

Bazı ilaçların koyun Paraoksonaz-1 üzerindeki etkilerinin araştırılması

Hatice YÜKSEL¹, Adem ERGÜN^{2*}, Mikail ARSLAN³, Oktay ARSLAN¹

¹Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Kimya Böl., Çağış kampüsü, Balıkesir.

²Balıkesir Üniversitesi Bilim ve Tek. Uyg. ve Araş. Mer., Çağış kampüsü, Balıkesir.

³Bandırma Onyedi Eylül Üniversitesi Susurluk MYO Vet. Böl., Susurluk, Balıkesir.

Geliş Tarihi (Received Date): 22.11.2022

Kabul Tarihi (Accepted Date): 05.04.2023

Öz

Paraoksonaz-1 (PONI, EC 3.1.8.1) birçok metabolik süreçlerde önemli rollere sahip bir metaloenzimdir. Bu çalışmada Karacabey Merinos koyunundan hidrofobik etkileşim tekniği ile PONI (mPONI) saflaştırılmıştır. Saf enzim üzerinde enrofloksasin ve furosemid ilaçlarının etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan ilaçların, mPONI enzimini farklı düzeylerde inhibe ettiği bulunmuştur. İlaçların IC₅₀ değerleri ilgili grafiklerden hesaplanarak inhibisyon güçleri saptanmıştır. Bu değerlere göre furosemid (IC₅₀ = 9,87 mM) 'in enrofloksasin (IC₅₀ = 42,21 mM) 'den daha güçlü inhibitör olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Paraoksonaz, inhibisyon, saflaştırma, enrofloksasin, furosemid.

Investigation of the effects of some drugs on sheep Paraoxonase-1

Abstract

Paraoxonase-1 (PONI, EC 3.1.8.1) is a metalloenzyme that has important roles in many metabolic processes. PONI (mPONI) was isolated from Karacabey Merino sheep in this study using the hydrophobic interaction method. The effects of enrofloxacin and furosemide on the pure enzyme were investigated. The drugs used in the study were found to inhibit the mPONI enzyme at various levels. The IC₅₀ values of the drugs were calculated from the related graphics, and their inhibition power was determined. According to these values, furosemide (IC₅₀ = 9.87 mM) was found to be a stronger inhibitor than enrofloxacin (IC₅₀ = 42.21 mM).

Keywords: Paraoxonase, inhibition, purification, enrofloxacin, furosemide.

Hatice YÜKSEL, 87zafer87@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-6436-9120>

*Adem ERGÜN, ademergun@balikesir.edu.tr, <http://orcid.org/0000-0003-4647-6058>

Mikail ARSLAN, mikailarslan@bandirma.edu.tr, <http://orcid.org/0000-0002-7882-9586>

Oktay ARSLAN, oktay@balikesir.edu.tr, <http://orcid.org/0000-0002-2549-4997>

1. Giriş

Paraoksonaz (PON), PON1, PON2 ve PON3 şeklinde tanımlanan üç farklı enzimden oluşan bir protein ailesidir [1]. Bu enzimler arasında PON1 üzerinde oldukça fazla çalışma bulunmaktadır [2-5]. PON1, karaciğerde sentezlenir ve yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) ile spesifik etkileştikten sonra kan dolaşımına salınır [2]. PON1, oksidatif hasar ve lipit peroksidasyonuna karşı koruma, doğal bağışıklığa katkı ve reaktif moleküllerin detoksifikasyonu gibi çeşitli biyokimyasal yollarda çok işlevli rollere sahiptir. PON1 eksikliği olan hayvanların birçok hastalığa karşı daha hassas olduğu saptanmıştır. Bu hayvanlarda PON1'in aşırı ekspresyonuyla veya saflaştırılmış PON1'in verilmesiyle söz konusu hastalıkların gelişimini önlediği ya da geciktirdiği gösterilmiştir [3–12]. Organofosfor (OP) zehirlenmesinde PON1 uygulamasının son derece yararlı olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [2,6,13].

Daha önce yapılan çalışmalarda hidrofobik jeller kullanılarak insan, sığır, balık ve koyun serumlarından PON1 enzimleri yüksek düzeyde saflaştırılmıştır [5,8,14,15]. PON1 enzimlerin birçok kimyasal maddelere karşı afiniteleri araştırılmıştır [4,6,14,16–18]. Koyun PON1 enzimi konusunda literatürde ilk kapsamlı çalışma Erol ve ark. (2013) tarafından yapılmış ve hidrofobik etkileşim tekniği ile Merinos ve Kıvırcık koyunların serumundan PON1 enzimi saflaştırılmıştır. Bu enzimler üzerinde ağır metallerin toksik etkileri saptanmıştır. Çalışmada kullanılan ağır metallerin tamamının Merinos PON1 enzimini mM düzeyinde inhibe ettiği bildirilmiştir [3]. Daha önce yapılan diğer bir çalışmada ise, Karacabey Merinos, Kıvırcık, Tahirova, Akkaraman ve Dağlıç koyun ırklarından serum Paraoksonaz 1 (PON1) aktivitesinin karakterizasyonu yapılmıştır. Beş farklı koyun ırkının Km ve Vmax değerleri Lineweaver-Burk yöntemi ile belirlenmiştir. Farklı türler arasındaki sonuçların karşılaştırılması için temel sağlayabilecek ve ayrıca koyunlar için referans değerleri oluşturmak için güvenilir bir belirteç olarak hizmet edebilecek sonuçlar elde edilmiştir. Çalışma sonucunda katalitik etkinliği en yüksek PON1, Kıvırcık ırkında gözlenmişken, en az katalitik etkinlik Karacabey Merinos ırkında saptanmıştır [15].

Mevcut çalışmada Karacabey Merinos koyun serumundan PON1 enzimi hidrofobik etkileşim tekniği ile saflaştırılarak, saf enzimin bazı ilaçlara karşı afinitesi araştırılmıştır. Söz konusu ilaçların birçok hayvan hastalıklarında sıkça kullanılması çalışmanın önemini artırmaktadır. Bu ilaçların fonksiyonlarını gösterirken PON1 enziminin aktivitesini ne ölçüde değiştirdiği konusu, bu sahada çalışan araştırmacılar için son derece önemli bir husustur.

2. Deneysel çalışmalar

2.1. Kimyasallar

Araştırmada substrat olarak kullanılan paraokson ile protein saflaştırma ve tayini için kullanılan diğer reaktifler Sigma ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

2.2. Kan serumunun ayrılması

Kan örnekleri, Karacabey Merinos koyun ırkından kesim esnasında alınmıştır. Kan örnekleri temiz kuru tüplere alınarak 5000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve kan serumları ayrılarak bekletilmeden araştırmamızda kullanılmıştır [3].

2.3. Paraoksonaz aktivite tayini

Paraoksonaz aktivitesi, substrat olarak paraokson kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu amaçla, enzimin katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan *p*-nitrofenol, 412 nm'de 37°C'de 2 dakika boyunca takip edilmiştir. Enzim aktivitesi sırasında kullanılan substrat konsantrasyonu reaksiyon ortamında yaklaşık 2 mM olacak şekilde düzenlenmiştir [14]. Bir enzim ünitesi, 37°C'de 1 µmol substratın hidrolizini katalize eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır [3].

2.4. Amonyum sülfat çöktürmesi

Daha önce anlatıldığı şekilde hazırlanan serumdan söz konusu enzimin, amonyum sülfat ile çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tuz konsantrasyonları %60-80 doygunluk aralığında kullanılmıştır [14]. Çökelti 15.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır ve 100 mM Na-fosfat tamponu (pH:7,0) içinde yeniden çözülerek ileri saflaştırma basamağında kullanılmıştır.

2.5. Hidrofobik etkileşim tekniği ile enzimin saflaştırılması

Enzimi saflaştırmak için kullanılan Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip hidrofobik jel hazırlanmıştır [14]. Enzim saflaştırmak için söz konusu jel uygun bir şekilde kolona paketlenmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen numuneler, 100 mM Na-fosfat tamponu (pH 8,0) ile dengelenmiş olan kolona yüklenmiştir. Elüsyon işlemi, NaCl gradyanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen her bir fraksiyon için protein miktarı 280 nm'de spektrofotometrik olarak saptanmıştır. Daha sonra protein içeren elüatlar, PON1 aktivitesi için analiz edilmiştir. Diğer kinetik çalışmalar için enzim aktivitesi içeren tüpler birleştirilmiştir.

2.6. In vitro inhibisyon çalışmaları

mPON1 enziminin, enrofloksasin ve furosemid bileşiklerine karşı afinitesini saptamak amacı ile farklı konstrasyonlarda her bir ilaç, reaksiyon ortamına alınarak enzim aktiviteleri saptanmıştır. Kontrol için inhibitör yokluğunda enzim aktivitesi ölçülerek bu değer %100 olduğu varsayılmıştır. Her bir ilaç için, konsantrasyona karşı, yüzde aktivite grafiği elde edilmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀ değerleri) grafiklerden saptanmıştır.

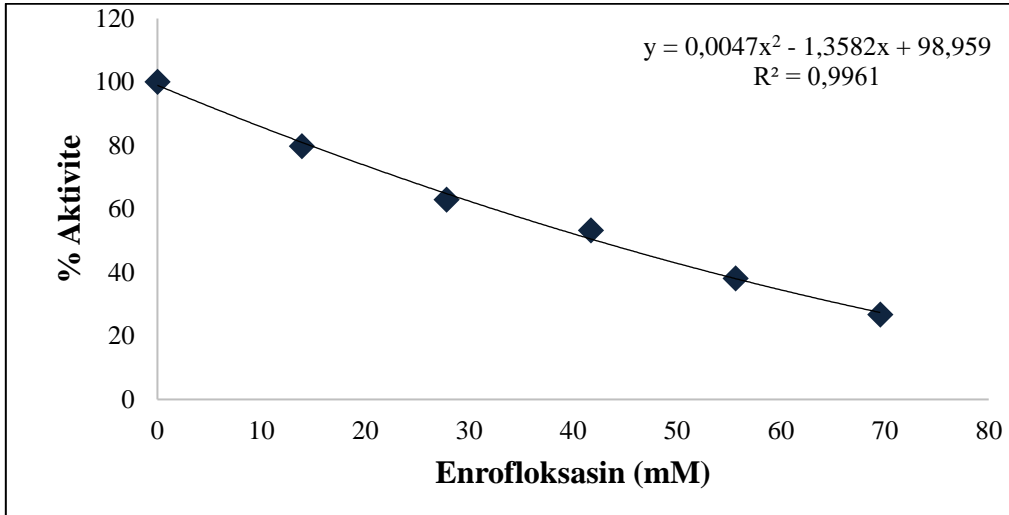
3. Sonuç ve tartışma

İlaçlar, çeşitli hastalıkların kontrolü, önlenmesi ve iyileştirmesi hatta teşhisi için sentezlenmiş moleküllerdir [19]. Bu moleküller, canlı organizmadaki çeşitli bileşiklerle etkileşerek fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Bu bileşiklerin; proteinler, nükleik asitler, reseptörler, enzimler, hormonlar, iyon kanalları şeklinde olabileceği bilinmektedir. İlaçlar, canlı organizmalardaki ilgili makromolekülle spesifik olarak etkileşmesi amacı ile tasarlanmıştır. Ancak canlı organizmanın toplam biyomolekül matrisinin, bilinenden çok daha karmaşık ve incelikli olarak tasarlandığı kabul edilmektedir [20,21]. Bu nedenle kullanılan ilaçların hedef biyomolekül dışında diğer enzim ve biyomoleküller üzerindeki etkilerinin saptanması güvenli dozda ilaç kullanımı açısından oldukça önemli bir husustur.

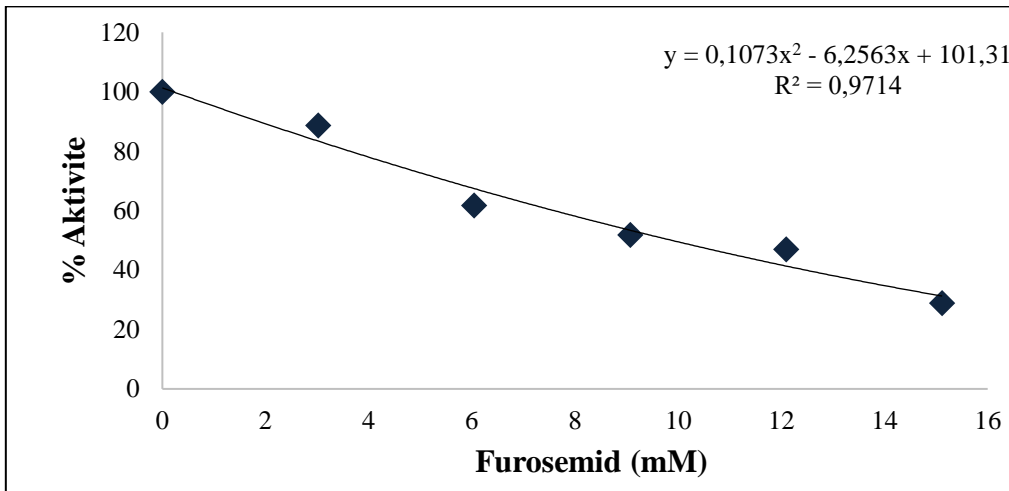
Bu amaçla bu çalışmada, Karacabey Merinos koyun serumundan PON1 enzimi, hazırlanan hidrofobik kolon kullanılarak saflaştırılmıştır. Saf mPON1'in çeşitli hayvan hastalıkları tedavisinde kullanılan enrofloksasin ve furosemid ilaçlarına karşı afinitesi

araştırılmış ve bu çalışma ilk defa gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yüzde aktivite grafikleri Şekil 1 ve Şekil 2’de verilmiştir. IC₅₀ değerleri bu grafikler kullanılarak hesaplanmıştır. Çalışmamız sonucunda söz konusu ilaçların mPON1’i hangi dozda ne ölçüde etkilediği ortaya çıkarılmıştır.

PON1 enzim kaynağı olarak Karacabey Merinos koyunu seçilmiştir. Merinos koyun ırkı, et ve yapağı veriminin arzu edilir düzeyde olması nedeni ile dünyanın çeşitli bölgelerinde yetiştirilmektedir. Annelik içgüdüğü, hemen hemen yılın her mevsiminde kızgınlık gösterme yetenekleri bu koyun ırkının popüler olmasının diğer nedenleri arasında sayılabilir [3]. Daha önce yapılan bir çalışmada, Karacabey Merinos, Kıvırcık, Tahirova, Akkaraman ve Dağlıç koyun ırklarından serum PON aktiviteyi araştırılmıştır. Bu amaçla PON1 enzimlerinin Km ve Vmax değerleri Lineweaver-Burk yöntemi ile belirlenmiştir. Katalitik etkinliği en yüksek PON1, Kıvırcık ırkından gözlenmişken, en az katalitik etkinlik Karacabey Merinos ırkında saptanmıştır [15]. Bu durum Karacabey Merinos PON1 enziminin aktivitesinin önemini daha da artırmaktadır. Bu nedenle tedavide kullanılan ilaçların Karacabey Merinos PON1 aktivitesini ne ölçüde etkilediği diğer ırklara göre çok daha önemli olduğu kanısındayız.



Şekil 1. Enrofloksasin için inhibisyon grafiği



Şekil 2. Furosemid için inhibisyon grafiği

Söz konusu araştırmada kullanılan ilaçların ikisinin de mPON1 enzimini farklı düzeylerde inhibe ettiği saptanmıştır. Şekil 1 ve Şekil 2’de sunulan grafiklerden her bir ilacın IC₅₀ değerleri saptanmıştır. Bu değerlere göre, IC₅₀ değeri 9,87 mM olan furosemidin, IC₅₀ değeri 42,21 mM olan enrofloksasinden daha güçlü bir inhibitör olduğu söylenebilir. Daha önce yapılan başka bir çalışmada Merinos ve Kıvırcık koyunlarından saflaştırılan PON1 enzimleri üzerinde ağır metallerin toksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan ağır metal iyonlarının tamamının Merinos PON1 ve Kıvırcık PON1 üzerinde inhibitör etkisi gösterdiği bildirilmiştir. Merinos PON1 ve Kıvırcık PON1 için IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,747 ile 5,140 mM ve 0,530 ile 4,220 mM arasında değişen düşük konsantrasyonlarda olduğu bulunmuştur [3]. IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında, bu çalışmada kullanılan ilaçların mPON1 enzimi üzerinde ağır metal iyonlarından daha az toksik etkiye sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca Nadaroğlu ve ark. (2013) tarafından geniş spektrumlu florofornisol antibiyotisinin Kıvırcık koyunundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerindeki etkileri araştırılmış ve ilginç bir şekilde PON1 enziminin aktivitesini artırdığı saptanmıştır [13].

Ayrıca başka bir çalışmada bazı pestisitlerin koyun karaciğerinden saflaştırılan PON1 enzimi üzerine etkisi araştırılmış ve IC₅₀ değerlerinin 0,0103 ile 0,2 µM aralığında olduğu tespit edilmiştir [4]. Bu değerlere bakıldığında, söz konusu pestisitlerin bu çalışmada kullanılan ilaçlardan çok daha fazla toksik etki gösterdiği anlaşılmaktadır.

Kaynaklar

- [1] Taler-Verčič, A., Goličnik, M., Bavec A., The Structure and Function of Paraoxonase-1 and Its Comparison to Paraoxonase-2 and-3, **Molecules**, 25, 1-20, (2020).
- [2] Kulka M., A review of paraoxonase 1 properties and diagnostic applications, **Polish Journal of Veterinary Sciences**,19, 225–232, (2016).
- [3] Erol, K., Gençer, N., Arslan, M. Arslan, O., Purification, characterization, and investigation of in vitro inhibition by metals of paraoxonase from different sheep breeds, **Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology**, 41, 125-130, (2013).
- [4] Koncuk Cebeci, B., Alim, Z., Beydemir, Ş., In vitro effects of pesticide exposure on the activity of the paraoxonase-1 enzyme from sheep liver microsomes, **Turkish Journal of Chemistry**, 38 ,512-20, (2014).
- [5] Sayin, D., Çakir, D.T., Gençer, N., Arslan, O., Effects of some metals on paraoxonase activity from shark *Scyliorhinus canicula*, **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**., 27, 595-598, (2012).
- [6] Ergün, A., Effects of Some Pesticides on Purified Human Paraoxonase 1 Activity, In Vitro, **Fresenius Environmental Bulletin**, 31, 9627-9633, (2022).
- [7] Cao, Y., Zhang, J., Yang, W., Xia, C., Zhang, H. Y., Wang, Y. H., C. Xu, Serum paraoxonase as an indicator for fatty liver in sheep, **Journal of Veterinary Research**, 61, 97-102, (2017).
- [8] Tas, E. C., Filipuci, I., Cakir, D. T., Beyaztas, S., Sunlu, U., Togulga, M., Ozaydin, O., Arslan, O. Heavy metal concentrations in tissues of edible fish (*Mullus barbatus* L., 1758) from Candarli Bay (Turkey), **Fresenius Environmental Bulletin**, 20, 2834-2839, (2011).
- [9] Ceron, J.J., Tecles, F., Tvarijonaviciute, A., Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: An update, **BMC Veterinary Research**, 10, (2014).
- [10] Rincón, J. Madeira, E.M., Campos, F.T., Mion, B., Silva, J.F. V.A., Absalón-

- Medina, W.R. Butler, M.N. Corrêa, L. Pegoraro, A. Schneider, Exogenous paraoxonase-1 during oocyte maturation improves bovine embryo development in vitro, **Reproduction in Domestic Animals**, 51, 827-830, (2016).
- [11] Pradiéé, J., de Campos, F.T., Rincon, J.A.A., Collares, L., Goularte, K., Silveira, P.A.S., Pegoraro, L.M.C., A. Schneider, Paraoxonase 1 (PON1) activity in serum, follicular fluid and seminal plasma of sheep, **Reproduction in Domestic Animals**, 52, 1142-1144, (2017).
- [12] Arab, Z.N., Khayatan, D., Razavi, S.M., Zare, K., Kheradkhah, E., Momtaz, S., Ferretti, G., Bacchetti, T., Sathyapalan, T., Emami, S.A., Abdolghaffari, A.H., Sahebkar, A., Phytochemicals as Modulators of Paraoxonase-1 in Health and Diseases, **Antioxidants**, 11, 1-25, (2022).
- [13] Nadaroglu, H., Kucukoglu, K., Koc, F., Investigation of in vivo effect of florfenicol on metabolic-antioxidant enzymes' activities on Morkaraman normal and lactating sheep, **Journal of Taibah University for Science**, 7, 189-194, (2013).
- [14] Sinan, S., Kockar, F., Arslan, O., Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics, **Biochimie**, 88, 565-574, (2006).
- [15] Arslan, M., Erzenin, M., Demir, D., Comparison of serum paraoxonase 1 (PON1) activities among different sheep breeds in Turkey, **Journal of Animal and Veterinary Advances**, 10, 489-494, (2011).
- [16] Türkeş, C., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ., In Vitro and In Silico Studies on the Toxic Effects of Antibacterial Drugs as Human Serum Paraoxonase 1 Inhibitor, **ChemistrySelect**, 4, 9731-9736, (2019).
- [17] Türkeş, C., Beydemir, Ş., Inhibition of Human Serum Paraoxonase-I with Antimycotic Drugs: In Vitro and In Silico Studies, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 190, 252-269, (2020).
- [18] Karataş, M.O., Çalgın, G., Alici, B., Gökçe, B., Gençer, N., Taşkın Tok T., Arslan, O., Kılıç-Cıkla, I., Özdemir, N., Inhibition of paraoxonase 1 by coumarin-substituted N-heterocyclic carbene silver(I), ruthenium(II) and palladium(II) complexes, **Applied Organometallic Chemistry**, 33 (2019).
- [19] Manna, S., Sharma, A., Satpati, A.K., Electrochemical methods in understanding the redox processes of drugs and biomolecules and their sensing, **Current Opinion in Electrochemistry**, 32, 100886, (2022).
- [20] Yamasaki, K., Chuang, V.T.G., Maruyama, T., Otagiri, M., Albumin-drug interaction and its clinical implication, **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 1830, 5435–5443, (2013).
- [21] Paul, B.K., Ghosh, N., Mukherjee, S., Binding interaction of a prospective chemotherapeutic antibacterial drug with β -lactoglobulin: Results and challenges, **Langmuir**, 30, 5921-5929, (2014).