



DIŞ MACUNLARINDA KULLANILAN BAZI BİLEŞİKLERİN BİYOFİLM İNHİBİTÖRÜ OLAN PON1 ENZİMİNİN LAKTONAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

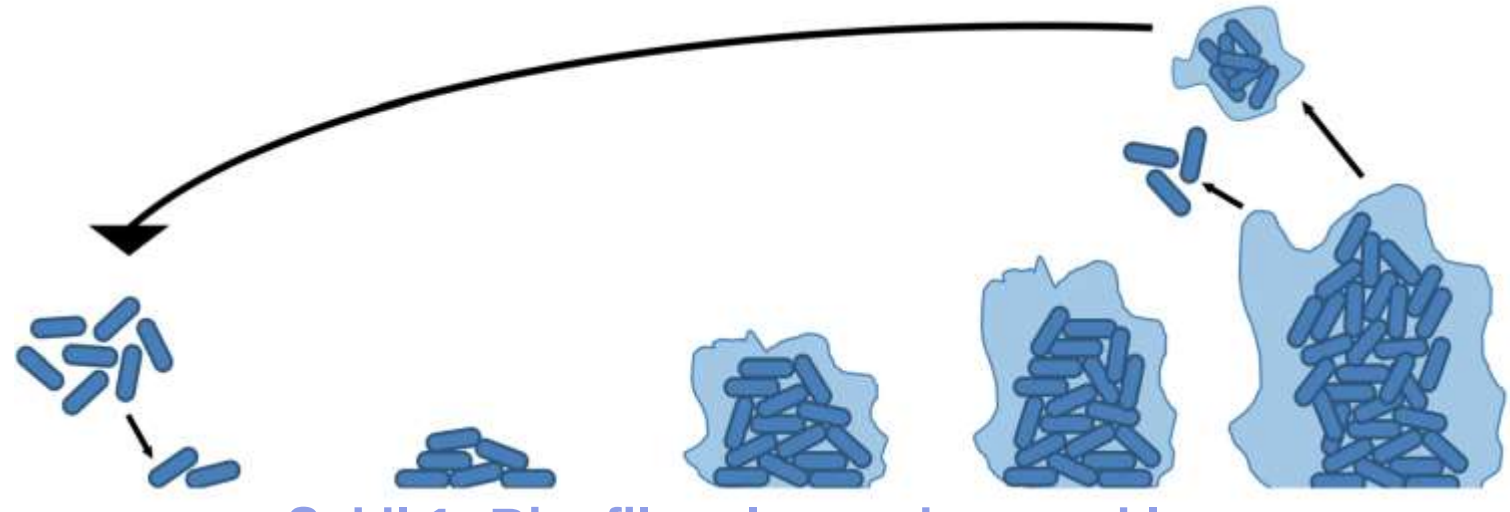


Merve Nur İRGİN

Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi / Kimya Anabilimdalı

Danışman: Prof.Dr. Oktay ARSLAN

Biyofilmler, milyonlarca mikroorganizma içeren ve kendi ürettikleri bir matris içinde gömülü olan bakteri topluluklarından oluşur. Bu matris, ekstraselüler proteinler, DNA ve polisakkaritlerden meydana gelir. Bazı mikroorganizmalar, oluşturdukları biyofilm sayesinde antibiyotiklerden korunarak yaşamlarını sürdürürler. Bu şekilde, antibiyotiklere dirençli kalıcı enfeksiyonlara yol açarlar. Antimikrobiyal ajanlara karşı bakteriyel direncin yoğun gelişimi, günümüzde halk sağlığı açısından büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle, **bakteriyel biyofilm oluşumunu engellemek için antibiyotik dışı alternatif stratejilerin geliştirilmesi kritik öneme sahiptir.** Olgun biyofilmlerin yok edilmesine odaklanmak yerine biyofilm oluşumunu önlemek daha akılcı bir yaklaşım tarzıdır.



Şekil 1: Biyofilm oluşum basamakları

Biyofilm oluşumu, hücrelerin bir substrata ilk tutunmasıyla başlar, bunu hücrelerin geri dönüşümsüz tutunması, mikro koloni oluşumu ve biyofilm olgunlaşması ve diğer substratları kolonize etmek üzere hareket eden hücrelerin veya agregatların dağılması izler.

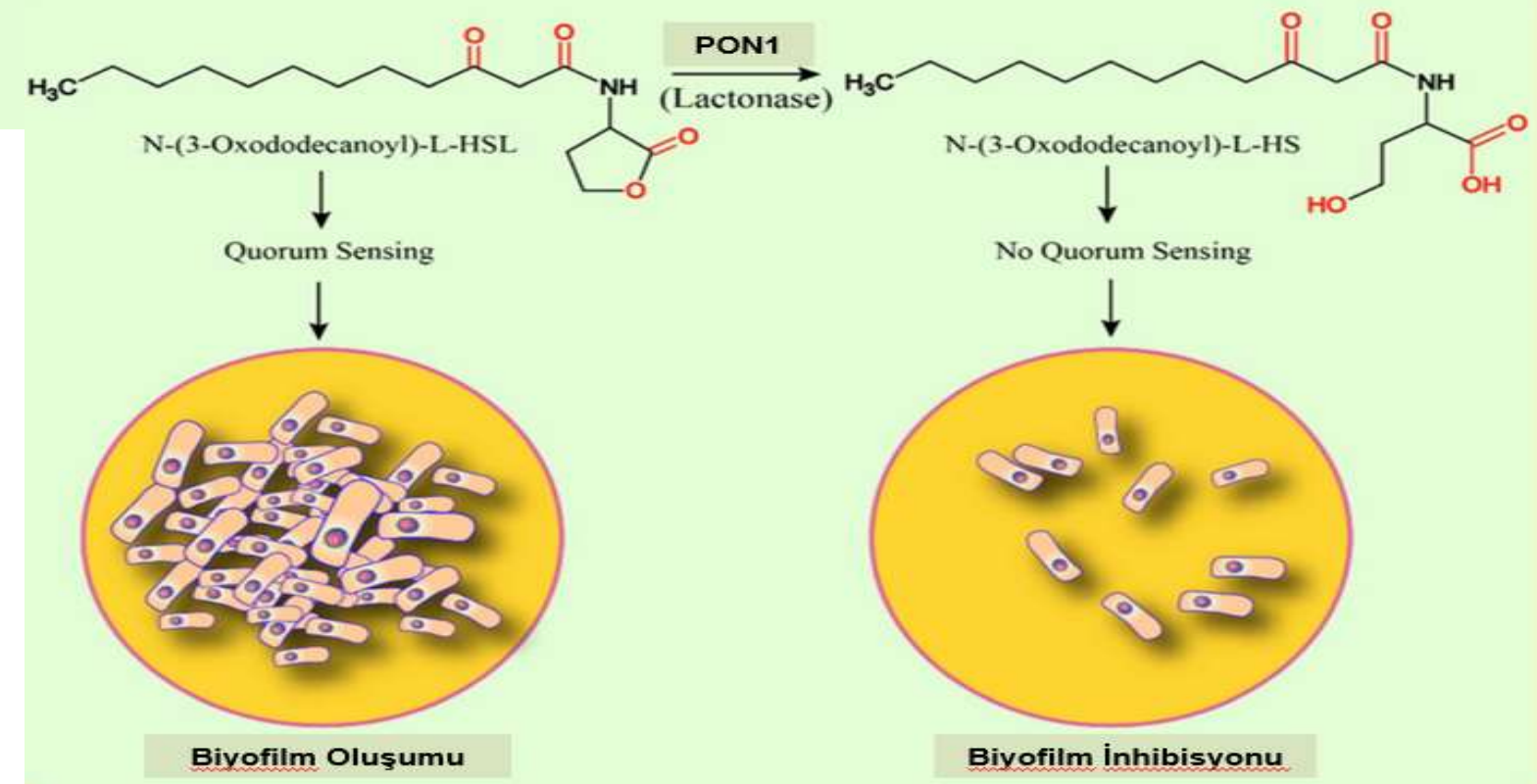
Diş Macunlarında Kullanılan Önemli Bazı Kimyasal Bileşikler



Triklosan
SDS
Titanyum dioksit
Polietilen glikol
Paraben
Dietanolamin
Propilen glikol

Biyofilm oluşumunun temel mekanizmalardan biri, “quorum sensing” (QS) adı verilen bir bakteriyel iletişim sistemidir. QS, bakteriyel popülasyon yoğunluğuna bağlı olarak otoindüktör (lakton yapısında bileşikler) adı verilen küçük sinyal molekülleri aracılığıyla gerçekleşen bir hücrelerarası iletişim sürecidir. QS aktivitesinin inhibe edilmesi (quorum quenching-QQ) mikrobiyal enfeksiyonların tedavisi için önemli alternatif yöntemler olduğu düşünülmektedir. **QQ, QS sinyallerini etkisiz hale getiren QQ enzimleri, enfeksiyon tedavisi için umut verici antibiyotik dışı yaklaşımlardır.**

En önemli QS inhibitörleri olan paraoksonazlar (PON), PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç farklı formdan oluşan bir hidrolaz enzim grubudur. PON1, PON ailesinin ilk ve üzerinde en çok çalışma yapılan üyesidir. PON1 laktonaz aktivitesi ile biyofilm oluşumunu engellediği yönünde önemli kanıtlar vardır.



Bu çalışmada diş macunlarında kullanılan triklosan, SDS ve polietilen glikol bileşiklerin PON1 izoenzimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Yapılan literatür araştırmasında bu bileşiklerin laktonaz aktivitesi üzerinde etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yukarıda belirtildiği gibi PON1 enzimi laktonaz aktivitesi ile bakterilerin iletişim sistemini bozarak biyofilm oluşumunu engellemektedir. Söz konusu bileşiklerin bu enzim üzerindeki etkilerinin belirlenmesinin önemli olacağı düşüncesindeyiz. Çünkü; olgun biyofilmlerin yok edilmesine odaklanmak yerine biyofilm oluşumunu önlemek daha akılcı bir yaklaşım tarzı olacağı kanaatindeyiz.

DENEYSEL ÇALIŞMA

Amonyum Sülfat Çöktürmesi İle Kısmen Saflaştırma

Amonyum sülfat çöktürmesi ile PON enziminin kısmen saflaştırılması hedeflenmektedir. Daha önceden yapılan çalışmalar doğrultusunda PON enzimi için de çökelme fraksiyonları % 60 - % 80 olarak gerçekleştirildi.



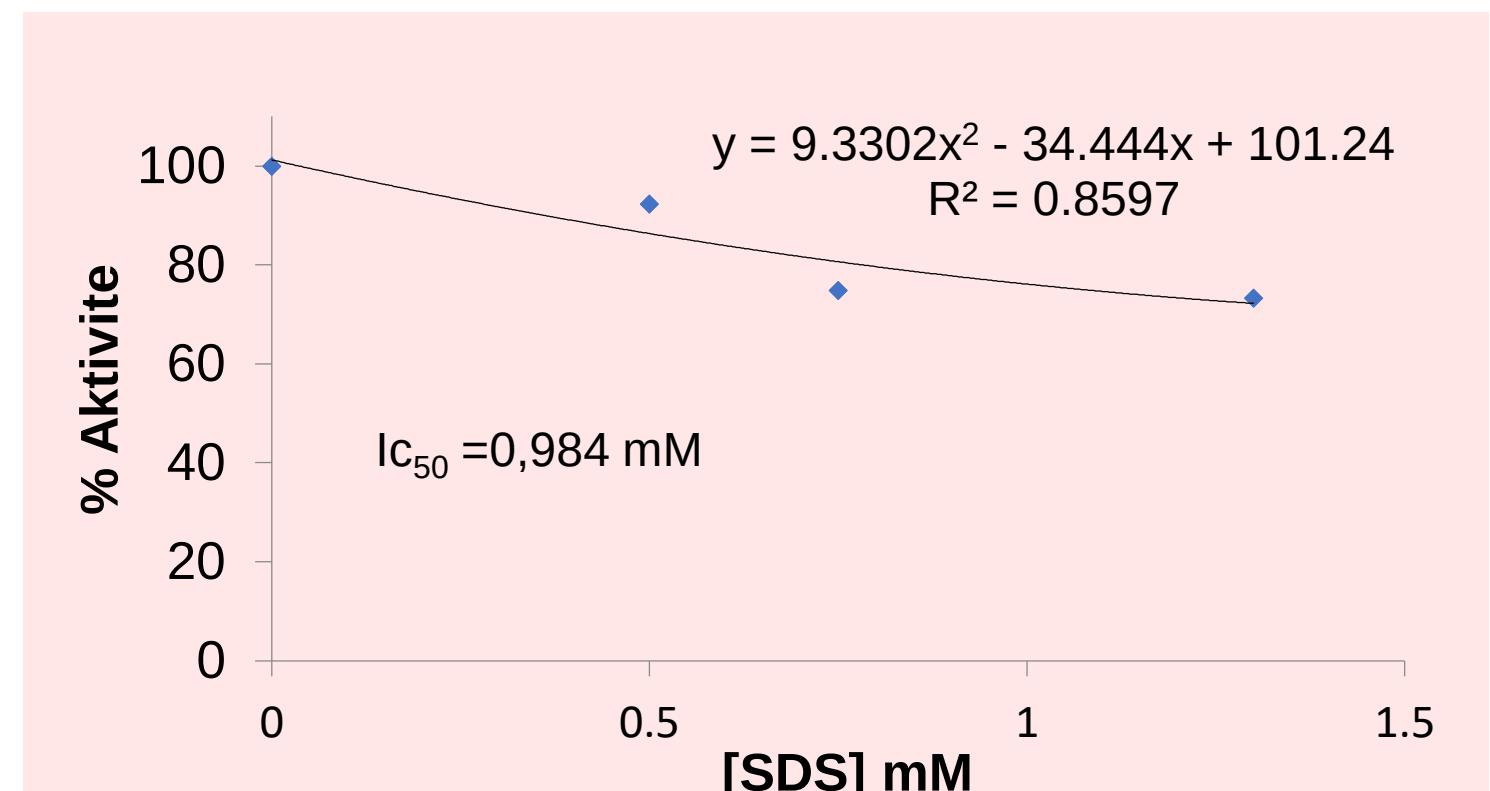
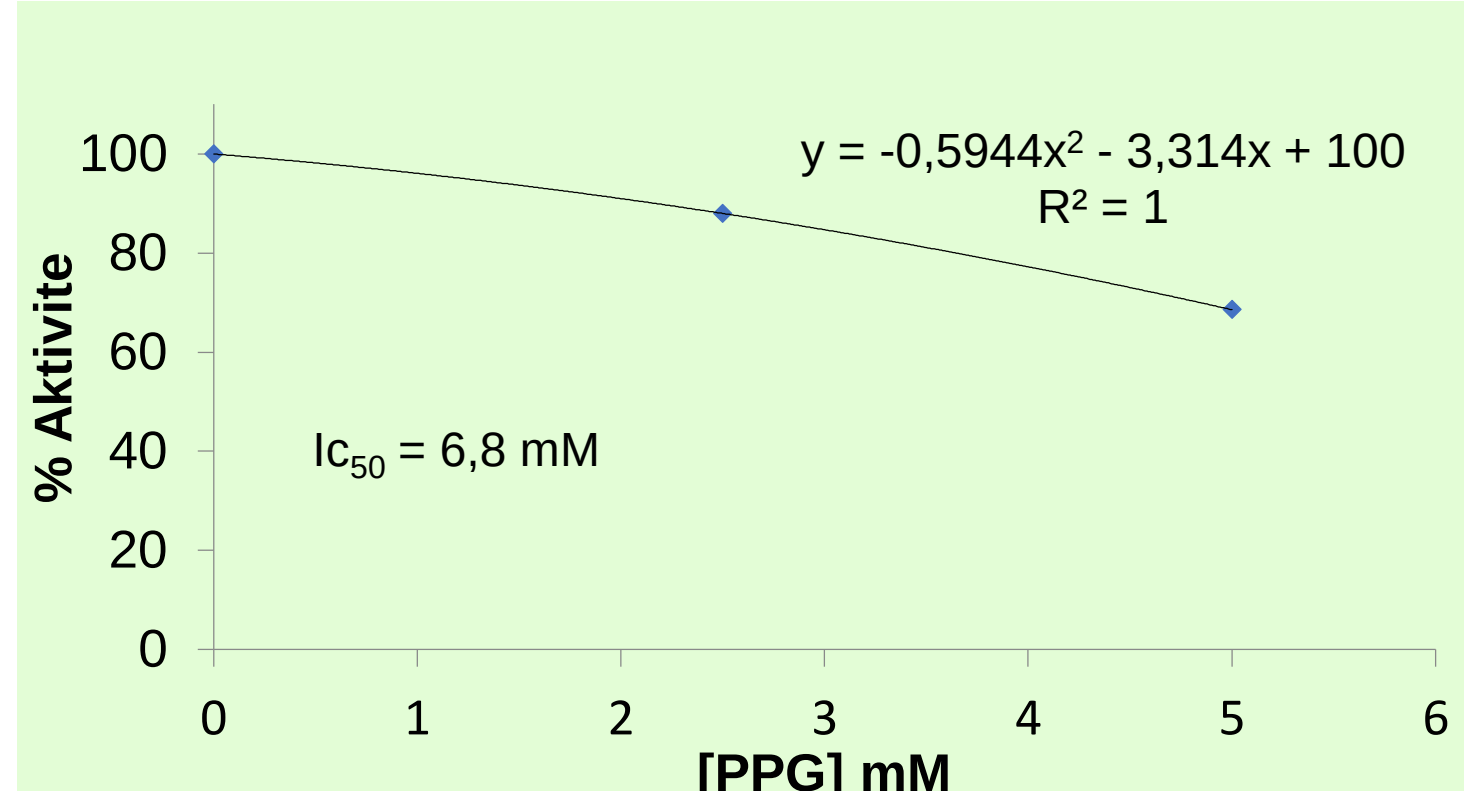
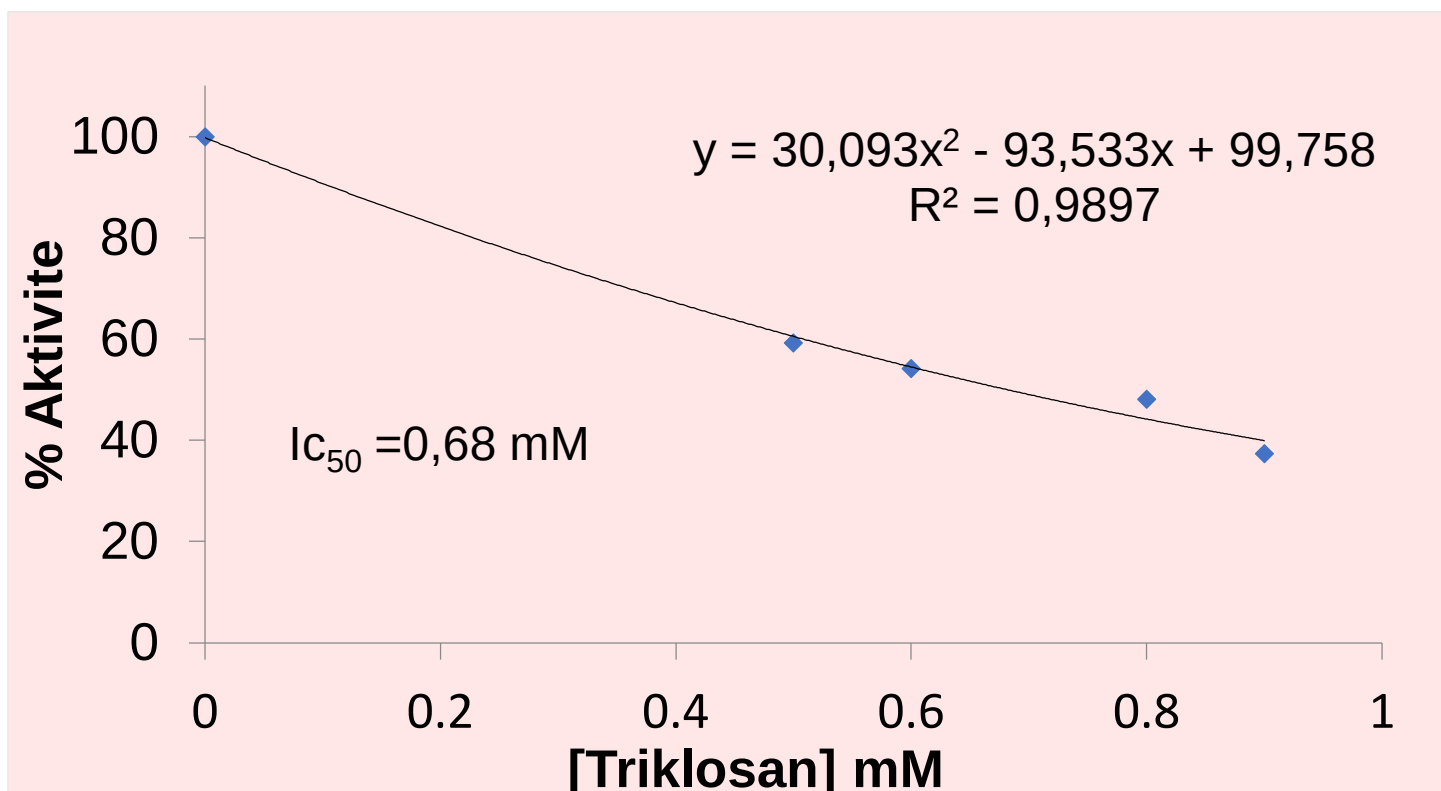
PON1 Enziminin Laktonaz Aktivitesinin Belirlenmesi

PON1 enziminin laktonaz aktivitesinin saptanması için substrat olarak gama-tiyobutirolakton kullanıldı. Enzimatik hidroliz sonucu oluşan bileşikler, 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile indikatör reaksiyonu sonucu elde edilen kompleksin absorbansı, spektrofotometrik olarak 412 nm tespit belirlendi. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında $13,6 \times 10^3 \text{ L}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ lik bir molar ekstinksiyon katsayısı kullanılacaktır.

İnhibitörlerin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Araştırmamızda, diş macunlarında kullanılan **triklosan, SDS ve polietilen glikol** bileşiklerinin PON1 enziminin laktonaz aktivitesi üzerindeki etkileri saptanacaktır. Bu amaçla ilk olarak inhibitörsüz ortamda PON1 laktonaz aktivitesi belirlenerek, elde edilecek değer %100 aktivite olarak kullanılacaktır. IC_{50} değerleri grafiklerden saptanmıştır.

DENEYSEL SONUÇLAR



SONUÇ VE ÖNERİLER

Diş macunlarında kullanılan triklosan, SDS ve propilen glikol bileşiklerin PON1 enzimi üzerinde belirli düzeyde inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır. Son yıllarda diş implantlarının uygulanması daha popüler hale gelmiştir. Yukarıda belirtildiği gibi implantlar biyofilm oluşumu için uygun bir yüzey oluşturmaktadır. Bu durum biyofilm oluşum riskini arttırmaktadır. Bu nedenle antibiyolfilm enzimlerinin aktivitelerinin önemi daha da artmaktadır. En önemli antibiyofilm enzimi olan PON1’in laktonaz aktivitesinin bu bileşikler tarafından inhibe edilmesi, biyofilm oluşum riskini daha da arttıracaktır. **Bu nedenle PON1 aktivitesini azaltmayan doğal bileşiklerin diş macunlarında kullanılmasının daha akılcı bir yaklaşım olduğu düşüncesindeyiz.**

KAYNAKÇA

<https://link.springer.com/article/10.1007/s12038-021-00234-7D>
Defoirdt, T. (2018). Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy. *Trends in Microbiology*, 26(4), 313–328
Aharoni, A., Gaidukov, L., Yagur, S., Toker, L., Silman, I., & Tawfik, D. S. (2004). Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(2), 482–487.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2536901100>
Deakin, S., Leviev, I., Gomarascchi, M., Calabresi, L., Franceschini, G., & James, R. W. (2002). Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 4301–4308.
Kosaka, T., Yamaguchi, M., Motomura, T., & Mizuno, K. (2005).