

Metil paration bileşiminin paraoksonaz enzimi üzerine inhibisyon etkisinin araştırılması

Nahit GENÇER*

Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Çağış Kampüsü, Balıkesir

Geliş Tarihi (Received Date): 07.02.2019

Kabul Tarihi (Accepted Date): 14.03.2019

Özet

Bu çalışmada, amonyum sülfat çöktürmesi ve Sepharose-4B-L-tirosin-1-aminoantresen jelini içeren hidrofobik etkileşim kromatografisi tekniği kullanılarak insan paraoksonaz (PONI) enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PONI enziminin saflık kontrolü SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile yapılmıştır. Saflaştırma oranı 663 olarak bulunmuştur. Daha sonra saf enzim üzerine metil paration zirai ilacının inhibisyon etkisi incelenmiştir. Söz konusu ilacın IC₅₀ değeri 1,41 mM bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Paraoksonaz, saflaştırma, metil paration.

Investigation of the effect of methyl parathion on the paraoxonase enzyme

Abstract

In this study, human paraoxonase (PONI) enzyme was purified by using the hydrophobic interaction chromatography technique including ammonium sulfate precipitation and Sepharose-4B-L-tyrosine-1-aminoantresan gel. The purity control of purified PONI enzyme was performed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Purification rate was found to be 663. Then, the inhibition effect of methyl parathion on pure enzyme was investigated. The IC₅₀ value of this compound was 1.41 mM.

Keywords: Paraoxonase, purification, methyl parathion.

*Nahit GENÇER, ngencer@balikesir.edu.tr, <http://orcid.org/0000-0001-7092-8857>

1.Giriş

Paraoksonaz enzimi (EC 3.1.8.1, PON1) karaciğer tarafından sentezlenmektedir. Yapısal ve katalitik kalsiyum olmak üzere iki adet metal iyonu içeren bir esterazdır. Serumda, yüksek yoğunluktaki lipoproteinlere bağlı olarak bulunur [1]. PON1 enziminin şimdiye kadar üç farklı fonksiyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Birincisi; PON1 enzimi organofosfat ajanları ve sinir gazlarını hidroliz ederek detoksifikasyonda önemli rol oynar. İkincisi; LDL'nin oksidasyonu ile lipit peroksidlerin oluşumuna karşı koruyucu etkisi ile antioksidan özelliği vardır. Üçüncüsü; bakterilerin birbiri ile iletişimini sağlayan lakton bileşiklerini hidroliz ettiği için laktonaz aktivitesi ile ayrıca önem taşımaktadır [2, 3].

Zirai tarım ilacı olarak da bilinen pestisit deyimi, 1-insektisit (böcek öldürücü), 2-herbisit (yabani ot öldürücü), 3-fungusit (küf öldürücü), 4-rodentisit (kemirgen öldürücü) vb. şeklinde sınıflandırılmaktadır. Bilinçsiz pestisit kullanımının sonucunda gıdalarda pestisit kalıntıları olur ve bunlar insanlar üzerinde olumsuz etkiler gösterebilir. Pestisitlerin kanserojen etkileri olduğu saptanmıştır [4].

Metil paration, tarım alanında ve zararlı böceklerin yok edilmesinde geniş çapta kullanılan bir insektisit olup her yıl çok sayıda insan çeşitli sebeplerden dolayı metil parationa maruz kalmaktadır. Bu bileşik Akdeniz Bölgesi'nde özellikle tarımsal alanda çok fazla miktarda kullanılan bir insektisittir [5].

Bu çalışmada, amonyum sülfat çöktürmesi ve Sepharose-4B-L-tirosin-1-aminoantresen jelinden oluşan hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) tekniği kullanılarak PON1 enziminin saflaştırılması ve metil parationun bu enzim üzerine inhibisyon etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal metod

2.1. Kan serumunun ayrılması

Gönüllü kişilerden alınan kanlar 5000 rpm'de, +4°C'de ve 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Bu serumlar deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.

2.2. Enzim aktivite tayini

Aktivite ölçümü için 50 µL enzimi tampon çözeltisine (900 µL, 0,1 M trise-baz, pH:8,0 ve 100 µL, 1 mM paraoksan) çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412 nm'de bir dakikadaki absorbansta meydana gelen artış tespit edildi [6]. Bu sayede paraoksan substratının hidroliz hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlandı ve aradaki fark enzim aktivitesi olarak hesaplandı. Bir dakikada oluşan p-nitrofenolün mikromolü bir ünite olarak kabul edildi.

2.3. Amonyum sülfat çöktürmesi (AMS)

Bu amaçla literatürde daha önce belirlenmiş olan %60-80 aralığında amonyum sülfat çöktürme işlemi gerçekleştirildi [7].

2.4. Hidrofobik jel sentezi

Enzimi saflaştırmak için kullanılan hidrofobik jel üç aşamada sentezlendi. İlk olarak, Sepharose 4B üzerindeki hidroksil grupları siyanojen bromür ile aktive edildi. Bir sonraki aşamada, CNBr kullanılarak aktive edilen Sepharose-4B ile L-tirozin'in reaksiyonu sonucu Sepharose-4B-L-tirozin jeli elde edildi. Son olarak, diazolanmış 1-aminoantresan Sepharose 4B- L-tirozine bağlanmasıyla hidrofobik matris sentezlendi.

2.5. Enzimin saflaştırılması

Sepharose-4B-L-tirosin-1-aminoantresan jeli içeren kolon 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren 0,1 M Tris-HCl (pH:8,0) çözeltilisiyle dengelendi ve bu kolona sözkonusu enzimi içeren serum örneği tatbik edildi. Kolona yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. PON1 enzimi 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 solüsyonu ile 1,5 mL'lik fraksiyonlar şeklinde elue edildi.

2.6 Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayini

Protein miktarları Bradford metoduna göre 595 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu işlemde serum albumin standart olarak kullanıldı [8].

2.7 SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

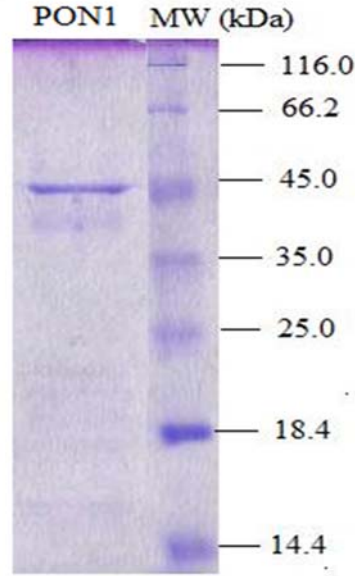
PON1 enziminin HEK ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid derişiminde; yığma jeli % 3 ve ayırma jeli % 10 olacak şekilde SDSPAGE Laemmler yöntemi ile enzimin saflık derecesi kontrol edildi [9].

2.7 Metil parationun IC₅₀ değerlerinin bulunması

Bu bileşiğin IC₅₀ değerini bulmak için, 2 mM paraoksan substratı ile çalışıldı. Pestisit çözeltilisinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1,05 ml' lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0,05 ml enzim çözeltilisi alınıp 1 ml (tampon + substrat + pestisit) çözeltilisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412 nm' de bir dakikada absorbans da meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite -[I] grafikleri çizildi.

3. Sonuç ve tartışma

Çalışmamızda, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip PON1 enziminin HEK tekniği ile saflaştırılması gerçeleştirilmiş ve saflık kontrolü elektroforez ile yapılmıştır. PON1'in molekül ağırlığı yaklaşık 43 kDa olarak tek bant şeklinde SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. (şekil 1). Elde edilen bu sonuç literatürdeki sonuçlar ile uyumludur [7].



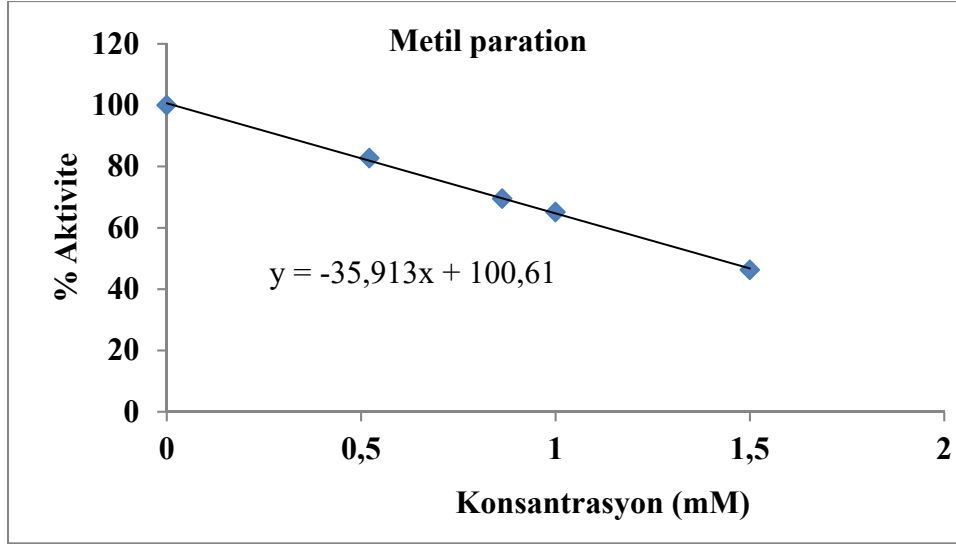
Şekil 1. PON1 enziminin SDS-PAGE görüntüsü.

Safılaştırma basamaklarının her bir aşamasında enzim aktiviteleri ve protein tayıneri yapıldı. Bu veriler kullanılarak söz konusu enzimin safılaştırma tablosu oluşturuldu. (Tablo 1). Tablo'da görüldüğü gibi 663 kat safılaştırma elde edildi. PON1 enziminin HEK yöntemi ile safılaştırılması ilk olarak Sinan ve arkadaşları tarafından yapılmıştır ve bu enzim 227 kat safılaştırılmıştır [7]. Yapılan bir diğerk çalışmada Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin jeli modifiye edilmiş ve safılaştırma işleminin sırasında, ek olarak uygulanan iki basamak sonucunda enzim 302 kat safılaştırılmıştır [10]. Basit kromatografik yöntemler kullanılan bir başkaka çalışmada iyon değışim ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılırken enzim yaklaşık 225 kat safılaştırılmıştır [11].

Tablo 1. PON1 enziminin safılaştırma tablosu.

Safılaştırma Basamağı	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Safılaştırma Derecesi
Serum	30	915	1015	0,90	100	-
AMS	10	498	396	1,26	54	1,4
HEK	2	132	0,221	597	14	663

Çalışmamızın diğerk aşamasında saf enzim üzerine metil paration zirai ilacının inhibisyon etkisi incelenmiştir. Söz konusu ilacın IC₅₀ değeri çizilen grafikten (Şekil:2) 1,41 mM bulunmuştur. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu üç farklı sebepten dolayı son derece önemli bir konudur; 1-biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizmasıdır, 2- birçok ilaç ve zehirli bileşikler mekanizmalarını bu yolla gerçekleştirir, 3-inhibisyon olayı aynı zamanda enzimlerin etki mekanizmasının aydınlatılmasında oldukça önemlidir.



Şekil 2. İnhibisyon grafiği.

Çoğu pestisitler verimi artırma amacıyla tarımcılıkta kullanılır. Bu kimyasalların kullanımı ekinlerin gelişimine pozitif etki göstermelerine rağmen, bazı pestisitler, kalıntıları, metabolitleri ve/veya atıkları çevre üzerine umulmayan ters etkilere sebep olabilir [12]. Pestisitler, balık yemleri, dezenfektanlar gibi kullanımlarının yanı sıra tarımda verimi etkileyen zararlı bitki, hayvan ya da mikroorganizmalara karşı savaşta da önemli bir yere sahiptirler. Ancak bu faydalarına rağmen pestisitler insan sağlığına zararlı pek çok etkiye de sahiptirler [13]. Yüksek nörotoksik tarımsal kimyasal özellikleriyle bilinen çok yaygın bir pestisit olan metil paration, böcek haşerelerini yok etmek için dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsan sağlığını içeren çevre, topraktaki kalıntıları nedeniyle ölümcül tehlikesiyle karşı karşıyadır [14].

Kaynaklar

- [1] Azarsız, E., Sözmen, E.Y., Paraoksonaz ve klinik önemi, **Türk Biyokimya Dergisi**, 25(3), 109-119, (2000).
- [2] Durrington, P.N., Mackness, B., Mackness, M.I., Paraoxonase and atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, 21(4), 473-480, (2001).
- [3] Ng, C. J., D. M. Shih, S. Y. Hama, N. Villa, M. Navab, and S. T. Reddy, The paraoxonase gene family and atherosclerosis, **Free Radical Biology and Medicine**, 38(2), 153-163, (2005).
- [4] Gencer, N., Paraoksonaz Q ve R izoenzimlerinin saflaştırılması ve bazı çevre kirleticilere karşı afinitesinin araştırılması, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, (2008).
- [5] Dalkılıç, S., Metil paration ile muamele edilen sıçan dokularında sülfidril grubu konsantrasyonu değişimlerinin tespit edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2006).
- [6] Gan, K.N., Smolen A., Eckerson HW., La Du BN., Purification of human serum paraoksonase/arylesterase, evidence for one esterase catalyzing both activities, **Drug Metabolism and Disposition**, 19(1), (1991), 100-6

- [7] 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(5), 565-574, (2006).
- [8] Bradford M., A rapid and sensitive method for the quantition of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, 72, 248–254, (1976).
- [9] Laemmli, D. K., Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**, London, 227, 680, (1970).
- [10] Ekinci, D., Şentürk, M., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö. İ., Supuran, C., T., An alternative purification method for human serum paraoxonase 1 and its interactions with sulfonamides” **Chemical Biology & Drug Design**, 76, 552–558, (2010).
- [11] Ekinci, D., Beydemir, Ş., Ateş, O., In vitro effects of dexamethasone on human serum paraoxonase-1 (PON1) activity, **Hacettepe Journal of Biology and Chemistry**, 37(3), 197-205, (2009).
- [12] Isik, S., Kockar, F., Ozensoy, O., Arslan, O., Differential in vitro effects of some pesticides on CA activities from some freshwater and seawater fish erythrocytes, **Fresenius Environmental Bulletin**, 13(1), 25–29, (2004).
- [13] Karakoç, Ö., Nakiboğlu, N., Ditiyokarbamat pestisitleri ve tayin yöntemleri, **Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 12(1), 112-135, (2010).
- [14] Pattanayak, S., Chakraborty, S., Biswas, S., Chattopadhyay, D., Chakraborty, M., Degradation of methyl parathion, a common pesticide and fluorescence quenching of Rhodamine B, a carcinogen using β -d glucan stabilized gold nanoparticles. **Journal of Saudi Chemical Society**, 22(8), 937-948, (2018).