

Üreaz ve Elastaz Aktivitelerine Giresun'dan Toplanan *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh Deniz Yosununun İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi

Bahar BİLGİN SÖKMEN¹, Sinem AYDIN², Yasemin ŞAHİN¹, İhsan AKYURT²

¹Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Giresun, TÜRKİYE

²Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Giresun, TÜRKİYE

Sorumlu Yazar: bahar.sokmen@giresun.edu.tr

Geliş Tarihi: 02.11.2016

Kabul Tarihi: 25.11.2016

Özet

Üreaz (üre amidohidrolaz, E.C. 3.5.1.5.) ürenin amonyak ve karbondioksite hidrolizini katalizleyen nikel içerikli bir metaloenzimdir. Elastazlar (E.C. 3.4.21.36), bağ dokusunun önemli proteini olan elastini ayırma özelliğine sahip bir grup serin proteazlardır. Mevcut çalışmada, *Cystoseiraceae* ailesine ait *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh (*C. barbata*) deniz yosununun anti-üreaz ve anti-elastaz inhibisyon özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Ekstrenin anti-üreaz ve anti-elastaz aktivitelerinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 1,366 ± 0,003 µg/mL ve 0,0078 ± 0,004 µg/mL olarak bulundu. Anti-üreaz standardı olan tiyoürenin anti-üreaz IC₅₀ değeri 3,61 ± 0,799 µg/mL olarak saptanırken; anti-elastaz standardı olan ursolik asitin anti-elastaz IC₅₀ değeri 0,0392 ± 0,004 µg/mL olarak bulundu. Bu çalışma, *C. barbata* yosununun elastaz ve üreaz inhibitör araştırmaları ile ilgili ilk kayıttır. Çalışmada elde edilen sonuçlar, *C. barbata* yosununun alternatif bir anti-elastaz ve anti-üreaz kaynağı olarak kullanılabilceğini açıkça göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: *Cystoseira barbata*, Anti-elastaz aktivitesi, Anti-üreaz aktivitesi, inhibisyon.

Investigation of the Inhibition Effects of *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh Seaweed Collected from Giresun on Urease and Elastase Activities

Abstract

Ureases (urea amidohydrolase, E.C. 3.5.1.5.) are nickel-dependent metalloenzymes that catalyze the hydrolysis of urea to ammonia and carbon dioxide. Elastases (Porcine pancreatic elastase, E.C. 3.4.21.36) are a group of serine proteases that possess the ability to cleave the important connective tissue protein elastin. The available study was objected to determine anti-urease and anti-elastase inhibition properties of *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh (*C. barbata*) seaweed which belongs to *Cystoseiraceae* family. IC₅₀ values of anti-urease and anti-elastase activities of the extract were found as 1.366 ± 0.003 µg/mL and 0.0078 ± 0.004 µg/mL, respectively. Whereas IC₅₀ values of anti-urease of thiourea which is standard of anti-urease were detected as 3.61 ± 0.799 µg/mL, IC₅₀ values of anti-elastase of ursolic acid which is standard of anti-elastase is found as 0.0392 ± 0.004 µg/mL. This work out is the first record about elastase and urease inhibitory research on *C. barbata*. The data acquired in the study obviously shows that *C. barbata* seaweed might be utilise as an alternative anti-elastase and anti-urease source.

Key Words: *Cystoseira barbata*, Anti-elastase activity, Anti-urease activity, inhibition

Giriş

Üreaz (üre amidohidrolaz, E.C. 3.5.1.5.) ürenin amonyak ve karbondioksite hidrolizini katalizleyen nikel içerikli bir metaloenzimdir. Üreaz birçok bitki, alg, lifli mantar ve bakteride yer alır ve tabiattaki azot döngüsünde önemli bir rol oynar (Lubbers ve ark., 1996). Üreaz, diyaliz makinelerinde ürenin kandan uzaklaştırılması ve kandaki üre miktarının tayin edilmesi gibi klinik çalışmalarda ve atık sulardaki ürenin temizlenmesi işlemlerinde kullanılır (Krajewska, 2001).

Peptik ülser dünya çapında oldukça yaygın bir hastalıktır. Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl yaklaşık 1.000.000'dan fazla kişi peptik ülser rahatsızlığı nedeniyle tedavi altına alınmaktadır. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) midedeki mukus tabakası içerisinde bulunmaktadır. *H. pylori* üreaz enzimi salgılayarak üreyi amonyağa dönüştürür ve ürettiği amonyak ile kendini mide asidinin etkisinden korur (Özden, 2014).

Üreaz, böbrek taşları ve enfeksiyonların oluşmasına ayrıca hepatik komaya da neden olmaktadır (Mobley, 1995). Bu tür hastalıkların tedavisinde üreaz enzimini inhibe edebilecek üreaz inhibitörleri üzerinde çalışılmaktadır (Onodo ve ark., 1990). Son yıllarda bu amaç için çeşitli bitki ekstraktlarının üreaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri araştırılmaktadır (Heminga ve Duarte, 2000).

Elastazlar (E.C. 3.4.21.36), bağ dokusunun önemli proteini olan elastini ayırma özelliğine sahip bir grup serin proteazlardır. Elastazlar; omurgalı dokularında özellikle akciğer, arter, cilt ve ligamentlerinde bol bulunan ve önemli bir bağ dokusu proteini olan elastini parçalayabilme özelliğine sahip bir grup serin proteazdır. Bu proteazlar nötrofil elastaz (lökosit elastaz), pankreatik elastaz, makrofaj elastaz ve fibroblast elastazı içermektedir (Bode, 1989; Tsuji ve ark., 2001; Nenan ve ark., 2005).

Cildin esneklik ve sağlamlığından sorumlu olan dermis cildin orta tabakasında yer alır ve bağ dokusu elemanlarından oluşur. Bağ dokusunun ana elemanlarından olan elastin ve kollajen, elastaz ve kollajenaz enzimleri ile parçalanmaları sonucu cilt yaşlanmasına eşlik eden kırışıklıklar meydana getirmektedir (Şenol ve ark., 2016).

Elastaz aktivitesi yaş arttıkça artar ve bu durum yaşlanma ile cildin elastik özelliklerinin azalmasına ve cilt sarkmalarına neden olur (Robert, 2001). Bu enziminin inhibisyonu hem cilt yaşlanmasının önlenmesinde (Wiedow ve ark., 1990) hem de bağ

dokusu hastalıkları üzerinde olumlu etkileri olması nedeniyle son yıllarda dikkat çekmektedir (Siedle ve ark., 2007).

Kozmetik ürünlerinde bitkisel ekstratlar ve bu ekstratlerden elde edilen doğal bileşikler yoğun bir şekilde kullanılmakta ve kozmetik sanayinde ürün gruplarının klasik formülasyonlarına bitkisel içerikler ilave edilmektedir (Şenol ve ark., 2016).

C. barbata çok yıllık kahverengi bir alg türüdür. Kışın gelişimini durdurup dalcıklarını kaybederek soğuk dönemi uyku halinde atlatır. Dünya’da Akdeniz ve Atlantik kıyılarında, ülkemizde ise çevre açısından çok değerli ve zor bir yapıya sahip olan Karadeniz bölgesinde yaygın dağılım göstermektedir. (Minicheva ve ark., 2008).

Bu çalışmada, Giresun kıyılarından Aralık ayında toplanan esmer deniz yosunu olarak bilinen *C. barbata* deniz yosununun anti-ürez ve anti-elastaz aktiviteleri incelenmiştir. *C. barbata* deniz yosununun geri soğutucu altında elde edilen sulu ekstratın farklı konsantrasyonları hazırlanarak inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Materyal ve Metodlar

Çalışmamızda kullanılan yosun örneği, Giresun İli Espiye İlçesi Gülburnu Mevkii’nden 2010 yılı Aralık ayı içinde toplandı. Toplama işlemi 0-1 m derinlikten elle yapıldı. Yosunun türü Prof. Dr. Veysel Aysel tarafından teşhis edilmiştir. (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi). Bitki materyali destile suyla yıkanıp oda sıcaklığında kurutuldu ve geri soğutucu altında 30 dakika kaynatılarak sulu ekstratı hazırlandı (% 10 w/v). Whatman kağıdından (No.1) filtre edildikten sonra rotary evaporatörde düşük basınç altında 40-50 °C sıcaklıkta çözücüsü uzaklaştırılıncaya kadar buharlaştırıldı. Yosun ekstratının stok çözeltisi (1 mg/mL), dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak hazırlandı ve ekstrat inhibisyon çalışmalarında kullanılıncaya kadar +4 °C’de saklandı.

Anti-ürez Aktivite Yöntemi

Ürez inhibitör aktivitesi, Van Slyke ve Archibald metodundan yararlanılarak spektrofotometrik olarak tayin edildi (Van Slyke ve Archibald, 1944). Çalışmamızda, yosun ekstratının 4 farklı konsantrasyonda (0,001-1,0 µg/mL) olacak şekilde DMSO’deki çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan farklı konsantrasyondaki çözeltilerden 0,5’er mL alındı. Üzerine ürezin 100 mM 16 mg/mL fosfat tamponundaki

çözeltisinden (pH = 6,8) 0,5 mL ilave edildi. Bu karışım 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kontrol çözeltisi olarak 500 mM üre çözeltisinden (pH'ı 6,8 olan 100 mM fosfat tamponu içinde hazırlandı) 0,5 mL alındı. Üzerine 0,5 mL 16 mg/mL üreaz çözeltisi (pH'ı 6,8 olan 100 mM fosfat tamponu içinde hazırlandı) ilave edildi. Bu karışım 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnek ve kontrol çözeltilerin 1 mL'sinde 1 µg fenol kırmızısı içeren üre fosfat tamponu çözeltisinden (100 mM, pH = 6,8) 0,4 mL ilave edildi ve 570 nm'de kör deneye karşı absorbans değerleri okundu. Deneyle 3 kez tekrarlandı ve ortalaması alındı. Hazırlanan bitki ekstresinin üreaz enzimi üzerindeki % inhibisyon değerleri, aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{410 \text{ kontrol}} - A_{410 \text{ örnek}}) / A_{410 \text{ kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol}: Kontrol çözeltisinin 410 nm'de köre karşı absorbans değeri.

A_{örnek}: Yosun ekstresinin 410 nm'de köre karşı absorbans değeri.

Üreaz enziminin IC₅₀ değeri (Enzimin % 50 inhibisyon etkisi göstermesi için gerekli olan madde miktarı), absise konsantrasyon, ordinata % üreaz inhibisyon verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin lineer kesiminden elde edilen regresyon denkleminde hesaplandı.

Anti-elastaz Aktivite Yöntemi

Elastaz inhibitör aktivitesi Moon ve arkadaşlarının (2010) yöntemine göre spektrofotometrik olarak tayin edildi. Çalışmamızda DMSO ile farklı konsantrasyonlarda (0,00001-0,01 µg/mL) hazırlanan her bir bitki ekstresinden 50 µL alındı. Üzerine 0,2 M pH'ı 7,8 olan Tris-HCl tampon çözeltisinden 0,9 mL ilave edildi. Kontrol çözeltisine 50 µL enzim konuldu. Kör için enzim yerine aynı miktarda destile su kullanıldı. Kör, kontrol ve örnek çözeltileri 15 dakika 37 °C'de inkübe edildi. İlk inkübasyondan sonra bütün tüplere 5 mM 50 µL N-süksinil-ala-ala-ala-p-nitroanilit (STANA) ilave edildi ve 37 °C'de 30 dakika tekrar inkübe edildi. Örnek ve kontrol çözeltilerinin spektrofotometrede 410 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu. Yapılan çalışmada farklı konsantrasyonlarda hazırlanan yosun örneklerinin anti-elastaz

inhibisyon aktivitesi deneyleri 3 kez tekrarlandı ve % inhibisyon değerleri aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{410 \text{ kontrol}} - A_{410 \text{ örnek}}) / A_{410 \text{ kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} : Kontrol çözeltisinin 410 nm’de köre karşı absorbans değeri.

$A_{\text{örnek}}$: Örnek çözeltisinin 410 nm’de köre karşı absorbans değeri.

Elastaz enziminin IC_{50} değeri, absise konsantrasyon, ordinata % elastaz inhibisyon verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin lineer kesiminden elde edilen regresyon denkleminde hesaplandı.

Sonuçlar ve Tartışma

C. barbata yosununun ve anti-üreez standardın % inhibisyon ve IC_{50} değerleri Tablo 1’de verilmiştir. Buna göre ekstrenin anti-üreez IC_{50} değeri $1,366 \pm 0,003 \mu\text{g/mL}$; $1 \mu\text{g/mL}$ ekstre konsantrasyonundaki % inhibisyon değeri ise $43,58 \pm 0,417$ olarak saptandı. Anti-üreez standardı olan tiyoüenin anti-üreez IC_{50} değeri ise $3,61 \pm 0,799 \mu\text{g/mL}$ olarak saptandı.

Tablo 1. *C. barbata* ve standartın anti-üreez aktivite değerleri.

	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	% İnhibisyon*	Anti-üreez IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)*
<i>C. barbata</i>	0,001	$23,89 \pm 2,616$	$1,366 \pm 0,003$
	0,01	$27,37 \pm 1,485$	
	0,1	$34,94 \pm 3,571$	
	1	$43,58 \pm 0,417$	
Tiyöüre	0,001	$22,57 \pm 2,177$	$3,61 \pm 0,799$
	0,01	$26,32 \pm 1,638$	
	0,1	$29,44 \pm 1,976$	
	1	$30,694 \pm 0,646$	

*Değerler üç deneyin ortalamasıdır \pm standart sapma.

C. barbata yosununun ve anti-elastaz standardın % inhibisyon ve IC₅₀ değerleri Tablo 2’de verilmiştir. Ekstrenin anti-elastaz IC₅₀ değeri 0,0078 ± 0,004 µg/mL; 0,01 µg/mL ekstre konsantrasyonundaki % inhibisyon değeri 54,22 ± 7,524 olarak saptandı. Anti-elastaz standardı olan ursolik asidin IC₅₀ değeri ise 0,0392 ± 0,004 µg/mL olarak bulundu. Ekstre konsantrasyonu arttıkça anti-ürez ve anti-elastaz aktiviteleri de artmaktadır. Bir inhibitörün IC₅₀ değerinin düşük değerde olması, yüksek aktivite gösterdiğinin ifadesidir. Bu sonuçlara göre *C. barbata* ekstresinin hem anti-ürez hem de anti-elastaz standartlarından daha yüksek inhibisyon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 2. *C. barbata* ve standartın anti-elastaz aktivite değerleri.

	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon*	Anti-elastaz IC₅₀ (µg/mL)*
<i>C. barbata</i>	0,00001	30,7 ± 3,620	0,0078 ± 0,004
	0,0001	40,06 ± 1,294	
	0,001	46,04 ± 1,570	
	0,01	54,22 ± 7,524	
Ursolik Asit	0,00001	18,27 ± 1,203	0,0392 ± 0,004
	0,0001	21,24 ± 1,259	
	0,001	23,77 ± 0,502	
	0,01	28,03 ± 0,615	

*Değerler üç deneyin ortalamasıdır ± standart sapma.

Bağ dokuların ve tendonların elastik fiberlerinin çoğunluğu elastinden meydana gelmektedir. Tüm major konnektif doku matriksi proteinlerine saldırabilme yeteneğindeki anahtar enzim elastazdır. Elastaz inhibisyon deneyi gibi elastaz aktivitesini yavaşlatan bir metod, elastik fibrillerin bozulmasını kolaylaştırmak ve cildi yaşlanmaktan korumak için uygulanabilir (Azmi ve ark., 2014).

Son zamanlarda, yenilebilir bitkilerden izole edilen fitokimyasalların yeni biyolojik aktiviteleri ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Yenilebilir bitkiler, çeşitli biyolojik aktivite gösteren flavonoidler, vitaminler, terpenoidler, alkaloidler, organosülfürler, pigmentler ve diğer fenolik bileşikler gibi fitokimyasallar bakımından zengin kaynaklardır (Matsuraba, 2003). Örneğin; yeşil çay ekstresinde bulunan kateşinlerin *H. pylori* üreazını kuvvetle inhibe ettiği bildirilmiştir (Yang, 2010). Yapılan

bir diğer çalışmada ise dut yapraklarının yüksek anti-ürezaz aktivite gösterdiği ($IC_{50} = 72,81 \pm 15,60$) ifade edilmiştir (Dinç, 2009). Ürezaz inhibisyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada, *Epilobium angustifolium* yapraklarının sulu ekstresinde elastaz inhibisyon aktivitesi incelenmiş ve bitkinin iyi bir elastaz inhibitörü ($IC_{50} 42,72 \pm 2,38 \mu\text{g/mL}$) olduğu bulunmuştur (Onar ve ar., 2012). Diğer bir çalışmada, Jeju Adası'nda bulunan 263 çeşit bitkinin etil alkol ekstrelerinin elastaz inhibisyon aktivitesi incelenmiş ve bu bitkilerden *Cornus walteri* bitkisinin en yüksek elastaz inhibisyon aktivitesine ($IC_{50} = 26,1 \mu\text{g/mL}$) sahip olduğu bulunmuştur (Moon ve ark., 2010).

Yapılan literatür araştırmalarından farklı bitkilerin anti-ürezaz ve anti-elastaz aktiviteleri üzerine çalışmalar yapılmış olup, *C. barbata* yosununun bu konuyla ilgili herhangi bir çalışmasına rastlanmamıştır. Bu çalışma, *C. barbata* yosununun elastaz ve ürezaz inhibitör araştırmaları ile ilgili ilk kayıttır. Mevcut çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre, *C. barbata* yosun ekstresinin yaşlanma karşıtı kozmetiklere ve ürezaz inhibitörlerine aday olabileceği görüşüne varılmıştır.

Kaynaklar

- Azmi, N., Hashim, P., Hashim, D.M., Hallmoon N., Majid N.M.N. 2014. Anti-elastase, anti-tyrosinase and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity of earthworm extracts as potential new anti-aging agent. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine* 4: 348-352.
- Bode, W., Meyer, E., Powers, J. C. 1989. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: x-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* 28: 1951-1963.
- Dinç, Y. 2009. Ürezaz Enziminin Bazı Tıbbi Bitkiler Tarafından İnhibisyonu. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 90, İstanbul.
- Hemminga, M.A., Duarte, C.M. 2000. *Sea grass ecology*. Cambridge University Press. p. 1298.
- Krajewska, B., Zaborska, W., Leszko M. 2001. Inhibition of chitosan-immobilized urease by slow-binding inhibitors: Ni^{2+} , F^- and acetohydroxamic acid. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic* 14: 101-109.
- Lubbers, M.W., Rodrigues, S.B., Honey, N.K., Thornton, R.J. 1996, Purification and characterization of urease from *Schizosaccharomyces pombe*. *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 132-140.
- Matsubara, S., Shibata, H., Ishikawa, F., Yokokura, T., Takahashi, M., Sugimura, T., Wakabayashi, K. 2003. Suppression of *Helicobacter pylori* induced gastritis by green tea extract in mongolian gerbils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310: 715-719.
- Minicheva, G., Maximova, O.V., Moruchkova, N.A., Simakova, U.V., Shirshov, P.P., Sburlea, A., Dencheva, K., Aktan, Y., Sezgin, M. 2008. *State of the Environment of the Black Sea (2001-2006/7)*. Black Sea Commission Publications, 419 pp, İstanbul.
- Mobley, H.L.T., Island, M.D., Hausinger, R.P. 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological Review* 59: 451-480.
- Moon, J.Y., Yim, E.Y., Song, G., Lee, N.H., Hyun, C.G. 2010. Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants. *Eur Asian Journal of Bio Sciences* 4: 41-53.
- Nenan, S., Boichot, E., Lagente, V., Bertrand, C.P. 2005. Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 167-172.
- Onar, H.C., Yusufoglu, A., Türker, G., Yanardağ, R. 2012. Elastase, tyrosinase and lipoxygenase inhibition and antioxidant activity of an aqueous extract from *Epilobium angustifolium* L. leaves. *Journal of Medicinal Plants Research* 6: 716-726.

- Onado, Y., Takido, M., Magaribuchi, T., Iwasaki, H. 1990. Effects of 12-sulfodehydroabietic acid monosodium salt (TA2711), a new anti-ulcer agent, on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents and gastric mucosal defensive factors in rats. *Japanese Journal of Pharmacology* 52: 631-638.
- Özden A. 2014. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu tedavisinde alternatif tıp. *Güncel Gastroloji* 18: 219-225.
- Robert, L. 2001. Extracellular matrix and aging: a review of mechanisms and interventions. *Cosmet Toiletries Magazine* 116: 61-70.
- Siedle, B., Hrenn, A., Merfort, I., 2007. Natural compounds as inhibitors of human neutrophil elastase. *Planta Medica* 73: 401-420.
- Şenol, F.S., Orhan, İ.E., Göknel, Ö., Barut, A. 2016. Çeşitli *Citrus* (Narenciye) türlerine ait ekstraktlardan hareketle anti-aging kozmesötik formülasyonu geliştirilmesi-Vitabell. IV. Uluslararası Gıda Ar-Ge Proje Pazarı, İzmir, 24 Mayıs 2016.
- Tsuji, N., Moriwaki, S., Suzuki, Y., Takema, Y., Imokawa, G. 2001. The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: Implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochemical and Photobiology* 74: 283-290.
- Van Slyke, D.D.E., Archibald, R.M. 1944. Manometric, titrimetric and colorimetric methods for measurement of urease activity, *Journal of Biological Chemistry* 154: 623-642.
- Wiedow, O., Schröder, J. M., Gregory, H., Young, J.A., Christophers, E. 1990. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization and complete amino acid sequence. *Journal of Biological Chemistry* 265: 14791-14795.
- Yang, S. W., Ho, J. N., Lee, Y. H., Sin, D. H., Hong, B. S., Cho, H. Y. 2004. Isolation and characterization of *Helicobacter pylori* urease inhibitor from *Rubus coreanus*. *Journal of Korean Society Food Science and Nutrition* 33: 767-777.