



İnsan Serum Paraoksonaz-1 (PON1) Enzim Aktivitesi Üzerine Zoledronik Asit'in *In Vitro* İnhibisyon Etkisinin Araştırılması

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

¹ Uludağ Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Temel Eğitim Bölümü, Bursa, Türkiye

² Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Erzincan, Türkiye

Hakan SÖYÜT ORCID No: 0000-0002-0361-7458

Yakup ULUTAŞ ORCID No: 0000-0002-9839-9536

Ekrem KÖKSAL ORCID No: 0000-0002-1026-972X

*Sorumlu yazar: hakansoyut@uludag.edu.tr

(Alınış: 22.06.2020, Kabul: 12.12.2020, Online Yayınlanma: 30.12.2020)

Anahtar Kelimeler

Paraoksonaz,
İnhibisyon,
Zoledronik asit

Öz: Zoledronik asit azot içeren bir bisfosfonattır. Güçlü bir kemik rezorpsiyon inhibitörüdür. Osteoklast aktiviteyi inhibe eder. PON1 organofosfatların, aril esterlerin ve laktonların hidrolizini katalize eder. PON1, ateroskleroz dahil olmak üzere birçok vasküler hastalıkla ilişkili olduğu bilinen Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDH) ve Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein'i (HDL), oksidatif strese karşı koruyarak bir antioksidan enzim olarak görev yapar. Aslında, daha yüksek PON1 aktivitesi aterosklerozun önlenmesinde önemli bir rol oynar. Epidemiyolojik çalışmalar, düşük PON1 aktivitesinin kardiyovasküler hastalık riski ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu makalede, *in vitro* koşullarda insan serumunda PON1 enzim aktivitesi üzerine zoledronik asit kemoterapik ilacının inhibisyon etkisini araştırdık. İlaç, PON1 enzimini güçlü bir şekilde inhibe eder. Zoledronik asit için IC₅₀ değeri, 0,057 mM'dır. Ki sabiti ise 0,101 mM'dır. İnhibisyon türü yarışmalıdır.

Investigation of *In Vitro* Inhibition Effect of Zoledronic Acid on Human Serum Paraoxonase-1 (PON1) Enzyme Activity

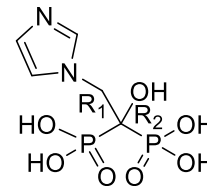
Keywords

Paraoxonase,
Inhibition,
Zoledronic acid

Abstract: Zoledronic acid is a nitrogen-containing bisphosphonate. It is a powerful bone resorption inhibitor. It inhibits osteoclast activity. PON1 catalyses the hydrolysis of organophosphates, aryl esters, and lactones. PON1 serves as an antioxidant enzyme by protecting Low Density Lipoprotein (LDH) and High-Density Lipoprotein (HDL) from oxidative stress, which is known to be associated with many vascular diseases, including atherosclerosis. Actually, higher PON1 activity plays a significant role in the prevention of atherosclerosis. Epidemiological studies indicate that low PON1 activity is associated with cardiovascular disease risk. In this article, we investigated the inhibition impact of zoledronic acid on PON1 enzyme activity in the human serum *in vitro* conditions. The drug strongly inhibits the PON1 enzyme. IC₅₀ value for zoledronic acid is 0.057 mM. Ki constant is 0.101 mM. The type of inhibition is competitive.

1. GİRİŞ

Zoledronik asit, R1 pozisyonunda bir hidroksil grubuna sahip diğer bisfosfonatlara benzese de, R2 pozisyonuna bağlı olan ve diğer bisfosfonatlardan ayıran heterosiklik imidazol grubudur. Zoledronik asidin kimyasal yapısı şekilde gösterilmiştir.



Şekil 1. Zoledronik asit'in kimyasal yapısı

(1-Hidroksil-2-imidazol-1-il-fosfonoetil) fosfonik asit monohidrat adı verilen zoledronik asidin kimyasal

formülü $C_5H_{10}N_2O_7P_2.H_2O$ 'dur ve molekül ağırlığı 290,1 g / Mol'dir.

Zoledronik asit, R1 hidroksil grubundan yoksun bifosfonatlardan daha fazla kemik bağlanması sergiler. Tüm bisfosfonatlar kemik emilimini engellemesine rağmen, zoledronik asit, R2 yan zincirinde bir azot grubu içerdiği için en güçlü kemik emilim inhibitörlerinden biridir. Zoledronik asit, farnesil difosfat (FPP) sentazını inhibe ederek hücrel mevalonat yolağına müdahale eder. Bu enzimin yokluğu, osteoklastlardaki guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı proteinlerin prenilenmesi için gerekli olan FPP ve geranil difosfat sentezini önler. Bu prenil proteinlerin kaybı, osteoporozun inhibisyonuna katkıda bulunan azalmış osteoklast aktivitesi ile ilişkilidir. Zoledronik asit kemik emilimini inhibe ederek, sıklıkla şiddetli ağrı çeken ileri iskelet kanser hastalarını etkili bir şekilde rahatlatır [1].

Paraoksonaz-I (EC 3.1.8.1, PON1), laktonaz enzim ailesinin bir üyesidir. Yapısında iki Ca^{2+} iyonu bulunan enzim karaciğerde sentezlenir. Enzimin paraoksonaz, arilesteraz ve diazokson olarak bilinen üç aktivitesi vardır. Bununla birlikte, enzimin fizyolojik aktivitesi hala net değildir [2]. Enzimin paraoksonu hidrolize etme özelliği nedeniyle, paraoksonaz olarak adlandırılır. Organofosfat bileşikler (OP'ler) tarımsal ve kırsal alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, paraokson, klorpirifos-okson ve diazokson tarımsal uygulamalarda sıklıkla kullanılır ve bu bileşikler PON1 için substratlardır. Bu bileşikler, insanlar, böcekler ve bitkiler de dahil olmak üzere diğer organizmalar için çok toksiktir [3]. PON1, HDL ye bağlı bir anti-oksidatif enzimdir. Bu nedenle, HDL'nin antioksidan aktivitesinin bir kısmı PON1 tarafından sağlanır. Enzim ayrıca antioksidan özelliği ile lipit peroksidasyonunu önlemede önemli bir role sahiptir. PON1, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve diğer lipoproteinleri bazı serbest radikal türlerinin neden olduğu oksidatif stresten korur. Paraoksonaz-I'in bu özelliği, HDL ve LDL'yi oksidasyona karşı korur. Oksidasyona bağlı oluşabilecek aterosklerotik lezyonları engeller [4]. PON1'in antioksidan rolü ile ateroskleroza önlediği gibi diyabet, hiperkolesterolemi ve benzeri birçok hastalığında gelişimini önler [5]. Birçok hastalıkta ilaçlar, etkilerini enzimlerin aktiviteleri artırarak veya azaltarak gösterir [6-12]. Bu enzimler üzerine ilaçların *in vitro* ve *in vivo* etkilerin belirlenmesi, birçok hastalığa karşı yeni ilaç geliştirme çalışmaları için önemli bir adım olabilir.

Daha önce PON1 enzimi ilaç inhibisyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin, Türkeş tarafından yapılan bir çalışmada, pantoprazol, omeprazol ve esomeprazol ilaçlarının PON1 enzimini etkili bir şekilde inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Bu ilaçlar, paraoksonaz enzimi yarışmalı bir şekilde inhibe etmiştir [13]. Başka bir çalışmada, İkinci ve Beydemir, çeşitli analjezik ilaçların insan PON1 aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmıştır.

Lornoksikam, indometasin, tenoksikam, diklofenak sodyum, ketoprofen ve lincomycin için IC_{50} değerlerini sırasıyla 0,13; 0,19; 0,34; 1,63; 6,23 ve 9,63 mM olarak bulmuşlardır. Yazarlar ayrıca, indometasin ve

tenoksikam'ın inhibisyon türünün yarışmalı, ketoprofen, lornoksikam, diklofenak sodyum ve linkomisin yarışmasız olduğunu belirtmişlerdir [14]. Ancak kemoterapik ilaçlarla daha çok araştırma yapmaya ihtiyaç vardır. Çünkü kemoterapik ilaçlar güçlü inhibitörlerdir.

Bu çalışmada kemoterapide yaygın olarak kullanılan zoledronik asidin insan paraoksonaz-1 enzimi üzerine *in vitro* etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Kimyasallar

DEAE-Sephadex A50, Sepharose 4B, 1-naftilamin, paraokson, protein reaktifleri ve elektroforez için kullanılan kimyasallar ve tüm kimyasal maddeler Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany) dan elde edildi. Zoledronik asit, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Bölümünden temin edildi.

2.2. Paraoksonaz Aktivite Ölçümü

İnsan serumu örnekleri, Erzincan Mengücekgazi Araştırma Hastanesi'nden temin edildi. PON1 aktivitesi 25 °C'de 1 mM $CaCl_2$ içeren 50 mM glisin / NaOH (pH 10,5) tampon çözeltisi içerisinde paraokson (diethyl p-nitrofenil fosfat) (1 mM) ile belirlendi. Aktivite ölçümü paraokson ile PON1 enziminin reaksiyonu sonucu oluşan p-nitrofenolün 412 nm'de absorpsiyon vermesi esasına dayanmaktadır. PON1 aktivitesini hesaplamak için p-nitrofenolün molar ekstinksiyon katsayısı (pH 10,5'te $\epsilon = 18.290 M^{-1}cm^{-1}$) kullanılmıştır. Paraoksonazın enzim ünitesi 1 dakikada hidroliz olan paraoksonun mikromol sayısıdır. Aktivite ölçümü spektrofotometre (CHEBIOS UV-VIS) kullanılarak yapıldı. PON1 enzimi için aktivite hesabı formül hali aşağıdadır:

$$EU/ml = \frac{\Delta OD}{18,290} \times \frac{V_T}{V_E} \times 1000$$

Bu formüle yer alan simgeler aşağıda açıklanmıştır:

EU/ml : 1 ml'deki enzim ünitesi
 ΔOD : Bir dakikadaki absorpsiyon değeri
 18,290 : Paranitrofenolün pH: 10,5'deki molar ekstinksiyon katsayısı ($M^{-1}cm^{-1}$)
 V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi (ml)
 V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi (ml)

Tablo 1. İnsan serum PON1 enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

Stok Aktivite Çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Kons. (mM)	Hacim (µl)	Kons. (mM)
Glisin/NaOH (pH:10,5)	500	25	500	25
Substrat Çözeltilisi	330	1	330	1
Destile su	120	-	Değişken	-
İlaç Çözeltilisi	0	-	Değişken	Değişken
Enzim Numunesi	50	-	50	-

2.3. Zoledronik Asit Kemoterapik İlacı İçin IC₅₀ ve K_i Sabitlerinin Belirlenmesi

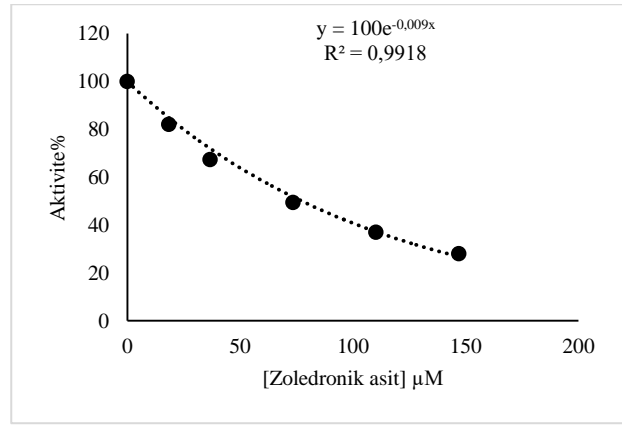
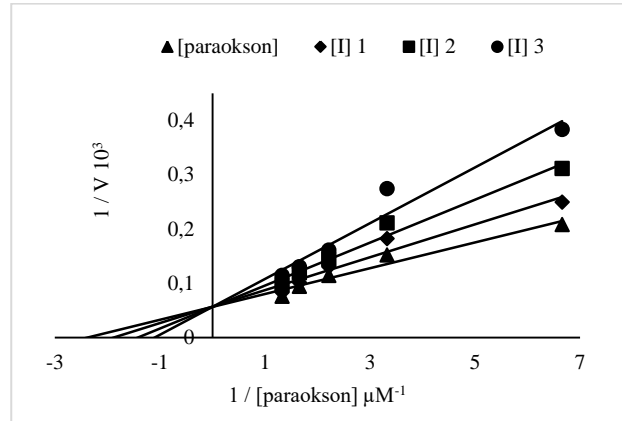
Kemik kanserinde yaygın olarak kullanılan gösteren zoledronik asit'in inhibitör etkileri araştırıldı. Bu kemoterapik ilaç, her konsantrasyon için üç kez test edildi. Enzimin paraoksonaz aktiviteleri, farklı ilaç konsantrasyon değerlerinde analiz edildi. Zoledronik asit, ilaç konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak aktivite yüzdesini gösteren bir grafik çizildi. İnhibitör yokluğunda kontrol aktivitesi% 100 olarak kabul edildi. Zoledronik asit'in % 50 inhibisyonu (IC₅₀ değeri) farklı inhibitör konsantrasyon değerleri kullanılarak grafikten elde edildi (Şekil 2). K_i değerini hesaplamak için, zoledronik asit'in üç farklı inhibitör konsantrasyonu test edildi (Şekil 3). Elde edilen Lineweaver-Burk eğrileri, K_i'nin değerini belirlemek için kullanıldı ve inhibisyon tipi Tablo 2'de gösterildi.

3. BULGULAR

Bu araştırmada, kemoterapik ilaç olan zoledronik asit'in paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi çalışıldı. Zoledronik asit için IC₅₀ değeri, %Aktivite-[I] grafiği yardımıyla 0,057 mM olarak belirlendi (Tablo 2 ve Şekil 2). Çalışmamızda, zoledronik asit'in K_i sabitinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafikleri kullanılmıştır. K_i sabiti 0,101 mM olarak belirlendi (Tablo 2 ve Şekil 3). İnhibisyon türü yarışmalıdır. İnhibisyon çalışmaları sonucunda zoledronik asit'in PON1 enzimini güçlü bir şekilde inhibe ettiği gözlemlendi.

Tablo 2. IC₅₀ ve K_i değerleri

İnhibitör	IC ₅₀ (mM)	K _i (mM)	İnhibisyon türü
Zoledronik asit	0,057	0,101 ± 0,29	Yarışmalı

**Şekil 2.** PON1 enzim aktivitesi üzerine zoledronik asit'in inhibisyon etkisini gösteren ve IC₅₀ değerinin belirlenmesi için kullanılan %Aktivite-[Konsantrasyon] grafiği**Şekil 3.** İnsan serum PON1 enzimi aktivitesi üzerine zoledronik asit'in etkisini gösteren ve K_i sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

4. SONUÇ

PON1 enzimi beyin, kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, ince bağırsak gibi birçok dokuda bulunur. Bununla birlikte, PON1, metabolizmada en fazla karaciğer tarafından sentezlenir ve HDL'ye bağlanır ve daha sonra kan dolaşımına salınır [15]. PON1, HDL'nin bir takım antiaterojenik görevlerinden doğrudan sorumludur. Bu görevler arasında lipoproteinlerin ve hücrelerin oksidatif strese karşı korunması ve ayrıca ateroskleroz ve lipoprotein peroksidasyonunun önlenmesi yer alır [16]. PON1'in bu koruyucu etkileri serumdaki enzim seviyesi ile ilişkilidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ateroskleroz, diyabet ve hiperkolesterolemili hastalarda PON1 düzeylerinin düşük olduğunu belirtilmiştir. PON1'in aşırı ekspresyonunda özellikle kardiyovasküler hastalıkların gelişimini engellediği bulunmuştur. Ayrıca PON1'in makrofajlarda HDL akışını uyardığı ve LDL biyosentezini inhibe ettiği belirlenmiştir [17]. Başka bir çalışmada, metabolizmayı koroner arter hastalığı, diyabet, obezite gibi oksidatif stresle ilişkili koşullara karşı korumak için PON1'in HDL'den hücre zarının dış yüzeyine taşındığı gösterilmiştir [18].

Enzimler, hasta metabolizmasında kemoterapik uygulama için uygun hedeflerdir. İlaç molekülleri

enzim aktif bölgelerine ve diğer allosterik bağlanma bölgelerine bağlanırlar. Onlar, biyolojik etkilerini enzimin aktif bölgesi üzerinde yarışmalı, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon ile gösterirler. PON1-kemoterapik ilaç etkileşimi konusunda az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma, zoledronik asit ile paraoksonaz I arasındaki etkileşimi araştırarak akademik literatüre katkıda bulunmayı amaçlamaktadır.

Örneğin; daha önce yaptığımız bir çalışmada, palonosetron hidroklorür, bevacizumab ve siklofosamid'in PON1'in üzerine *in vitro* etkilerini incelenmiştir. Bu ilaçların insan serumu PON1 enzim aktivitesini belirgin şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir [19]. Başka bir çalışmada, vinkristin sülfat, epirubisin hidroklorür ve doksorubisin hidroklorür kemoterapik ilaçları da PON1 aktivitesi üzerine negatif etkiye sahiptir ve enzimi düşük konsantrasyonlarda inhibe etmiştir [20]. Gökçe ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada salbutamol sülfat, tiotropium, vareniklin tartrat, siprofloksasin hidroklorür, flutikazon propiyonat, teofilin sodyum glisinat, moksifloksasin hidroklorür, ampicilin trihidrat ve montelukast sodyum ilaçlarının PON1 enzimini güçlü bir şekilde inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Salbutamol sülfat en güçlü inhibisyon etkisini gösterirken, montelukast sodyum en zayıf inhibisyon etkisini gösterdi [21].

Bu çalışmada, zoledronik asit için IC_{50} değeri, 0,057 mM ve K_i sabiti ise 0,101 mM olarak bulunmuştur. IC_{50} ve K_i değerleri, zoledronik asit'in PON1 enzimini çok düşük konsantrasyonlarda inhibe ettiğini göstermiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızda, iskelet kanserinde sık kullanılan kemoterapik ilaç zoledronik asit'in kardiyovasküler hastalıklar gibi ciddi vakalarda rolü olan PON1 aktivitesi üzerindeki *in vitro* etkilerinin araştırılması üzerinde durulmuştur. PON1 inhibisyonu nedeniyle bu ilacı alan hastalarda çok çeşitli riskler ortaya çıkabilir. PON1'in azalmış aktivitesi, ateroskleroz için önemli bir risk faktörüdür. Bu çalışma *in vivo* araştırmalarla desteklenmelidir. PON1'in kardiyovasküler hastalıklarla ilgili bir biyobelirteç olarak kullanıp kullanamayacağına dair evrensel bir sonuç elde edilmediği için daha fazla çalışmanın yapılması gerekir.

Teşekkür

Çalışmada fikirleri ile destek olan Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL'a ve deneysel çalışmalarını yapan Araştırma Görevlisi Yakup ULUTAŞ'a teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

[1] Li EC, Davis, LE. Zoledronic acid: A new parenteral bisphosphonate. Clin Ther. 2003;25(11):2669-708.

- [2] İsgör MM, Beydemir Ş. Some cardiovascular therapeutics inhibit paraoxonase 1 (PON1) from human serum. Eur J Pharmacol. 2010;645(1-3):135-42.
- [3] Androutsopoulos VP, Kanavouras K, Tsatsakis AM. Role of paraoxonase 1 (PON1) in organophosphate metabolism: implications in neurodegenerative diseases. Toxicol Appl Pharmacol. 2011;256(3):418-24.
- [4] Cebeci B, Alim Z, Beydemir, Ş. *In vitro* effects of pesticide exposure on the activity of the paraoxonase-1 enzyme from sheep liver microsomes. Turk J Chem. 2014;38(3):512-20.
- [5] Srivastava S, Singh D, Patel S, Singh MR. Role of enzymatic free radical scavengers in management of oxidative stress in autoimmune disorders. Int J Biol Macromol. 2017;101:502-17.
- [6] Ceylan M, Temel Y, Kocyigit UM, Alwasel SH, Gülçin I, Gürbüz B. Synthesis, carbonic anhydrase I and II isoenzymes inhibition properties, and antibacterial activities of novel tetralone-based 1, 4-benzothiazepine derivatives. J Biochem Mol Toxicol. 2017;31(4):1-11
- [7] Temel Y, Ayna A, Hamdi Shafeeq I, Ciftci M. *In vitro* effects of some antibiotics on glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocyte. Drug Chem Toxicol. 2020;43(2):219-23.
- [8] Temel Y, Kocyigit UM. Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocytes and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. J Biochem Mol Toxicol. 2017;31(9):219-27.
- [9] Temel Y, Taslimi P, Yoku A. Inhibitory effects of oxytocin and oxytocin receptor antagonist atosiban on the activities of carbonic anhydrase and acetylcholinesterase enzymes in the liver and kidney tissues of rats. J Biochem Mol Toxicol. 2017;31(11):1-7.
- [10] Temel Y, Taysi MŞ. The Effect of Mercury Chloride and Boric Acid on Rat Erythrocyte Enzymes. Biol Trace Elem Res. 2018;184(1):177-82.
- [11] Temel Y, Küfrevioğlu ÖI, Ciftci M. Investigation of the effects of purification and characterization of turkey (*Meleagris gallopavo*) liver mitochondrial thioredoxin reductase enzyme and some metal ions on enzyme activity. Turkish J Chem. 2017;41(1):48-60.
- [12] Türkeş C, Söyüt H, Beydemir S. Effect of calcium channel blockers on paraoxonase-1 (PON1) activity and oxidative stress. Pharmacol Rep. 2014;66(1):74-80.
- [13] Türkeş C. A potential risk factor for paraoxonase 1: *in silico* and *in vitro* analysis of the biological activity of proton-pump inhibitors. J Pharm Pharmacol. 2019;71(10):1553-64.
- [14] Ekinci D, Beydemir Ş. Evaluation of the impacts of antibiotic drugs on PON 1; a major bioscavenger against cardiovascular diseases. Eur J Pharmacol. 2009;617(1-3):84-89.
- [15] Türkeş C, Beydemir S, Küfrevioğlu ÖI. *In vitro* and *in silico* studies on the toxic effects of antibacterial

- drugs as human serum paraoxonase 1 inhibitor. *Chem Select.* 2019;4(33):9731–36.
- [16] Jaouad L, Milochevitch C, Khalil A. PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. *Free Radic Res.* 2003;37(1):77–83.
- [17] Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The Paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(2):153–63.
- [18] Aviram M, Rosenblat, M. Paraoxonases (PON1, PON2, PON3) analyses *in vitro* and *in vivo* in relation to cardiovascular diseases. *Methods Mol Biol.* 2008;477:259–76.
- [19] Türkeş C, Söyüt H, Beydemir Ş. *In vitro* inhibitory effects of palonosetron hydrochloride, bevacizumab and cyclophosphamide on purified paraoxonase-I (hPON1) from human serum. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2016;42:252–57.
- [20] Türkeş C. Investigation of potential paraoxonase-I inhibitors by kinetic and molecular docking studies: chemotherapeutic drugs. *Protein Pept Lett.* 2019;26(6):392-402.
- [21] Gökçe B, Sarioğlu N, Gençer N, Arslan O. Association of human serum paraoxonase-1 with some respiratory drugs. *J Biochem Mol Toxicol.* 2019;33(12):224-31.