol oynayabilir [11]. Siklooksijenaz-2 (COX-2), eikozanoidlerin sentezi için anahtar bir enzimdir. COX-2, sitokinler, mitojenler ve lipopolisakarit gibi proinflamatuvar faktörlerin uyarılması nedeniyle vasküler dokularda önemli ölçüde ekspresye edilir [12]. Aktive edilmiş monositlerdeki COX-2'nin inflamasyon ve aterosklerozda özel bir önemi olduğu açıktır [13]. Makrofajların aktivasyonu daha önce COX-2'nin indüksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. COX-2 ekspresye eden makrofajların, kemo taksileri aktive etmek, vasküler geçirgenliği arttırmak ve hücre proliferasyonunu teşvik etmek dahil proinflamatuvar etkileri olan prostaglandinler ürettiği bilinmektedir [12]. Ateroskleroz, monosit fonksiyonları ve hiperhomosisteinemi dahil olmak üzere, katkıda bulunan faktörlerin karmaşık bir dizisini içeren çok faktörlü bir hastalık olduğundan, homo sisteinin insan monositlerinde COX-2 gen ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırmak gereklidir.

Bu çalışmada, birincil insan kan monositlerinde ve insan monositik U937 hücrelerinde homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonunu modüle etmede FA'nın rollerini ve ayrıca düzenleyici etkilerin altında yatan moleküler mekanizmaları araştırdık.

#### Yöntemler

##### Malzemeler

Tüm kültür malzemeleri Gibco'dan (Grand Island, NY, ABD) satın alınmıştır. FA, Esther Material Technology Co., Ltd., Kaohsiung, Tayvan tarafından %20'lik bir solüsyon olarak sağlandı. PD98059 (ERK inhibitörü), SP600125 (JNK inhibitörü) ve SB203580 (p38 inhibitörü), Calbiochem'den (La Jolla, CA) satın alınmıştır. ERK1/2, JNK1/2, fosfo-ERK1/2, fosfo JNK1/2 ve NF-κB p65'e karşı fare monoklonal antikorları (mAB'ler), Santa Cruz Biotechnology'den (Santa Cruz, CA) satın alınmıştır. Pirolidin ditiyokarba mate (PDTTC), SN50 ve reaktif sınıfındaki diğer kimyasallar Sigma'dan (St. Louis, MO) elde edildi.

##### Hücre kültürü

Buffy coat'dan (Tayvan Kanı) elde edilen insan monositleri Center, TBSF, Tayvan) önceden olduğu gibi izole edildi.

[14] açıklanmıştır. Periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC'ler), Histopaque 1077 yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile izole edildi. Monositler, manyetik aktive edilmiş hücre sıralama (MACS) monosit izolasyon kiti (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) kullanılarak negatif seçimle PBMC'lerden saflaştırıldı. İnsan monositik hücre dizisi U937, Gıda Endüstrisi Araştırma ve Geliştirme Enstitüsü'nün (Hsinchu, Tayvan) Bioresources Toplama ve Araştırma Merkezi'nden (BCRC) temin edildi. Hücreler, %10 FBS ile desteklenmiş RPMI-1640 ortamında tutuldu.

##### Gerçek zamanlı kantitatif

PCR Gerçek zamanlı PCR gerçekleştirildi ve ürünler, FastStart DNA SYBR Green I kitiyle (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) bir ABI Prism 7900HT kullanılarak tespit edildi. Bu çalışmada tasarlanan primerler, COX-2 ileri primer, 5'-CTGAA AGATG GACGC TCAAT-3'; COX-2 ters primer, 5'-CGTTT CAGAA GCCAG AAGAG-3'; 18S rRNA ileri primer, 5'-CGGCG ACGAC CCATT CGAAC-3', 18S rRNA ters primer, 5'-GAATC GAACC CTGAT TCCCC GTC-3'.

Ölçüm, 2  $\Delta\Delta Ct$  yöntemi [15] kullanılarak yapıldı. Tüm numuneler çift olarak ölçüldü. Kantitatif değer olarak her iki kopyanın ortalama değeri kullanıldı.

##### PGE2 tahlili

Şartlandırılmış ortamdaki PGE2 seviyeleri, üreticinin talimatlarına göre PGE2 ELISA tahlil kiti (R & D Systems) kullanılarak belirlendi [16].

##### Western blot analizi

Örnekler, %1 NP-40, %0.5 sodyum deoksikolat, %0.1 SDS ve bir proteaz inhibitör karışımı (PMSF, aprotinin ve sodyum ortovanadat) içeren bir tamponla parçalandı. Protein konsantrasyonu, Bio-Rad protein tahlil kiti (Bio-Rad, Hercules, CA) kullanılarak belirlendi. Eşit miktarda toplam protein, SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) (%10 çalışma, %4 istifleme) ile ayrıldı, bir nitrosetülöz zara aktarıldı ve belirtilen antikorlar ve Western-Light chemilu minescent saptama sistemi (Bio) kullanılarak analiz edildi. -Rad).

##### Lusiferaz tahlilleri

Plazmit pGL4'ün (Promega, Madison, WI) ateşböceği lusiferaz raportör genine bağlı -918/+49 COX-2 5'-yan DNA içeren insan COX-2 promotör yapıları daha önce bildirildiği gibi kullanılmıştır. 1 mg/ml'lik bir konsantrasyon, Lipofektamin (Gibco) ile DLD-1 hücrelerine transfekte edildi. pSV-p-galaktosidaz plazmidi, transfeksiyon etkinliğini normalleştirmek için birlikte transfekte edildi. Elde edilen değerler, hücre lizatlarındaki p-galaktosidaz seviyelerine göre normalleştirildi.  $\beta$ -galaktosidaz aktiviteleri bir tahlil kiti ile belirlendi ve numuneler arasında <%20 varyasyon sergiledi.

### Transkripsiyon faktörü deneyleri (TF ELISA deneyleri)

Hücrelerin nükleer ekstraktları, nükleer protein ekstrakt kitleri (Panomics, Redwood City, CA) kullanılarak hazırlandı. Ticari olarak temin edilebilen ELISA kitleri (Panomics) kullanılarak NF- $\kappa$ B p65 aktivasyonunun kantitatif ölçümleri için eşit miktarda nükleer protein kullanıldı.

### Kromatin immünopresipitasyon (ChIP)

ChIP analizleri yayınlanmış bir protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir [17]. Kısaca, kromatinler sonikasyonla kesildi (3 kez, 10 saniye açık, 60 saniye kapalı). Önceden temizlenmiş ekstraktlar, tavşan anti-p65 ve c-jun antikoları veya tavşan IgG'si ile 4°C'de gece boyunca immüno-çökteltildi. DNA, çöktürülmüş komplekslerden izole edildi ve NF- $\kappa$ B bağlanma bölgelerini içeren insan COX-2 promotörlerinin kısmını yükselten aşağıdaki primerlerle PCR ile analiz edildi: 5'-GCCCT CCCC GGTAT CCCAT C-3' ve 5'-AAAA ATTGC GTAAG CCCGG T-3'. Yükleme kontrolü olarak toplam girdi nükleer ekstraktının bir kısmı kullanıldı.

### İstatistiksel analiz

Sonuçlar ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası (SEM) olarak ifade edilir. İstatistiksel analiz, iki veri grubu için bağımsız bir Student t testi ve varyans analizi (ANOVA) ve ardından çoklu karşılaştırmalar için Scheffe testi kullanılarak belirlendi. 0.05'ten küçük P değerleri anlamlı kabul edildi.

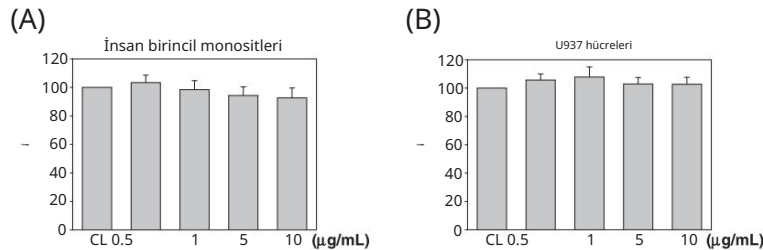
### Sonuçlar

FA'nın insan monositleri üzerindeki sitotoksik etkisi

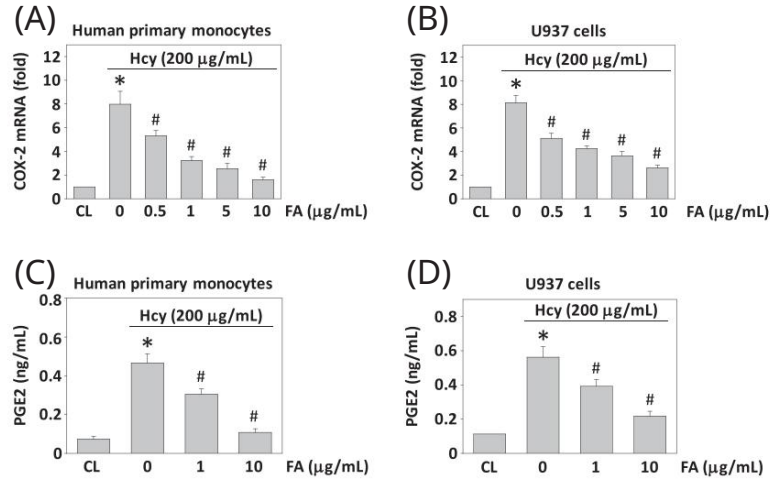
FA'nın monositlerin yaşayabilirliği üzerindeki etkisini incelemek için, insan birincil monositleri ve U937 hücreleri, 24 saat boyunca 0.5, 1, 5 veya 10  $\mu$ g/mL konsantrasyonda FA ile muamele edildi ve MTT tahlili yapıldı. Şekil 1'de gösterildiği gibi, FA ile tedavi edilmiş ve işlenmemiş insan primer monositleri (Şekil 1A) ve U937 hücreleri (Şekil 1B) arasında bilye yoluyla hücre üzerinde önemli bir fark yoktu. Bu sonuçlar, bu çalışmada kullanılan FA'nın monositler üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığını göstermektedir.

FA, monositlerde homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonunu inhibe eder FA'nın monositlerde homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonu üzerindeki etkilerini test etmek için insan birincil monositleri ve U937 hücreleri, 0.5, 1, 5 ve 10  $\mu$ g konsantrasyonlarda FA ile ön işleme tabi tutuldu. /mL 4 saat ve ardından FA varlığında 4 saat homosistein (200  $\mu$ M) ile uyarıldı. Gerçek zamanlı PCR analizinden elde edilen sonuçlar, homosisteinin, uyarılmamış hücrelerle karşılaştırıldığında monositik COX-2 mRNA ifadesinde önemli bir artışa neden olduğunu gösterdi (insan birincil monositleri için Şekil 2A, U937 hücreleri için Şekil 2B). COX-2 mRNA ekspresyonundaki bu artış, hücrelerin FA ile önceden işlenmesiyle önemli ölçüde inhibe edildi (Şekil 2A ve B) ve FA'nın inhibe edici etkisi doza bağımlı bir şekildedir. Koşullu ortamda PGE2 salgılanması için ELISA tahlilleri, monositlerin homosistein ile uyarılmasının, uyarılmamış hücrelerle karşılaştırıldığında monositlerden PGE2 salgılanmasında artışa yol açtığını gösterdi (insan birincil monositleri için Şekil 2C, U937 hücreleri için Şekil 2D). Monositlerin 1 veya 10  $\mu$ g/mL konsantrasyonda FA ile ön işleme tabi tutulması, homosistein kaynaklı PGE2 sekresyonunu azaltmıştır. Bu sonuç, FA'nın homosistein kaynaklı COX-2 gen ekspresyonu üzerindeki etkisine, monositlerden PGE2 salınımındaki karşılık gelen değişikliklerin eşlik ettiğini göstermektedir.

FA, transkripsiyon seviyesinde homosistein kaynaklı COX-2 gen ekspresyonuna aracılık eder Homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonunun FA modülasyonlarının transkripsiyonel olaylar olup olmadığını daha fazla belirlemek için U937 hücreleri, promotör bölgesini içeren COX-2 promotör yapısı ile geçici olarak transfekte edildi COX-2 ve haberci gen lusiferaz (p918- Luc), 4 saat FA ile ön işleme tabi tutuldu ve ardından 4 saat homosistein ile işlendi. 4 saat boyunca homosistein ile işlenen U937 hücreleri, uyarılmamış hücrelere kıyasla COX-2 promotör aktivitesini yaklaşık 7.65 kat önemli ölçüde artırdı (Şekil 3). Hücrelerin 4 saat süreyle FA (0,5-10  $\mu$ g/mL) ile ön işleme tabi tutulması bunu önemli ölçüde azalttı



Şekil 1 Fulvik asidin (FA) insan birincil ve U937 monositlerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. İnsan birincil monositleri (A) ve U937 hücreleri (B), belirtilen FA konsantrasyonları ile kültürlendi ve 24 saat boyunca 96 oyuklu bir plaka içinde 37°C'de inkübe edildi. Hücre canlılığı, "Yöntemler Bölümü"nde açıklandığı gibi değerlendirildi ve kontrol hücrelerinin yüzdesi (CL) olarak ifade edildi. Değerler, üç ayrı deneyin ortalamasının (SEM) ortalama  $\pm$  standart hatası olarak ifade edilir.



**Şekil 2** Fulvik asidin (FA) insan monositlerinde homosistein kaynaklı COX-2 mRNA ekspresyonu ve PGE2 salgılanması üzerindeki etkisi . İnsan birincil monositleri ve U937 hücreleri, 4 saat FA (0-10 µg/mL) ile ön işleme tabi tutuldu ve ardından 4 saat (A, B) ve 8 saat (C, D) homosistein (200 µg/mL) ile uyarıldı. Homosistein ile uyarılmayan monositler kontrol (CL) olarak kullanıldı. (A, B) RNA örnekleri izole edildi ve gerçek zamanlı PCR analizine tabi tutuldu. Veriler, üç ayrı deneyin 18S rRNA düzeyine normalize edilmiş CL monositlerinden flüoresan yoğunluğundaki kat değişiklikleri olarak sunulur. (C, D) Koşullu ortamda PGE2 salgılanması ELISA analizleriyle belirlendi. Veriler, ortalama ± üç ayrı deneyin ortalamasının (SEM) standart hatası olarak gösterilmiştir. \*P < 0.05, CL monositlerine karşı. #P < 0.05, FA ön tedavisi olmadan homosisteinle uyarılmış hücrelere karşı.

homosistein kaynaklı COX-2 promotör aktivitesi. Bu sonuçlar, homosistein tarafından FA aracılı COX-2 indüksiyonunun transkripsiyon seviyesinde düzenlendiğini göstermektedir.

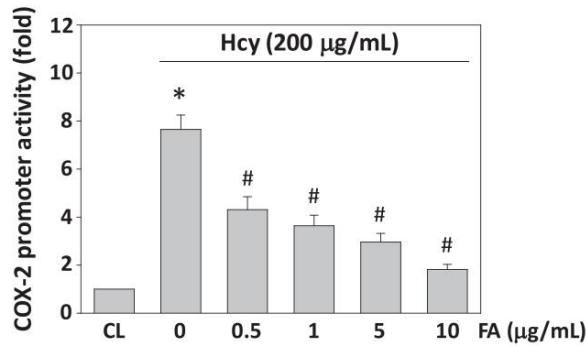
Homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonunun FA aracılı inhibisyonu, MAPK'ya bağlıdır

Homosistein ile indüklenen COX-2 ekspresyonunun MAPK'ya bağlı yolaklar yoluyla aracılık edip etmediğini belirlemek için, insan birincil monositleri ve U937 hücreleri, ERK için spesifik bir inhibitör (PD98059, PD98059,

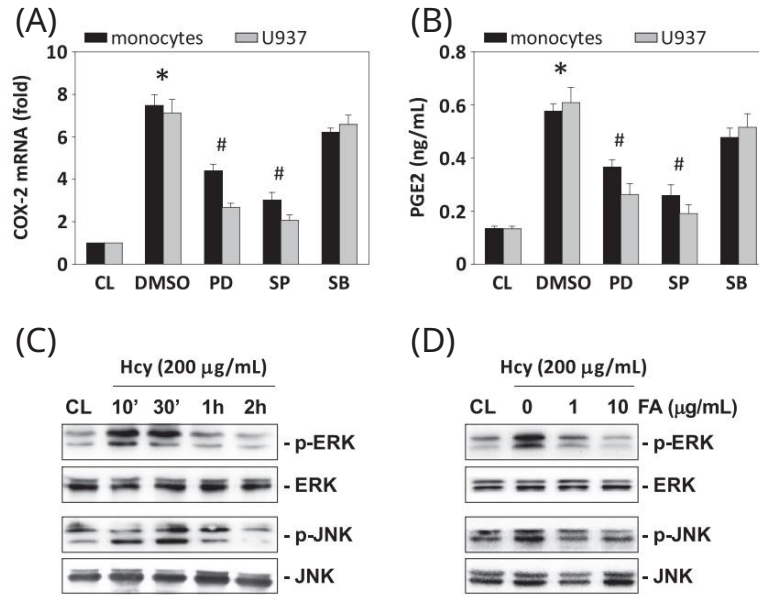
30 mM), JNK (SP600125, 20 mM) veya p38 (SB203580, 10 mM), 200 µM homosistein ile stimülasyondan 1 saat önce ve sırasında. Homosistein kaynaklı COX-2 mRNA ekspresyonu (Şekil 4A) ve PGE2 salgılanması (Şekil 4B), PD98059 ve SP600125 tarafından önemli ölçüde inhibe edildi, ancak SB203580 tarafından inhibe edilmedi. Ayrıca, U937 hücrelerinde ERK ve JNK'nin fosforilasyonu da homosistein stimülasyonundan sonra hızla artarak 10-30 dakikada maksimum seviyelere ulaştı (Şekil 4C). Bu geçici kırışıklardan sonra, fosforilasyon neredeyse bazal seviyelere indi.

Homosistein ilavesinden önce 4 saat boyunca FA (1 ve 10 µg/mL) ile tedavi edilen U937 hücreleri, homosistein kaynaklı ERK ve JNK fosforilasyonunu önemli ölçüde inhibe etti (Şekil 4D). FA'nın kendisinin kontrol hücrelerinde ERK, JNK ve p38 MAPK fosforilasyonunun bazal seviyeleri üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır (veriler gösterilmemiştir). Bu sonuçlar, FA'nın homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonu üzerindeki inhibe edici etkisinin, monositlerde homosistein kaynaklı ERK ve JNK aktivasyonundaki inhibisyonlarına atfedilebileceğini göstermektedir.

Homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonunun FA aracılı inhibisyonu, NF-κB'ye bağlıdır COX-2 geni, promotör bölgesinde NF-κB bağlama elemanları içerir [16]. NF-κB'nin monositlerde homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonunun FA aracılı inhibisyonuna dahil olup olmadığını araştırmak için, NF-κB inhibitörlerinin insan primer monositlerinde ve U937 hücrelerinde homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonu üzerindeki etkilerini inceledik. NF-κB inhibitörleri SN50 ve PDTC. İnsan birincil monositleri ve U937 hücreleri,



**Şekil 3** Homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonunun Fulvik asit (FA) modülasyonu, transkripsiyonel bir olaydır. U937 hücreleri, COX-2 p918-Luc promotör plazmidi ile transfekte edildi. Homosistein ile uyarılmayan p918-Luc ile transfekte edilmiş hücreler kontrol (CL) olarak kullanıldı. COX-2 promotör aktivitesi, en az üç ayrı deneyden p-galaktosidaz aktivitesine normalize edilmiş lusiferaz tahlili kullanılarak kat değişiklikleri olarak ölçüldü. \*P < 0.05, CL monositlerine karşı. FA ön tedavisi olmadan homosisteinle uyarılan hücrelere karşı.



Şekil 4 Fulvik asidin (FA), insan monositindeki MAPK sinyal yollarının homosistein kaynaklı fosforilasyonu üzerindeki etkisi.

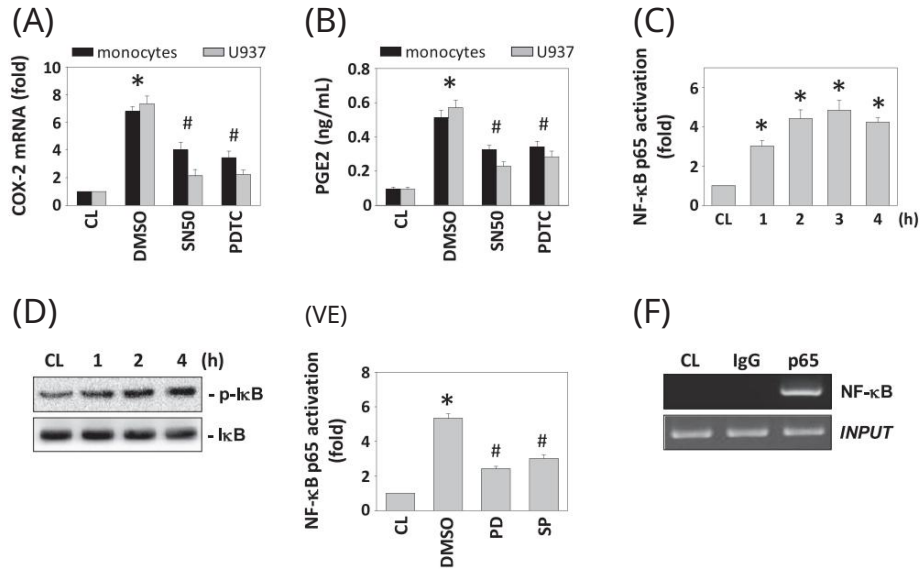
İnsan birincil monositleri ve U937 hücreleri CL olarak tutuldu veya 200 µg/mL homosistein ile 4 saat (A) veya 8 saat (B) uyarıldı. CL olarak tutulmadan veya homosistein ile uyarılmadan önce hücreler, 1 saat boyunca ayrı ayrı PD98059 (PD), SP600125 (SP) veya SB203580 (SB) ile ön işleme tabi tutuldu. (A) Tüm çubuk grafikler, CL monositlerinin kıvrımlarını temsil eder ve 18S rRNA'ya normalize edilir. (B) PGE2 salgılanması, ELISA tahlili ile belirlendi. Sonuçlar, üç ayrı deneyin ortalama ± SEM'si olarak gösterilmiştir. \*P < 0.05, CL'ye karşı. #Homosistein kaynaklı fosforilasyonu veya aktivasyonu (DMSO) karşı. (C) U937 hücreleri, 4 saat süreyle Hcy (200 µg/mL) ile ön işleme tabi tutuldu ve ardından 0,5 saat süreyle homosistein ile uyarıldı. ERK ve JNK'nin fosforilasyonu, Western lekeleme ile belirlendi. Gösterilen sonuçlar, benzer sonuçlara sahip üç bağımsız deneyi temsil etmektedir.

1 saat boyunca spesifik NF-κB inhibitörleri (SN50 ve PDTC, 50 mM) ile inkübe edildi, ardından 4 saat boyunca homosistein ile muamele edildi. Homosistein kaynaklı COX-2 mRNA ifadesi (Şekil 5A) ve PGE2 salgılanması (Şekil 5B), PDTC ve SN50 ile inhibisyon yoluyla önemli ölçüde azaldı, bu da NF-κB'nin COX-2 gen indüksiyonunun düzenlenmesinde yer aldığını gösterir. NF-κB'nin U937 hücrelerinde COX-2 promotör bölgesini bağlayıp bağlamadığını araştırmak için NF-κB aktivasyonunu TF ELISA testi ve IκB fosforilasyon analizi kullanarak belirledik. Bu sonuçlar, U937 hücrelerinin homosistein ile işlenmesinin NF-κB p65 aktivitesinin (Şekil 5C) ve IκB fosforilasyonunun (Şekil 5D) 1 saatte artmasına ve en az 4 saat yüksek kalmasına neden olduğunu gösterdi. Ayrıca, ERK veya JNK'ya özgü inhibitör ile ön işleme tabi tutulan hücreler, homosisteinle artan NF-κB p65 aktivitesini önemli ölçüde zayıflattı (Şekil 5E). Bu sonuçları doğrulamak için ChIP analizi yapıldı. Anti-NF-κB p65 antikoruna ile immün çöktürülmemiş kromozomal DNA, NF-κB bağlanma bölgelerinde barındıran COX-2 promotör bölgesini büyütme için tasarlanmış primerler kullanılarak PCR'ye tabi tutuldu. NF-κB p65 gerçekten de NF-κB sitelerini içeren COX-2 promotör bölgesine bağlıdır (Şekil 5F). FA'nın homosisteine yanıt olarak monositlerin çekirdeğindeki NF-κB p65-DNA bağlama aktivitesine aracılık edip etmeyeceğini belirlemek için TF ELISA deneyleri yaptık. Şekil 6A'da gösterildiği gibi, U937 hücrelerinin FA (1 ve

10 µg/mL) 4 saat boyunca homosistein kaynaklı NF-κB-DNA bağlanma aktivitesini azalttı. FA varlığında homosistein ile uyarılan monositlerde NF-κB'nin COX-2 geninin promotör bölgelerine bağlanmasının in vivo düzenlenmesini daha fazla değerlendirmek için, p65'e karşı bir antikor kullanarak U937 hücrelerinde söylendiği gibi ChIP gerçekleştirdik. Homosistein kaynaklı in vivo NF-κB p65'in COX-2 promotörüne bağlanması, hücrelerin 4 saat FA ile ön işleme tabi tutulmasıyla önemli ölçüde inhibe edildi (Şekil 6B).

#### Tartışma

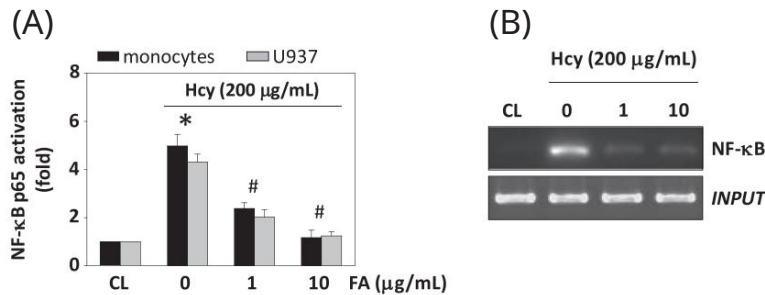
Homosisteinin insanlarda ateroskleroz için bağımsız bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Oksidatif stres ve inflamasyon gibi çok faktörlü mekanizmaların hiperhomosisteinemi kaynaklı aterogenezde rol oynadığı bulunmuştur [18,19]. Ek olarak, önceki çalışma, yüksek homosistein düzeylerinin doğrudan aterogenezde indüklemeyebileceğini, bunun yerine diğer kardiyovasküler risk faktörleriyle kombinasyon halinde aterosklerotik lezyon gelişimini hızlandırabileceğini öne sürdü [20]. Monositlerde COX-2 gibi proinflamatuvar mediyatörlerin üretimi aterogenezde önemli bir rol oynar [21]. Bununla birlikte, homosisteinin monositlerin COX-2 gen ekspresyonunu düzenlediği mekanizma belirsizliğini koruyor. Fulvik asit, en ilginç fitokompleks moleküllerden biridir ve çeşitli nutrasötik özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir.



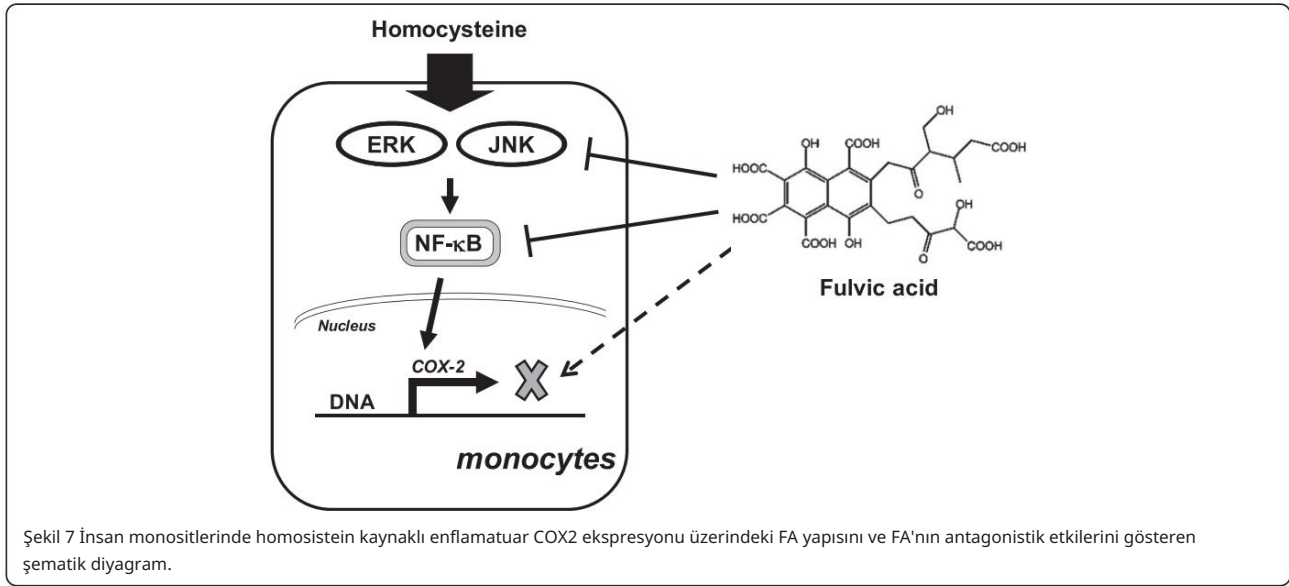
Şekil 5 NF-κB'nin homosistein kaynaklı COX-2 mRNA ekspresyonu ve PGE2 sekresyonundaki rolleri. (A) COX-2 mRNA ve (B) PGE2 ekspresyonu, insan primer monositlerinde ve NF-κB inhibitörleri PDTC ve SN50 ile ön işleme tabi tutulan U937 hücrelerinde belirlendi ve ardından 2 saat boyunca 200 µg/mL homosistein ile uyarıldı. Tüm çubuk grafikler, CL monositlerinin kıvrımlarını temsil eder, üç ayrı deneyin ortalama ± SEM değeri. \*P < 0.05, CL'ye karşı. (C) Homosistein stimülasyonu ile DMSO ile tedavi edilen hücreler. (C) ve (E) NF-κB aktivasyonu, sadece homosistein (C) ve hem homosistein hem de PD98059/SP600125 (E) ile işleme tabi tutulan U937 hücrelerinde TF ELISA deneyleriyle belirlendi. \*P < 0.05, CL'ye karşı. (D) IκB'nin fosforilasyonu Western lekeleme ile belirlendi. (F) p65 antikoru kullanılarak NF-κB için ChIP deneyleri yapıldı. Gösterilen sonuçlar, benzer sonuçlara sahip üç bağımsız deneyi temsil etmektedir.

potansiyel antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteler [22]. Mevcut çalışmamız, ilk kez FA'nın monositlerde homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonu üzerinde inhibe edici etkiler gösterebileceğini ve böylece muhtemelen anti-inflamatuvar ve ateroprotektif fonksiyonlara hizmet ettiğini göstermektedir. FA'nın homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonu üzerindeki bu inhibe edici etkisine, çeşitli kanıtlara dayanan ERK/JNK ve NF-κB sinyal yolları aracılık etti (Şekil 7). İlk olarak, insan birincil monositlerinin ve U937 hücrelerinin FA ile ön tedavisi, homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde inhibe etti. İkincisi, FA, homosistein kaynaklı COX-2 promotör aktivitesini inhibe etti. Bu, FA aracılı

homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonundaki inhibisyon, transkripsiyonel seviyede düzenlenmiştir. Üçüncüsü, hücrelerin homosistein ile tedavi edilmesi, ERK ve JNK fosforilasyonlarında hızlı artışlara neden oldu; ERK ve JNK inhibitörleri, homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonunu zayıflattı. U937 hücrelerinin FA ile ön işleme tabi tutulması, homosistein kaynaklı ERK ve JNK aktivasyonunu inhibe etti; bu, ERK ve JNK yollarının, FA'nın homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonu üzerindeki inhibe edici etkisine dahil olduğunu öne sürdü. Son olarak homosistein, U937 hücrelerinde NF-κB p65-DNA bağlanma aktivitesini ve NF-κB'nin in vivo promotör bağlanmasını tetikledi. NF-κB aktivasyonundaki ve NF-κB-promoterindeki bu artışlar



Şekil 6 U937 monositinde fulvik asidin (FA) homosistein kaynaklı NF-κB aktivasyonu üzerindeki etkisi. U937 hücreleri, CL olarak tutuldu veya 200 µg/mL homosistein ile 4 saat süreyle uyarıldı. CL olarak tutulmadan veya homosistein ile uyarılmadan önce, hücreler 4 saat FA (0-10 µg/mL) ile ön işleme tabi tutuldu. (A) NF-κB aktivasyonu, U937 hücrelerinde TF ELISA deneyleri ile belirlendi. \*P < 0.05, CL'ye karşı. (B) p65 antikoru kullanılarak NF-κB için ChIP deneyleri yapıldı. Gösterilen sonuçlar, benzer sonuçlara sahip üç bağımsız deneyi temsil etmektedir.



bağlanma, insan birincil monositlerinin ve/veya U937 hücrelerinin FA ile ön işleme tabi tutulmasıyla inhibe edilebilir.

Monositler, COX-2'yi eksprese eden ana hücre tiplerinden biridir [23]. Damar duvarına monositlerin transendotelial göçü, aterosklerotik lezyonların oluşumunda ilk adımdır. Önceki çalışma, akut miyokard enfarktüsülü hastalardan alınan periferik kan monositlerinde COX-2 yukarı regülasyonunun gözlemlendiğini göstermiştir, bu da akut miyokard enfarktüsüne akut inflammatuar yanıtın, periferik kan monositlerindeki COX-2 aktivasyonu ile korele olduğunu düşündürmektedir [24]. Ek olarak, COX-2'nin varlığı, vasküler yeniden şekillenmeye ve aterotrombotik sendromlara yol açan, başlıca makrofajlar ve matris metalloproteinazlarla kollokelize olan aterosklerotik plakların omuz bölgesinde de bildirilmiştir [25]. Bu çalışmanın sonuçları, homosisteinin insan monositlerinde hem COX-2 gen ekspresyonunu hem de PGE2 salgılanmasını indüklediğini göstermektedir. Homosisteinin, NMDA reseptör aracılı kalsiyum sinyal yolları yoluyla üretilen ROS tarafından fare makrofajlarında COX-2 ekspresyonunu indüklediği bildirilmiştir [26]. Bu çalışmada, homosisteinin U937 hücrelerinde ERK ve JNK fosforilasyonunda hızlı artışlara neden olduğunu bulduk. Ayrıca, ERK ve JNK için spesifik bir inhibitör, homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonunu inhibe etti. Bu sonuçlar, ERK ve JNK aktivasyonunun, COX-2'nin homosistein indüksiyonu için kritik olduğunu göstermektedir. Mevcut çalışmamız ayrıca FA'nın homosistein kaynaklı ERK ve JNK fosforilasyonu ve COX-2 ekspresyonu üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Transkripsiyon faktörü NF-κB, inflammatuar yanıtlarda indüklenebilir gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. COX-2 geninin promotör bölgelerindeki NF-κB'nin, yanıt verebilirliği için gerekli olduğu gösterilmiştir.

uyarana bu gen [27]. NF-κB dimerleri, IκB proteinleri ile etkileşimleri yoluyla sitozolde aktif olmayan bir biçimde tutulur. Proinflammatuar faktörlerin hücreler üzerindeki etkileşimi, IκB'nin fosforilasyonunu ve degradasyonunu indükler, böylece çekirdeğe yer değiştiren NF-κB dimerlerini serbest bırakır. NF-κB daha sonra, hedef gen ekspresyonunu düzenleyen promotör bölgelerdeki spesifik κB bölgelerinde DNA'ya bağlanır [28]. Hepatik hücrelerde, homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonunun NF-κB aktivasyonu yoluyla aracılık ettiği bildirilmiştir [29]. Bununla birlikte, homosisteine yanıt olarak insan monositlerinde COX-2 ekspresyonunun düzenlenmesinde NF-κB'nin yer alıp almadığının açıklığa kavuşturulması gerekmektedir. Mevcut çalışmamızın TF ELISA ve ChIP tahlillerinden elde edilen sonuçlar, homosistein stimülasyonunun in vitro DNA bağlanma aktivitesini ve monositlerde NF-κB'nin in vivo COX-2-promoter bağlanmasını arttırdığını gösterdi. Homosistein tarafından indüklenen NF-κB DNA bağlanma aktivitesinin bu aktivasyonu, monositlerde homosistein kaynaklı COX-2 ekspresyonunu da inhibe edebilen NF-κB inhibitörleri PDTC veya SN50 ile monositlerin ön işleme tabi tutulmasıyla önemli ölçüde inhibe edilebilir. Homosistein ile stimülasyondan önce, FA ile ön işleme tabi tutulan hücreler, monositlerde homosistein kaynaklı NF-κB-DNA bağlanma aktivitesinin yanı sıra in vivo NF-κB-promoter bağlanmasını önemli ölçüde inhibe etti. Bu sonuçlar homosistein ve FA'nın monositlerde COX-2 ekspresyonuna aracılık etmede ortak bir yolu, yani NF-κB'yi paylaşabileceğini düşündürür. Sonuçlarımız, FA'nın homosistein ile uyarılan monositler üzerinde bir anti-inflamatuar fonksiyon uyguladığını göstermektedir. Ek olarak bu sonuçlar, homosistein ile uyarılan COX-2 ekspresyonunun bu FA inhibisyonunun, monositlerdeki gen ekspresyonlarında FA'nın düzenleyici rollerini yansıtabileceğini düşündürmektedir. Mevcut veriler, FA'nın anti-enflamatuar ve ateroprotektif hizmet edebileceğini göstermektedir.

homosistein uyarılarına yanıt olarak monositlerde proinflatuar gen ekspresyonunu inhibe ederek işlev görür.

## Sonuç Sonuç

olarak FA , homosistein kaynaklı monositlerden COX-2 ekspresyonunu ve PGE2 üretimini inhibe etti . Monositlerde homosisteinin uyarılması, ERK ve JNK fosforilasyonunun artmasına ve NF-κB'nin aktivasyonuna neden oldu. FA, bu yolların aktivasyonunu düzenleyerek homosistein kaynaklı enflamatuar mediatör ekspresyonunu inhibe etti.

Çatışan çıkarlar Yazarlar,  
çatışan çıkarları olmadığını beyan ederler.

Yazarların katkıları SJC, CNC

ve SFC, çalışmanın tasarımında ve tasarımında yer aldı. Verilerin toplanmasında SJC, TCC ve HCK yer almıştır. YPS, tüm yazarlar verilerin istatistiksel analizi ve yorumlanmasında yer aldı. El yazmasını HCK, CNC ve SFC yazdı. Tüm yazarlar son sürümü yorumladı ve onayladı. Tüm yazarların tüm verilerle tam erişimi vardı.

Teşekkür Bu çalışma,

Chang Gung Memorial Hastanesi-Kaohsiung Tıp Merkezi, Chang Gung Memorial Hastanesi ve Chang Gung Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Chia-Yi Kampüsü, Tayvan ve Ulusal Bilim Konseyi, Tayvan (NSC101-2320-B-415-003-MY3, NSC102-2314-B-750-001, NSC101-2622-B-255-001-CC3, NSC102-2313-B-255-002) tarafından ve NSC102-2320-B-010-028).

Yazar ayrıntıları

<sup>1</sup> Pediatrik Kardiyoloji Bölümü, Pediatri Bölümü, Kaohsiung Chang Gung Memorial Hastanesi, Chang Gung Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kaohsiung, Tayvan.

<sup>2</sup> Nefroloji Bölümü, Kaohsiung Chang Gung Memorial Hastanesi ve <sup>3</sup> Chang Gung Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kaohsiung, Tayvan. <sup>4</sup> Hemşirelik Enstitüsü ve Hemşirelik Bölümü, Chang Gung Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Taoyuan, Tayvan.

<sup>5</sup> Hastalıklar ve Sağlık Geliştirme Araştırma Merkezi, Chang Gung Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Taoyuan, Tayvan. <sup>6</sup> İnsan Ekolojisi Endüstrisi Araştırma Merkezi, Chang Gung Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Taoyuan, Tayvan.

<sup>7</sup> Biyokimyasal Bilim ve Teknoloji Bölümü, Ulusal Chiayi Üniversitesi, Chiayi 600, Tayvan. <sup>8</sup> Biyofotonik ve Moleküler Görüntüleme Araştırma Merkezi, Ulusal Yang Ming Üniversitesi, No. 155, Sec. 2, Linong St. Beitou Bölgesi, Taipei, Tayvan.

Geliş Tarihi: 19 Ağustos 2014 Kabul Tarihi: 21 Şubat 2015

Published online: 13 March 2015

Referanslar

- Motojima H, O Villareal M, Han J, Isoda H. Fulvik aside yanıt olarak KU812 hücrelerinde ani tip alerjinin mikroarray analizi. *Sitoteknoloji*. 2011;63:181-90.
- Cornejo A, Jiménez JM, Caballero L, Melo F, Maccioni RB. Fulvik asit, agregasyonu inhibe eder ve Alzheimer hastalığı ile ilişkili tabu fibrillerinin parçalanmasını destekler. *J Alzheimer Dis*. 2011;27:143-53.
- Guzmán-Martínez L, Fariás GA, Maccioni RB. Potansiyel olarak Tau oligomerleri Alzheimer teşhisi ve yeni ilaçlar için hedefler. *Ön Nörol*. 2013;4:167.
- Van Rensburg CEJ, Malfeld SCK, Dekker J. Topikal oksifulvik asit uygulaması, farelerde kutanöz immün yanıtı baskılar. *İlaç Devri Arş*. 2001;53:29-32.
- Sherry L, Millhouse E, Lappin DF, Murray C, Culshaw S, Nile CJ, et al. Oral biyofilm enfeksiyonlarının yönetimi için potansiyel yeni bir tedavi olarak karbonhidrat türevi fulvik asidin (CHD-FA) biyolojik özelliklerinin araştırılması. *BMC Ağız Sağlığı*. 2013;13:47.
- Yamada P, Isoda H, Han JK, Talorete TP, Abe Y. Kanada sphagnum turbasından ekstrakte edilen fulvik asidin, RBL-2H3 ve KU812 hücrelerinin kimyasal aracı salımı üzerindeki inhibitör etkisi. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007;71:1294-305.

- Hansson GK, Hermansson A. Aterosklerozda bağışıklık sistemi. *Nat İmmünol*. 2011;12:204-12.
- Ghassibe-Sabbagh M, Platt DE, Youhanna S, Abchee AB, Stewart K, Badro DA, et al. Total plazma homosistein üzerindeki genetik ve çevresel etkiler ve bunun koroner arter hastalığı riskindeki rolü. *ateroskleroz*. 2012;222:180-6.
- Lentz SR. Homosistein kaynaklı ateroskleroz mekanizmaları. *J Tromb Haemost*. 2005;3:1646-54.
- [ PubMed ] 10. Kim CS, Kim YR, Naqvi A, Kumar S, Hoffman TA, Jung SB, et al. Homosistein, p66shc'nin bölgeye özgü epigenetik düzenlemesi yoluyla insan endotel hücre işlev bozukluğunu teşvik eder. *Kardiyovasküler Res*. 2011;92:466-75.
- Seneviratne AN, Sivagurunathan B, Monaco C. Toll benzeri reseptörler ve aterosklerozda makrofaj aktivasyonu. *Clin Chim Acta*. 2012;413:3-14.
- Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandinler ve iltihaplanma. *arteriyoskler Tromb Vasc Biol*. 2011;31:986-1000.
- Beloqui O, Páramo JA, Orbe J, Benito A, Colina I, Monasterio A, et al. Monosit siklooksijenaz-2 aşırı aktivitesi: Kardiyovasküler risk faktörleri olan asemptomatik deneklerde subklinik aterosklerozun yeni bir belirtici? *Eur Heart J*. 2005;26:153-8.
- Yeh CC, Chang SF, Huang TY, Chang HI, Kuo HC, Wu YC, et al. Kayma stresi, insan kondrositlerinde makrofaj kaynaklı ürokinaz plazminojen aktivatör ekspresyonunu modüle eder. *Artritis Res*. 2013;15:R53.
- Chang LC, Kuo HC, Chang SF, Chen HJ, Lee KF, Lin TH, et al. Yüksek glukozla işlenmiş P. gingivalis ile enfekte olmuş dişeti fibroblastlarında ICAM-1 ekspresyonunun düzenlenmesi. *Hücre Mikrobiyolü*. 2013;15:1722-34.
- Chen TC, Tsai JP, Huang HJ, Teng CC, Chien SJ, Kuo HC ve diğerleri. Tip I saçaklı üropatojenik E. coli ile enfekte olmuş insan mesane epitel hücrelerinde siklooksijenaz-2 ekspresyonunun düzenlenmesi. *Hücre Mikrobiyolü*. 2011;13:1703-13.
- Chen TC, Chien SJ, Kuo HC, Huang WS, Sheen JM, Lin TH, et al. Yüksek glukoz ile muamele edilmiş makrofajlar, endotel hücrelerinde E-selektin ekspresyonunu artırır. *J Biol Chem*. 2011;286:25564-73.
- Suematsu N, Ojaimi C, Kinugawa S, Wang Z, Xu X, Koller A ve diğerleri. Hiperhomosisteinemi, oksidatif stres yoluyla nitrik oksit biyoyararlanımını bozarak kardiyak substrat metabolizmasını değiştirir. *dolaşım*. 2007;115:255-62.
- Zhang D, Fang P, Jiang X, Nelson J, Moore JK, Kruger WD, et al. Şiddetli hiperhomosisteinemi, LDLr / CBS eksikliği olan farelerde kemik iliği kaynaklı ve yerleşik enflamatuar monosit farklılaşmasını ve aterosklerozu teşvik eder. *Sirk Res*. 2012;111:37-49.
- Zhou J, Werstuck GH, Lhoták S, Shi YY, Tedesco V, Trigatti B, et al. Metiyonin takviyesi ile indüklenen hiperhomosisteinemi, C57BL/6 J farelerinde bağımsız olarak aterosklerozu neden olmaz. *FASEB J*. 2008;22:2569-78.
- Giannarelli C, Zafar MU, Badimon JJ. Prostanoid ve TP reseptörleri ateroskleroz: düşmanlıklarının bir rolü var mı? *Tromb Haemost*. 2010;104:949-54.
- Motojima H, Yamada P, Han J, Ozaki M, Shigemori H, Isoda H. Aşırı çamurdan ekstrakte edilen fulvik asidin özellikleri ve bunun β-heksosaminidaz salınımı üzerindeki inhibe edici etkisi. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009;73:2210-6.
- Iezzi A, Ferri C, Mezzetti A, Cipollone F. COX-2: dost mu düşman mı? *Curr Eczanesi arasında*. 2007;13:1715-21.
- Zhao SP, Deng P, Huang HG, Xu ZM, Dai HY, Hong SC ve diğerleri. İfade Akut miyokard enfarktüsü hastalardan alınan periferik kan monositlerinde COX-2 mRNA'nın değerlendirilmesi ve önemi. *Klinik Kimya* 2005;51:2170-3.
- Cipollone F, Fazio M, Mezzetti A. Plak kararsızlığının yeni belirleyicileri. *J Tromb Haemost*. 2005;3:1962-75.
- Lee YS, Lee SJ, Seo KW, Bae JU, Park SY, Kim CD. Homosistein, NMDA reseptörü-kalsiyum sinyal yolları tarafından üretilen ROS yoluyla makrofajlarda COX-2 ekspresyonunu indükler. *Serbest Radik Çöz*. 2013;47:422-31.
- Vila-del Sol V, Fresno M. Makrofajlarda IFN-γ tarafından siklooksijenaz-2 ekspresyonunun transkripsiyonel kontrolünde TNF ve NF-κB'nin katılımı. *J İmmünol*. 2005;174:2825-33.
- Ben-Neriah Y, Karin M. Enflamasyon, çöpçatan olarak NF-κB ile kanserle buluşuyor. *Nat İmmünol*. 2011;12:715-23.
- Wu N, Siow LY, O K. Heparik siklooksijenaz-2'nin indüksiyonu nükleer faktör-κB aktivasyonu yoluyla hiperhomosisteinemi. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297:R1086-94.