

İnsan Serum Paraoksonaz-1 (hPON1) Üzerine Bendamustin İnhibisyon Etkisi

Hakan SÖYÜT^{1*}, Yakup ULUTAŞ², Ekrem KÖKSAL²

ÖZET: hPON1, HDL ile ilişkili ve 43-45 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahip olan bir ester hidrolazdır. Karaciğerde sentezlenir. Organofosfat ajanlarını ve sinir gazlarını hidrolize eder. LDL'nin oksidasyonuna ve lipit peroksitlerin ve bakteriyel endotoksinlerin oluşumuna karşı koruyucu bir rol oynar. LDL'nin oksidasyonunun ateroskleroz sürecinin başlangıç aşamasını oluşturması, hPON1 antioksidan özelliklerinin önemini göstermektedir. Birçok epidemiyolojik çalışma HDL kolesterol düzeyleri ile kardiyovasküler olaylar arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir. Yüksek serum HDL-kolesterol ve düşük LDL-kolesterol seviyelerinin koroner kalp hastalığı ve ateroskleroz gelişimine karşı koruyucu olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, hPON1 bir HDL bileşenidir, bu nedenle koroner arter hastalığında HDL'nin koruyucu rolüne katkıda bulunur. Bu çalışmada, *in vitro* koşullarda insan serumunda hPON1 enzim aktivitesi üzerine bendamustin kemoterapik ilacının inhibisyon etkisini araştırdık.

Anahtar Kelimeler: Paraoksonaz, inhibisyon, bendamustin.

Inhibitory Effects of Bendamustine on Human Serum Paraoxonase-1 (hPON1)

ABSTRACT: hPON1 is an ester hydrolase associated with HDL and having a molecular mass of 43-45 kDa. It is synthesized in the liver. It hydrolyzes organophosphate agents and nerve gases. It plays a protective role against oxidation of LDL and formation of lipid peroxides and bacterial endotoxins. The fact that oxidation of LDL constitutes the initial stage of the atherosclerosis process demonstrates the importance of hPON1 antioxidant properties. Many epidemiological studies have shown an inverse relationship between HDL cholesterol levels and cardiovascular events. It is known that high serum HDL-cholesterol and low LDL-cholesterol levels are protective against the development of coronary heart disease and atherosclerosis. Therefore, hPON1 is a component of HDL, thus contributing to the protective role of HDL in coronary artery disease. In this research, we investigated the inhibition effects of bendamustine on hPON1 enzyme activity in the human serum *in vitro* conditions.

Keywords: Paraoxonase, inhibition, bendamustine.

¹Hakan SÖYÜT, (Orcid ID: 0000-0002-0361-7458), Uludağ Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Temel Eğitim Bölümü, Bursa, Türkiye

²Yakup Ulutaş, (Orcid ID: 0000-0002-9839-9536), Ekrem KÖKSAL, (Orcid ID: 0000-0002-1026-972X), Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Erzincan, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Hakan SÖYÜT, e-mail: hakansoyut@uludag.edu.tr

GİRİŞ

1960'larda sentezlenen hem alkilleme hem de antimetabolit özelliklerine sahip FDA onaylı bir anti-kanser ilacıdır. Bendamustin (4 {-5 [-Bis (2-kloroetil) amino] -1-metil-1-benzoimidazol-2-il} butanoik asit monohidroklörür), yapısal olarak, üç fonksiyonel gruptan oluşur: 2-kloroetilamin alkilleme grubu, benzimidazol halkası ve bütirik asit yan zinciridir. O, benzimidazol gibi bir pürini ve iki fonksiyonlu alkile edici bir azot grubunu birleştiren sitotoksik bir ajandır. 2-kloroetilamin alkilleme grubu, alkilerin azot ailesi arasında yaygın bir yapı iken, benzimidazol halkası bendamustin'e özgüdür. İlaç, lenfoma, miyelom ve meme kanseri ve germ hücre kanseri dahil olmak üzere çeşitli katı tümörlerde antitümör aktivitesine sahiptir. Bendamustin'in anti-kanser etkisini, alkilasyon yoluyla tek ve çift DNA ipliklerinin çapraz bağlanmasıyla gösterir. İntravenöz uygulamadan sonra bendamustinhidroklörür proteinlere bağlanarak karaciğer ve böbrek tarafından seçici olarak alınır. Bendamustin vücutta hidroliz ile metabolize olur ve suda oldukça kararsızdır. Yaklaşık 10 dakikalık bir yarılanma ömrüne sahip mono- ve dihidroksi türevlerine hidrolize olur. Esas olarak böbreklerden atılır, karaciğerde metabolize edilir ve safra yoluyla az miktarda atılır. Bendamustin'in neden olduğu DNA hasarının diğer alkilerin neden olduğu hasardan daha geniş ve uzun ömürlü olduğu gösterilmiştir (Khan ve ark., 2016).

Paraoksonaz (hPON) ailesi üç genden oluşur: PON1, PON2 ve PON3. İnsan PON kromozom 7 üç farklı gen tarafından kodlanır. Memeli türlerinde, hPON genleri, dizilerinin % 79-95'i amino asit düzeyinde ve % 81-95'i nükleotid düzeyinde benzerdir. PON2, ailenin en yaşlı üyesi olarak tanımlanmaktadır. hPON3 ve hPON1 büyük olasılıkla gen replikasyonunun sonucudur. hPON1 ve hPON3'ün her ikisi de yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) partikülleri ile ilişkilidir ve antioksidan ve antiinflamatuvar özellikler gösterir. hPON2 ve hPON3, mitokondriyal süperoksit anyon üretimini ve endoplazmik retikulum (ER) strese bağlı apoptozu modüle eden hücre içi enzimlerdir. (Furlong ve ark., 2016).

hPON1 öncelikle karaciğerde eksprese edilir ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) içinde birleştirilir. İnsan hPON2'si kalp, karaciğer, akciğer, testis, akciğer, plasenta, mide, ince bağırsak, dalak, böbrek, vasküler endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri ve makrofajlar gibi farklı dokularda eksprese edilir. hPON2, plazma zarında, endoplazmik retikulumda ve elektron taşıma zincirinin doğru çalışması için gerekli olan iç mitokondriyal zarında lokalizedir. Karaciğere ek olarak, böbrekte hPON3 ekspresyonu tespit edilmiştir. Önceki çalışmalar, hPON1'e benzer şekilde, insan hPON3'ün HDL yüzeyinde lokalize olduğunu bildirmiştir (Aviram ve Rosenblat 2008)

hPON1 düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'yi lipit peroksidasyonuna karşı korur. LDL'nin ROS veya hücrel enzimler tarafından oksidasyonu, ateroskleroze ilk aşamasında yer alan aterosklerotik bir modifikasyon olarak kabul edilir. hPON1'in HDL ve biyolojik membranları da lipit peroksidasyonuna karşı korur. hPON1 eksik farelerde lipoprotein oksidasyonu ve inflamasyona karşı daha yüksek bir duyarlılık gösterilmiştir, oysa hPON1'i aşırı eksprese eden fareler iltihap ve ateroskleroza daha dirençlidir. Serumdaki düşük bir hPON1 aktivitesi, denekleri daha yüksek bir oksidatif strese maruz bırakır (Deakin ve ark., 2011). Oksitlenmiş lipidlerin hPON1 tarafından hidrolizinin bu enzimin laktonaz aktivitelerinden kaynaklandığı bildirilmiştir. hPON1'in antioksidan rolü, peroksidaz aktivitesiyle de ilişkilendirilmiştir, bu da yağ asitleri hidroperoksitler, kolesteril ester hidroperoksitler ve hidrojen peroksidin (H₂O₂) nötralizasyonuna yol açar (Ferretti ve ark., 2010). Akciğer kanseri, gastrointestinal kanser, meme ve jinekolojik kanser, prostat, mesane kanseri, merkezi sinir sistemi tümörleri, Hodgkin dışı lenfoma ve akut lenfoblastik lenfoma (ALL) gibi farklı kanser türlerinden etkilenen hastaların serumunda hPON1 aktivitesi önemli ölçüde düşüktür. hPON1 aktivitesindeki bir azalma, enzimin

antioksidan rolünü olumsuz yönde etkileyebilir ve daha yüksek oksidatif strese maruz bırakabilir (Barrera, 2012).

Anti-kanser ilaçlarının hPON1 üzerindeki etkisi geniş bir şekilde araştırılmamıştır. Kemoterapötik bir ilaç olan siklofosamid ile tedavi edilen sıçanlarda böbrek hPON1 aktivitesinde iki kat artış gösterilmiştir. Aksine, saflaştırılmış hPON1 kullanıldığında, kemoterapötik ajanlarla (setuksimab, paklitaksel, etoposid, dosetaksel ve ifosfamid) inkübasyonlar sırasında *in vitro* olarak azalmış bir hPON1 aktivitesi gözlenmiştir. Oksidatif stres ve inflamasyon, kanserin gelişmesinde ve kemoterapinin prognozunu belirlemede rol oynayan önemli faktörler olarak kabul edilir. Kanser hastalarında hPON1 aktivitesinde bir azalma oksidatif stres belirteçlerinde bir artışa sebep olmuştur. Herhangi bir ilaç, hPON1 enzim aktivitesinde de bir azalmaya neden olursa, oksidatif stresin artmasından dolayı ateroskleroz dahil birçok vasküler hastalık oluşabilir (Alım ve Beydemir 2016; Ferretti ve ark., 2015).

Bu çalışmada, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bendamustin'in hPON1 enzim aktivitesi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini araştırdık.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

DEAE-Sephadex A50, Sepharose 4B, 1-naftilamin, paraokson, protein reaktifleri ve elektroforez için kullanılan kimyasallar Sigma Chemical Co.'dan elde edildi. Diğer tüm kimyasal maddeler Sigma-Aldrich veya Merck'ten elde edilir. Bendamustin, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Bölümünden temin edildi.

Paraoksonaz aktivite ölçümü

İnsan serumu örnekleri, Erzincan Mengücekgazi Araştırma Hastanesi'nden temin edildi. hPON1 aktivitesi 25 °C'de 1 mM CaCl₂ içeren 50 mM glisin / NaOH (pH 10.5) içinde paraokson (diethyl p-nitrofenil fosfat) (1 mM) ile belirlenmiştir. hPON1 aktivite ölçümü, 412 nm'de p-nitrofenolün tahminine dayandırılmıştır. hPON1 aktivitesini hesaplamak için p-nitrofenolün molar ekstinksiyon katsayısı (pH 10.5'te $\epsilon = 18.290 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılmıştır. Bir enzim birimi, 25 °C'de 1 μmol substrat hidrolizini katalize eden enzim miktarı olarak tanımlandı. Aktivite ölçümü spektrofotometre (CHEBIOS UV-VIS) kullanılarak yapıldı.

Anti-kanser ilacı için *in vitro* çalışmalar

Bendamustin ilacının inhibitör etkilerini inceledik. Bu ilaç, kullanılan her konsantrasyon için üç kez test edildi. hPON1 aktiviteleri, farklı ilaç konsantrasyonlarının varlığında ölçüldü. Bir inhibitör olmadığında kontrol aktivitesinin % 100 olduğu varsayıldı. Bendamustin için, % Aktivite-[Konsantrasyon] grafikleri çizildi ve eğrinin denkleminde IC_{50} ve K_i değerleri hesaplandı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

hPON1, organofosfat ve lakton gibi esterleri hidrolize eden kalsiyum bağımlı bir esterazdır. hPON1, molekül ağırlığı 43-45 kDa olan bir glikoproteindir. Esas olarak karaciğer tarafından sentezlenir. hPON1 insan vücudundaki antioksidan savunma mekanizmalarından biridir. İnsan vücudundaki paraoksonlar da dahil olmak üzere reaktif oksijen türleri için birçok temizleme sistemi vardır. hPON1 canlı metabolizmasında reaktif oksijen türlerini temizleyerek LDL, HDL ve makrofajları oksidatif strese karşı korur. Bu nedenle, hPON1 kardiyovasküler hastalıkları önler (Golmanesh ve ark., 2008).

hPON1 aktivitesi ile ilaçlar arasındaki etkileşimler üzerine yapılan birçok çalışma vardır. Şimdiye kadar, statinler hPON1 üzerinde en çok çalışılan farmakolojik moleküllerdir. Bu çalışmalar, çeşitli

statinlerin oksidatif stresi düşürerek ve hPON1 aktivitesini artırarak yararlı etkilerinin olabileceğini göstermektedir. hPON1 aktivitesinin, oksidatif stres sınırlamasının bir sonucu olarak statinler tarafından artırılması mümkündür. Statinler genellikle hPON1 için faydalı görünmektedir. Pravastatin, simvastatin ve atorvastatin, hPON1 aktivitesi üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. (Malin ve ark., 2001; Kumar, 2010; Nagila ve ark., 2009). Aspirin, vasküler hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde yaygın olarak kullanılır. Aspirinin hPON1 aktivitesi üzerinde faydalı etkileri olabileceği test edildi. Aspirin kullanımı, koroner arter hastalığı olan hastalarda hPON1 aktivitesini anlamlı şekilde arttırdı (Bhattacharyya ve ark., 2008). Valsartan ve barnidipinin hPON1 aktivitesi üzerinde etkisi olmadığı bulunmuştur. (Saisho ve ark., 2006; Spirou ve ark., 2006). Başka bir çalışmada ise, gentamisin sülfat ve sefazolin sodyum hPON1 aktivitesini azaltmıştır. (Sinan ve ark., 2006) Laboratuvarımızda çeşitli enzim-antikanser ilaç etkileşimi çalışmaları yapılmıştır.

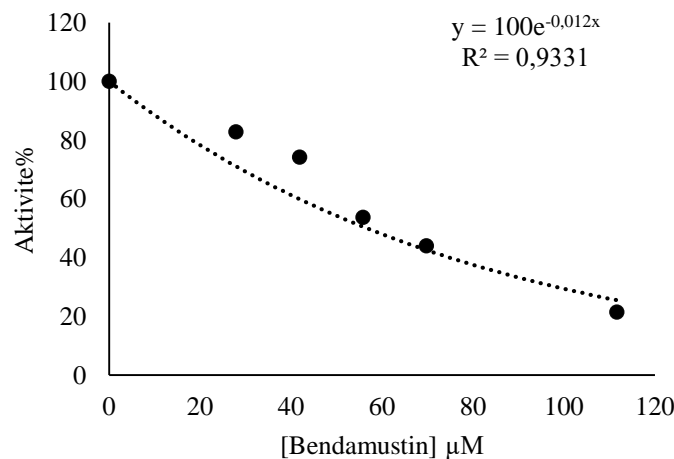
Örneğin, Türkeş ve arkadaşları (2016), bazı anti-kanser ilaçlar, (1) palonosetron hidroklorür, (2) bevacizumab ve (3) siklofosamid'in hPON1'in üzerine *in vitro* etkilerini incelemiştir. Anti-kanser ilaçların insan serumu hPON1 için güçlü inhibitörler olması çok önemlidir. Palonosetron hidroklorür diğer anti-kanser ilaçlarla karşılaştırıldığında enzim aktivitesini belirgin şekilde inhibe ettiği tespit edildi. İlaçların inhibisyon sırası, 1 > 2 > 3 olarak belirlenmiştir (Türkeş ve ark., 2016).

Anti-kanser ilaç olan bendamustin paraoksonaz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi çalışmaları yapıldı. Bendamustin için IC₅₀ değeri, %Aktivite-[I] grafiği yardımıyla 0.057 mM olarak belirlendi (Tablo 1 ve Şekil 1). Çalışmamızda insan serum hPON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi bendamustin için K_i sabitinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafikleri kullanılmıştır. K_i sabiti 0.26 mM olarak belirlendi (Tablo 1 ve Şekil 2). İnhibisyon türü yarışmasızdır.

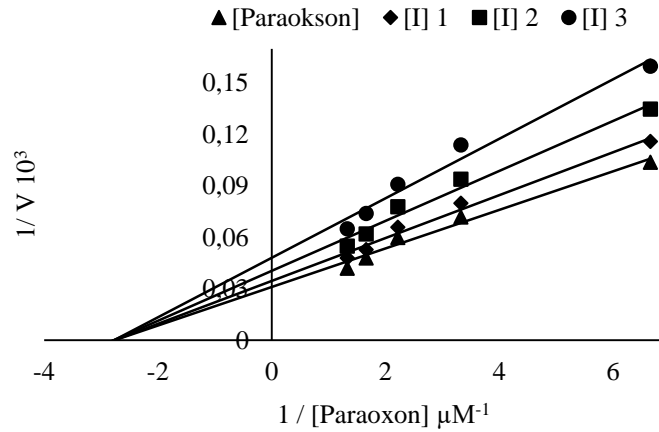
İnhibisyon çalışmaları sonucunda bendamustin'in hPON1 enzimini inhibe ettiği gözlemlendi.

Çizelge 1. IC₅₀ ve K_i değerleri

İnhibitör	IC ₅₀ (mM)	K _i (mM)	İnhibisyon türü
Bendamustin	0.057	0.26 ± 0.84	Yarışmasız



Şekil 1. hPON1 enzim aktivitesi üzerine bendamustin'in inhibisyon etkisini gösteren ve IC₅₀ değerinin belirlenmesi için kullanılan %Aktivite-[Konsantrasyon] grafiği



Şekil 2. İnsan serum hPON1 enzimi aktivitesi üzerine bendamustin'in etkisini gösteren ve K_i sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

SONUÇ

Sonuç olarak, bendamustin'in hPON1 üzerindeki *in vitro* etkilerini araştırdık. hPON1 ile bendamustin arasındaki ilişki hakkında herhangi bir literatürle karşılaşmadık. Bununla birlikte, paraoksonaz enziminin ekspresyonunun ve aktivitesinin kanser hastalıkları için kritik olduğu bilinmektedir. Birçok çalışma, farklı kanser hastalarda hPON1 aktivitelerinde bir azalma olduğunu göstermiştir. hPON1, antioksidan savunma ve hücre davranışının düzenlenmesinde yer alan çok işlevli enzimdir. Ayrıca, hPON1 aktivitesi kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma sağlar. Bendamustin kanser tedavisinde kemoterapötik ilaç olarak kullanılır. Kanser tedavisinde uygulandığında, özellikle aterosklerotik lezyonları olan hastalarda bazı metabolik bozukluklara neden olabilirler. Ancak, sonuçlarımız bazı *in vivo* çalışmalarla doğrulanmalıdır.

KAYNAKLAR

- Alim Z, Beydemir S, 2016. Some anticancer agents act on human serum paraoxonase-1 to reduce its activity. *Chemical Biology & Drug Design*, 88: 188–196.
- Aviram M, Rosenblat M, 2008. Paraoxonases (PON1, PON2, PON3) analyses *in vitro* and *in vivo* in relation to cardiovascular diseases. *Methods in Molecular Biology*, 477: 259–276.
- Barrera G, 2012. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*, 2012: 137289.
- Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ, Zhang R, Yang X, Schmitt D, Fu X, 2008. Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *Journal of the American Medical Association*, 299: 1265–1276.
- Deakin SP, Bioletto S, Bochaton-Piallat M., James RW, 2011. HDL-associated paraoxonase-1 can redistribute to cell membranes and influence sensitivity to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 50: 102–109.
- Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Bicchiega V, 2010. HDL-paraoxonase and membrane lipid peroxidation: a comparison between healthy and obese subjects. *Obesity*, 18: 1079–1084
- Ferretti G, Bacchetti T, Sahebkar A, 2015. Effect of statin therapy on paraoxonase-1 status: a systematic review and meta-analysis of 25 clinical trials. *Progress in Lipid Research*, 60: 50–73
- Furlong CE, Marsillach J, Jarvik GP, Costa LG, 2016. Paraoxonases-1, -2 and -3: what are their functions? *Chemico-Biological Interactions*, 259: 51–62.

- Golmanesh L, Mehrani H, Tabei M, 2008. Simple procedures for purification and stabilization of human serum paraoxonase-1. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70:1037-1042.
- Khan I, Gothwal A, Sharma AK, Qayum A, Singh SK, Gupta U, 2016. Biodegradable nano-architectural PEGylated approach for the improved stability and anticancer efficacy of bendamustine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92: 1242–1251.
- Kumar A, 2010. Effects of simvastatin on paraoxonase 1 (PON1) activity and oxidative stress. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3: 310-314.
- Malin R, Laaksonen R, Knuuti J, Janatuinen T, Vesalainen R, Nuutila P, Lehtimaki T, 2001. Paraoxonase genotype modifies the effect of pravastatin on high-density lipoprotein cholesterol. *Pharmacogenetics*, 11: 625-633.
- Nagila A, Permpongpaiboon T, Tantrarongroj S, Porapakham P, Chinwattana K, Deakin S, Porntadavity S, 2009. Effect of atorvastatin on paraoxonase1 (PON1) and oxidative status. *Pharmacological Reports*, 61: 892-898.
- Saisho Y, Komiya N, Hirose H, 2006. Effect of valsartan, an angiotensin II receptor blocker, on markers of oxidation and glycation in Japanese type 2 diabetic subjects: blood pressure-independent effect of valsartan. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 74: 201–203.
- Sinan S, Kockar F, Gencer N, Yildirim H, Arslan O, 2006. Effects of some antibiotics on paraoxonase from human serum *in vitro* and from mouse serum and liver *in vivo*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29: 1559–1563.
- Spirou A, Rizos E, Liberopoulos EN, 2006. Effect of barnidipine on blood pressure and serum metabolic parameters in patients with essential hypertension: a pilot study. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 11: 256–261.
- Türkeş C, Söyüt H, Beydemir Ş, 2016. In vitro inhibitory effects of palonosetron hydrochloride, bevacizumab and cyclophosphamide on purified paraoxonase-I (hPON1) from human serum. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42: 252–257.