

PARAOKSONAZ VE KLİNİK ÖNEMİ

Elif AZARSIZ¹, Eser Yıldırım SÖZMEN¹

PARAOXONASE AND CLINICAL IMPORTANCE

Summary: Paraoxonase (PON1, EC.3.1.8.1) is an enzyme that is able to hydrolyze paraoxon which is a potent inhibitor of the cholinesterases. Human serum contains a single enzyme with both paraoxonase and arylesterase activities. Purified arylesterase/paraoxonase is a glycoprotein with a minimal molecular weight of about 43-45 kDa which requires Ca^{+2} for both activity and stability. Serum levels are relatively stabil in time, but enzymatic activity changes 10-40 fold in individuals. Serum paraoxonase phenotype can be clearly distinguished on the basis of its distinctive ratio of paraoxonase to arylesterase activities. Serum PON activity has a polymorphic distribution which is related to two aminoacid substitution, Arg for Gln (R→Q) at position 192 and Met for Leu (M→L) at position 55. It's considered to be an antioxidant enzyme which has a protective role in LDL oxidation and atherosclerosis.

Key Words: Paraoxonase, polymorphism, CAD

Özet: Paraoksonaz (PON1, EC.3.1.8.1) kolinesterazların güçlü inhibitörü paraoksonu hidrolize edebilen bir enzimdir. İnsan serumunda paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesini birlikte içeren tek enzim bulunur. Saf arilesteraz/paraoksonaz yaklaşık 43-45 kDa moleküler ağırlıkta, aktivitesi ve stabilitesi için Ca^{+2} 'a ihtiyaç duyan bir glikoproteindir. Serum düzeyi zaman içinde stabil iken, aktivitesi bireyler arasında 10-40 kat değişiklik gösterir. Serum paraoksonaz fenotipi farklı paraoksonaz-arilesteraz oranlarına göre ayrılabilir. Serum PON aktivitesi pozisyon 192'de, Gln için Arg (R→Q) ve pozisyon 55'de Leu için Met (M→L) şeklinde iki aminoasit yer değişmesi ile ilişkili polimorfik dağılıma sahiptir. LDL oksidasyonu ve aterosklerozda koruyucu role sahip antioksidan etkili bir enzim olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Paraoksonaz, polimorfizm, KAH

GİRİŞ

Paraoksonaz (EC. 3.1.8.1), Aldridge sınıflama sistemine göre A grubu Arildialkilfosfataz (E.C 3.1.1.2) sınıfı bir ester hidrolaz enzimidir. Önceleri organofosfat bileşiklerini hidrolize etme özelliği nedeniyle toksikoloji alanında üzerinde çalışılan PON son yıllarda antioksidan etkileri nedeniyle güncellik kazanmıştır.

TARİHÇE

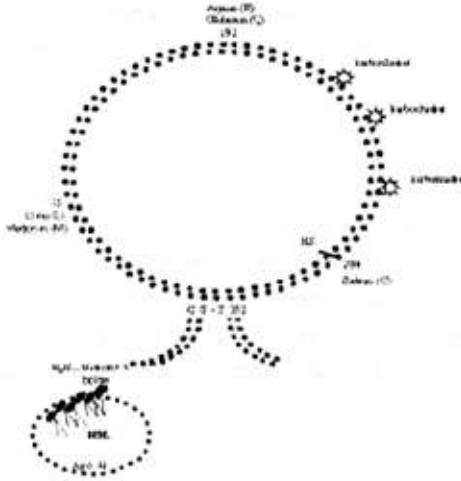
Paraoksonaz insan serumunda ilk olarak 1961'de Uriel (1) tarafından elektroforezden sonra HDL immunopresipitatlarında saptandı. Ardından, özellikle saflaştırılmış sığır serum paraoksonazının lipidlerle ilişkili olduğu ve HDL kompleksi ile aynı

moleküler kütesinin olduğu ileri sürüldü (2). Koyunlarda enzim aktivitesinin çoğu apo AI içeren partiküllerde HDL ile birlikte idi ve insan serumunun ultrasantrifüjlenmesi ile birlikte Mackness ve ark. (3) paraoksonazın kanda HDL yapısında taşındığını ortaya koydu. Son immunoafinite kromatografi çalışmaları, insan serum paraoksonazının gerçekte apo AI ve apo J içeren HDL tipleri ile ilişkili olduğunu ve paraoksonaz içeren HDL'nin total HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu gösterdi (4).

KİMYASAL YAPISI

PON1 43-45 kDa molekül ağırlığında glikozile bir protein olarak saflaştırılmıştır (5,6). Her molekül total ağırlığın %15.8'ini oluşturan üç karbonhidrat

zinciri içermektedir (6,7). İzoelektrik noktası 5.1'dir. 354 aminoasit içeren paraoksonazın üç boyutlu yapısı henüz aydınlatılamamıştır. Nükleotid diziliminde numaralandırma olgun proteinde bulunmamasına rağmen metiyonin ile başlar. Aminoasit bileşimi yüksek lösin içeriği dışında bir özellik göstermez (6). Yapısında yer alan üç sistein (Cys) kalıntısından 284'teki serbest iken diğer ikisi arasında (Cys 42-352) tek disülfid bağı bulunur (4,8,9). Serbest sisteinin substrat oryantasyonu ve bağlanması için gerekli olduğu saptanmıştır (şekil-1).



Şekil 1. PON1 enziminin yapısı

İnsan ve tavşan serum paraoksonazı N terminal hidrofobik (10) sonlanma nedeni ile diğer lipoproteinlere ve lipid içeren partiküllere sıkı bağlıdır (2,11,12). Bu hidrofobik bölge ile HDL' deki fosfolipidlere bağlandığı ortaya konmuştur. Apo A1, paraoksonazın fosfolipidlere bağlanması ve stabilizasyonunda rol alır.

Tavşan ve insan cDNA klonlarının nükleotid dizilimleri arasında %86, aminoasit dizilimleri arasında %85 benzerlik gösterilmiştir (4).

Enzim aktivitesi kalsiyuma bağımlıdır. Bu özellik, paraoksonazı Co^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} kullanan diğer A esteraz tipi enzimlerden ayırır. Kalsiyum direkt katalitik reaksiyonda yer alarak veya aktif alanın uygun konformasyonda tutulmasını sağlayarak aktif

alanın korunmasında görev alır. Ayrıca paraoksonun P=O bağı polarize ederek fosforun nükleofilik saldırıya yatkınlığını sağlar ve dietilfosfatın aktif alandan ayrılmasını kolaylaştırır (4). Josse ve ark. (13), E52 ve D53 aminoasitlerinin kalsiyumu bağladığını ve en az 20 aminoasit (histidin ve triptofan) ile yapıdaki disülfid bağı arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesi için esansiyel olduğunu ortaya koymuşlardır. Enzim aktivitesini ölçmede serum ya da EDTA'sız plazma gereklidir (9). İnsan serumu arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesi bulunan tek gen ürünü enzim içerir (6,14). Aktif bölgelerinin benzer olup olmadığı açık olmasa da kompetitif olmaları aynı aktif merkezin özelliklerinin paylaşıldığını gösterir (15).

SUBSTRATLARI

A esteraz aktivitesini belirlemek için en sık kullanılan substrat "paraokson" (O, O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat) olduğu için enzim böyle isimlendirilir (14). B allozim paraoksonu A allozime göre daha hızlı hidroliz ederken fenilasetata karşı her ikisi de benzer aktiviteye sahiptir (16) (şekil-2). Klorpirifokson da fenilasetat gibi ayırdedici substrat değildir (17). Okside fosfolipidler ile kolesterol esterlerin ana substratlar olduğu düşünülmesine karşın fizyolojik substrat tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (15). İnsan arter duvarı hücre kültürlerinde her iki allozimin okside 1-palmitil-2-araşidonoil-sn-glisero-3-fosforilkolin üzerine etkisi incelendiğinde paraoksonu hidroliz yeteneği çok farklı olmasına rağmen her ikisinin de aynı miktarda okside fosfolipid türlerini indirgediği (18), böylece HDL'nin LDL'i oksidasyondan koruyucu etkisinin paraokson hidroliz kapasitesinden bağımsız olduğu görülmüştür (19).

SENTEZ VE SEKRESYONU

HDL kolesterol düzeyinde iki cins arasında açık fark bulunmasına rağmen insan serum paraoksonazı yaşa ve cinsiyete bağlı aktivite değişikliği göstermez (20). Serum düzeyleri zaman içinde stabil iken,

enzimatik aktivite bireyler arasında 10-40 kat değişkenlik gösterir (4). Serum aktivitesi yenidoğan ve prematür yeni doğanlarda erişkin düzeyin yarısı kadardır. Erişkin düzeyine doğumdan bir yıl sonra ulaşılır ve yaşam boyunca aynı kalır. İnsanlarda karaciğerde sentez ve sekrete edilir. Enzim aktivitesi fetüs karaciğeri/dalağı ve erişkin karaciğerinde gösterilmiştir. Akciğer, beyin, pankreas ve plasentada bulunduğu yolunda kanıtlar varsa da henüz izole edilememiştir. Hayvanlarda özellikle karaciğer, böbrek, ince barsak ve plazmada bulunur (4). Serum PON1 düzeyleri diyet, akut faz proteinleri, gebelik, apo AI metabolizmasını etkileyen bozukluklardan etkilenir (21,22).

DİYET VE ÇEVRESEL FAKTÖRLERİN ETKİSİ

Apo E eksikliği gösteren farelerde kırmızı şarap ve polifenollerin (kuersetin, kateşin) PON aktivitesini artırdığı, sigaranın ise doz ve zamana bağımlı olarak PON aktivitesini inhibe ettiği ortaya konmuştur (8). Lipid oksidasyon ürünlerinden zengin diyetin serum PON aktivitesini ve LDL oksidasyonuna yatkınlığı değiştirip değiştirmeyeceği insanlarda henüz tam aydınlatılamamıştır; ancak Sutherland ve ark. (21), kullanılmış yağdan zengin diyetin tokluk serum PON/arilesteraz aktivitesini azalttığını, kullanılmamış yağ içeren diyetin ise ters etki yaptığını gösterdi. Koroner arter hastalığı (KAH) riski düşük olan sağlıklı orta yaşlı erkeklerde ılımlı alkol alımının PON aktivitesini artırdığı gösterildi; bu artış HDL düzeylerindeki ılımlı artış ile açıklanmaktadır (22). Blatter ve ark. (8) ise diyetin lipid içeriği gibi bazı dış etkilerin mikro çevreyi düzenleyerek lipoprotein partikülünde PON'un spesifik aktivitesini düzenlediğini saptadı.

GENETİK POLİMORFİZM

PON1 enzim aktivitesindeki polimorfizm substrat bağımlıdır ve farklı etnik kökenli populasyonlara göre değişkenlik gösterir. İlk olarak 1973'te Geldmacher von Mallinckrodt ve ark. (23) enzimin

genetik polimorfizm sergilediğine ve enzim aktivitesinin trimodal dağılım gösterdiğine dikkatleri çekti, 1976'da Playfer ve ark. (24) tarafından detaylı bulgular açıklandı. 1996'da tanımlanan paraoksonaz ile ilgili insan geni (HUMAPONA), en az üç ilişkili gen içeren multigen ailesinin bir üyesidir (PON1, PON2, PON3) (8,25). In situ hibridizasyon çalışmaları ile kromozom 7'nin uzun kolunda q21.3-22.1 bölgesinde PON1 geni haritalanmıştır (5,25,26). PON2 ve PON3 genine bitişik yerleşimlidir. Bunlardan sadece PON1 gen ürünü plazmada yer alırken, diğerlerinin gen ürünü hücre içi yerleşimlidir. PON1 polimorfizminin moleküler temeli iki aminoasit yer değiştirmesi ile ilişkilidir (10,26); a) 192. pozisyonda (veya 191) Gln için Arg (R→Q) b) 55. pozisyonda (veya 54) Leu için Met (M→L)

PON1 geni tek otozomal lokus üzerinde allel A (Q) ve B (R) olarak ifade edilir. A allel (A genotip/düşük aktiviteli izoenzim/Glu varyantı) pozisyon 192'de glutamin içeren paraoksonaz enzimini şifrelerken, B allel (B genotip/yüksek aktiviteli izoenzim/Arg varyantı) pozisyon 192'de arginin bulunan bir proteini şifreler (10,26,27). Her iki izoform Hardy Weinberg dengesindedir, böylece üç fenotip ve trimodal dağılım oluşur; en yaygın homozigot-AA (QQ), ikincisi heterozigot-AB (QR) ve en az olanı homozigot-BB (RR)'dir. R allelin kodladığı proteinin paraokson hidroliz aktivitesi Q allele göre sekiz kat yüksektir (10,19). Bu genetik polimorfizm serum protein konsantrasyonunu da etkiler. Homozigot BB bireyler homozigot AA'a göre daha yüksek enzim konsantrasyonuna sahiptir (4). Farklı populasyonlardaki polimorfik dağılım bireyler arasında varyasyona da neden olur (28). Polimorfizm arilesteraz aktivitesini etkilemez. Bu nedenle arilesteraz aktivitesi PON1 aktivitesindeki değişikliklerden bağımsız olarak asıl protein konsantrasyonunun göstergesi kabul edilebilir (16). 55. pozisyonadaki lösin yerine (L genotip) metionin (M genotip) gelmesi polimorfizmi etkilemez. Aktivite üzerine etkisi çok azdır.



PON1 allozimlerinin kantitatif ve kalitatif olarak farklı olduklarının keşfi ile fenotipleme metodları geliştirilmiştir. 1983'te, Eckerson ve ark. (5) iki izoenzimin tuz ve pH'a farklı yanıtlarını temel alarak iki fenotip tanımlamıştır; tuza yanıt veren B allozim paraoksona karşı daha yüksek enzim aktivitesine sahiptir. 1M NaCl varlığında ölçülen paraoksonaz aktivitesinin fenilasetat ile ölçülen arilesteraz aktivitesine

bölünmesi ile elde edilen oran, fenotip tanımlanmasında kullanılır. Paraoksonun yüksek aktiviteli enzim ile hidrolizi 1M NaCl ile stimüle edildiğinde düşük aktiviteli form inhibe olur. Bu analizde trimodal dağılım izlenir. Geniş-düşük aktivite piki "düşük aktiviteli homozigot-AA", daha küçük yüksek aktivite piki "heterozigot-AB" ve en küçük aktivite piki ise "yüksek aktiviteli homozigot-BB" bireyleri temsil eder.

Paraoksonaz polimorfik dağılımı büyük interetnik değişkenlik gösterir (tablo-I). Karakaya ve ark. (29) bu tipte trimodal dağılımı Türk populasyonunda da göstermiştir. Bizim çalışmamızda da Türk populasyonunda RR allel oldukça düşük bir oranda bulunmuştur (yayınlanmamış veri). Türklere R allel sıklığı doğu populasyonlarından düşük, Avrupa ırkına yakın değerler gösterir (28). Düşük aktivite Q allel Avrupa, Kanada ve Amerika'da yüksek, Avustralya Aborigin, Zambiya ve Zimbabve'de düşüktür. Avrupa populasyonlarında bimodalite ve %53 düşük aktivite izoformu izlenir ve Avrupa'dan uzaklaşılırdıkça bu oran azalır (30). Afrika'da ve doğularda dağılım unimodaldır, bu ırklarda düşük aktiviteli genotip saptanmamıştır. Kafkas kökenli İngiliz ve Hintlilerde PON aktivite sıklık dağılımının düşük ve yüksek aktivite allellerdeki dağılımlarla kıyaslanabilir bimodalite gösterdiği bulunmuştur (28).

Tablo I. PON1 enziminin farklı populasyonlardaki gen sıklığı

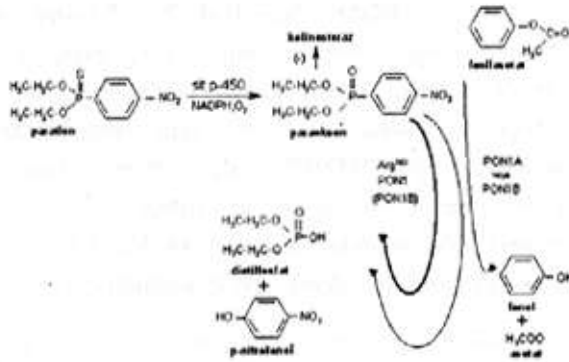
	Populasyon	R allel	Q allel	M allel	L allel
Karakaya ve ark. (29), 1991	Türk	0.37	0.63	--	--
Mackness ve ark. (36), 1995	İngiliz	0.38	0.62	0.28	0.72
Serrato ve ark. (46), 1995	Amerika	0.31	0.69	--	--
Antikainen ve ark. (48), 1996	Fin	0.26	0.74	--	--
Garin ve ark., (64), 1997	Kafkas	0.24	0.76	0.38	0.62
Sanghera ve ark. (47), 1997	Asya yerli	0.43	0.57	0.20	0.80
	Çin	0.58	0.42	0.96	0.04
Mackness ve ark. (18), 1997	İngiliz	0.38	0.62	0.57	0.43
Heijmans ve ark.(62), 1999	Hollanda	0.28	0.72	0.37	0.63
Cascorbi ve ark.(63), 1999	Alman	0.27	0.73	0.33	0.67
Aynacıoğlu ve ark. (28), 1999	Türk	0.31	0.69	0.28	0.72
Mackness ve ark. (54), 2000	İngiliz	0.33	0.67	--	--
	Fransız	0.24	0.76	--	--
Sözmen ve ark. , 2000	Türk	0.22	0.78	0.33	0.67

FONKSİYONEL ÖNEMİ

1. Hidrolitik aktivite; organofosfatlara karşı koruma:

PON1'in en iyi bilinen koruyucu fonksiyonu; organofosfat sinir ajanlarını, aromatik karboksilik asit esterlerini ve insektisidleri hidrolize etme yeteneğidir (şekil-2). Paraokson, asetilkolini yıkan kolinesterazların potent inhibitörüdür, ardışık nöron uyarılması ile sinaptik bileşelerde asetilkolin birikimine yol açar (4). Reaksiyonun daha çok tion ve oksonları detoksifiye edebilen glutatyon-s transferaz, monooksijenaz, paraoksonaz gibi enzimlerin yer aldığı karaciğerde olduğu düşünülür. Memelilerde karaciğerdeki detoksifikasyondan kaçan herhangi bir okson organofosfat etki alanına ulaşmadan önce kanda serum PON1 enzimi ile hidrolize edilebilir. PON1'in paraoksona etkisi ile oluşan hidrolitik ürünler paraoksonun kendisine göre göreceli olarak daha zararsızdır (4,8). PON eksikliği gösteren böcekler organofosfatlar için hedef organizmadır. Memelilere kıyasla kuşlarda organofosfat zehirlenmesine yatkınlık daha yüksek bulunmuştur, bu da kuşlarda serum PON1 enziminin tam yokluğuna bağlıdır. Benzer durum sürüngenler ve balıkların zehirlenmeye yatkınlığını açıklar. Saf insan serum PON1 enziminin pek çok organofosfat

bileşimini hidrolize ettiği gösterilmesine karşın in vivo insan organofosfat metabolizması ile ilişkisi tam bilinmemektedir (4). İnsanda düşük düzeydeki kronik maruziyetlerde enzimin katalitik aktivitesi daha etkindir. Aktivitede izlenen populasyon farklılıkları, organofosfat hidroliz hızlarındaki farklılık ile uyumludur ve bu da insanlarda seçici toksisiteyi etkileyebilmektedir (31). Organofosfatlara karşı koruma sadece enzimin kan ve dokuda bulunan düzeylerine değil, izoenzimlere de bağlıdır. B tip (R izozim) paraoksonu hidrolize etmede A tipten (Q izozim) birkaç kez daha etkindir; fakat organofosfatların çoğu B'ye göre A izozimi ile daha iyi hidrolize olabilir (9). Bu nedenle PON1'in koruyucu rolü değerlendirilirken düzeyinin yanısıra tipi de dikkate alınmalıdır (26).



Şekil 2. PON1 enzimi ve substrat hidrolizi

2. Oksidatif veya peroksidatif aktivite; LDL oksidasyonunun önlenmesi

1991'de Mackness grubu (32) heterozigot familial hiperkolesterolemi ve diabetli hastalarda genetik değişiklikten bağımsız olarak kontrolden düşük PON aktivitesi saptadı. Fish eye (33) ve Tangier hastalığı (34) olanlarda ise çok düşük, saptanamayacak düzeyde PON aktivitesi ile karşılaşıldı. Bu hastalıklarda ateroskleroz gelişimine yatkınlıktaki artış, yine PON-ateroskleroz ilişkisini ve olasılıkla HDL'nin anti-aterojenik özelliklerinde PON'un önemini ortaya koydu (32). Mackness (35); serum PON'un ateroskleroz sürecinin başlangıç evresi olan

LDL fosfolipidlerinin oksidasyonuna karşın korunmasında önemli olduğunu ilk gösteren araştırmacıdır. Serum HDL düzeylerinin koroner arter hastalığı insidansı ile ters ilişkili olduğu ve orta yaş üzerinde KAH olan olgularda LDL'den daha prediktif değere sahip olduğu bilinmektedir (36). Ateroskleroza karşı koruyucu etkisinde başlangıçta ters kolesterol transportundaki rolüne odaklanılmış, 1990'larda arter duvarında LDL'nin oksidatif modifikasyondan korunması ve ox-LDL'nin zararlı etkilerine karşı koruma gibi farklı antiaterojenik özelliklere sahip olduğu izlenmiştir (35,36,37,38). Mackness ve ark. (35) HDL'nin bakırla inkübe edilen LDL'de lipid peroksit oluşumunu %90 inhibe ettiğini; HDL'den saflaştırılan PON'un TBARS düzeylerini ve lipoperoksit oluşumunu önlediğini gösterdi. KAH'lı olguların plazmalarında lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı gösterilmiştir (39). DM ve KAH'lı olgulardan izole edilen LDL'nin normalden daha fazla oksidasyona yatkınlık gösterdiği bildirilmiştir (40). Watson (41) ve Navab (42) PON1'in LDL oksidasyonunu önleyerek inflamatuvar yanıtı bloke ettiğini gösterdi. Aynı grup akut faz reaksiyonu sırasında PON1 aktivitesinde belirgin kayıp olduğunu, böylece HDL'nin LDL'i oksidasyondan korumada yetersiz olduğunu saptadı (43). PON1'in LDL'nin yanısıra lipid peroksitlerin taşıyıcısı HDL'i de koruduğu, böylece makrofajlardan kolesterol çıkışındaki etkinliğini arttırdığı tanımlandı (15). HDL'deki PAF-AH, LCAT gibi diğer enzimlere göre PON'un lipid peroksitleri hidroliz etmede daha güçlü olduğu kanıtlandı (44).

PON1, lipid peroksitlerin yanısıra hidrojen peroksit üzerine de etkilidir. Aterogenez sırasında arter duvar hücrelerince üretilen major toksik oksijen metaboliti olan hidrojen peroksit, oksidatif koşullarda daha potent ürünlere dönüşerek LDL oksidasyonuna neden olur. PON'un ox-LDL'deki kolesteril linoleat hidroperoksitler ve hidroksitleri indirgemesi nedeni ile peroksidaz benzeri aktivitesi olduğu düşünülmektedir (15).



Deneysel çalışmalara göre PON1, KAH riskini, aterosklerotik lezyon ilerlemesinde gerekli proinflatuar molekülleri yıkarak azaltır (45). Genetik faktörlerin KAH ile ilişkisine dair pek çok kanıt mevcuttur (26). İlk kez Serrato ve ark. (46) bir HUMPONA gen varyantının KAH için risk faktörü olduğunu gösterdi. İnsan PON1 geninde kodon 192'de DNA polimorfizminin KAH riski ile birlikte olduğu gösterildi (46,47). Kafkas kökenli Kuzey Amerikalılarda düşük aktiviteli enzim varyantını gösteren bireylerde yüksek aktiviteli enzim varyantını taşıyan bireylere göre daha az aterojenik lipid ve lipoprotein profili izlendi (46). Daha sonra bu konuda çok çelişkili sonuçlar elde edildi. Sanghera ve ark. (47) B allelin beyaz ırk populasyonlarında KAH için bağımsız bir risk faktörü olduğunu bildirirken; Fin (48) ve Fransızlarda (49) böyle bir ilişki saptanamadı. Mackness ve ark. (16), B allelin KAH için bağımsız risk faktörü olduğunu ileri süren çalışmalarında iki allosimin LDL üzerindeki lipid peroksidlerin birikimini önleme yeteneğinde bireysel farklılık yaratan temel elemanlar olduğunu ortaya koydu. Mackness (18), A genotip ürünü PON içeren HDL'nin AB ve BB genotipine göre LDL'yi bakırla indüklenen oksidasyona karşı korumada daha etkili olduğunu gösterdi. PON AA homozigotlar LDL'yi oksidasyondan korumada daha etkindir, lipid peroksidleri metabolize etme aktivitesi yüksektir.

PON1 geninde tanımlanan 55. pozisyonda M→L polimorfizminin olası patofizyolojik etkisi araştırılmaktadır. Blatter ve ark. (50), NIDDM'li olgularda fenilasetata karşı iki varyantın plazma konsantrasyon ve aktiviteleri arasında anlamlı fark olduğunu ve L alleli için homozigotluğun KAH için bağımsız bir risk faktörü olduğunu gösterdi. Mackness ve ark. (18) bu polimorfizmin HDL'nin LDL'yi oksidasyondan korumadaki etkisinde MM varyantının en etkin ve bu bireylerin KAH gelişimine en az yatkın olduğunu gösterdi. Finli erkeklerde MM homozigotların LL homozigotlara göre 3 kat fazla MI riski taşıdığı saptandı (51).

PON2 geninde polimorfizmler de tanımlandı. İlk defa Sanghera ve ark. (52), Asya kökenli kişilerde bir olgu-kontrol çalışmasında PON2 geninin 310. pozisyonunda sistein yerine serin yer değiştirmesinin (C→S) KAH ile ilişkili olduğunu gösterdi. PON2*S sadece PON1*B alleli taşıyıcılarında olmak üzere KAH riski ile daha ilişkili idi. Benzer şekilde PON1*B allelinin varlığı ile uyumlu risk artışı sadece PON2*S taşıyıcılarında gözlemlendi. Bununla birlikte Mackness ve ark. (53), PON1 MM/QQ polimorfizminin LDL üzerinde lipid peroksid oluşumuna karşı en fazla korumayı sağlamalarına karşılık, pozisyon 310'da PON2 polimorfizminin HDL'nin LDL'yi oksidatif modifikasyona karşı korumada etkisinin olmadığını bildirdi. Hegele ve ark. (8), kodlanmış proteinde Ala-Gly değişimine yol açan genin 148 kodonunda genomik varyasyon tanımladı ve NIDDM'li bireylerde PON2 kodon 148 G/G homozigot bireyler diğer genotiplere göre anlamlı yüksek plazma glikoz düzeyleri gösterdi. PON1'de üç sistein kalıntısının aktif merkez olarak davranması gibi PON2'de de sisteinin katalitik aktivite için kullanılabileceği, sistein yerine serin geçmesi durumunda serinin oksidatif hasarın önlenmesini inhibe edebileceği düşünüldü (52).

NIDDM'li olgular ile yapılan bazı olgu-kontrol çalışmalarında PON1-192RR ve PON1-55LL genotipleri daha sık izlendi (36,50). Diabetik retinopati ve hipertansiyon gelişen olgularda izlenen düşük serum PON1 aktivitelerinin lipid peroksidasyonuna artmış yatkınlıktan kaynaklandığı belirtildi (54, 55).

3. Lipopolisakkarid inaktivasyonu; bakteriyel endotoksinlere karşı koruma

Paraoksonazın buraya kadar ortaya konan fonksiyonlarının doğal fonksiyonları olmadığı düşünülmektedir. Çünkü organofosfat bileşikleri doğada bulunmayan sentetik maddelerdir ve paraoksonazın bu maddeleri hidroliz etmesi tamamen tesadüfidir. PON1 enziminin Ox-LDL üzerine

etkisinin organik fosfatlarla fosfolipidlerdeki bağların yapısal benzerliğinden kaynaklandığı düşünülürse, gerçek substratının farklı olması gereği ortaya çıkar. İnsan serumunda HDL'de bulunan bir proteinin bakteriyel lipopolisakkaridi inaktive ederek endotoksemik semptomları önlediği yirmi yıl önce saptandı. Lipopolisakkarid inaktivasyonu immunolojik olmaktan çok enzimatik bir reaksiyonu ve gerekli enzim serin esteraz değildi. Sorumlu enzimin PON1 olduğu yeni saptandı (34). PON1 bakteriyel lipopolisakkaridi lipid A molekülündeki 4' fosfat üzerine fosfataz etkisi ile hidrolize eder. HDL'nin bir subfraksiyonu olan Tripanolitik faktör (TLF) "Trypanosoma brucei brucei" e sitotoksiktir ve apo AI, PON, haptoglobülin ile ilişkili bir proteindir. Lizozomal pH'ta aktive olan PON'un peroksidaz aktivitesi olduğu düşünülmektedir (51). HDL kompleksinin endotoksin toksisitesine karşı koruyucu olduğu bilinmektedir. Gram (-) bakteriyel enfeksiyon sırasında endotoksemi gelişimine karşı korumayı bir ölçüde sağlar. Bazı bilinmeyen yollarla makrofaj hücre yüzeyindeki spesifik bağlayıcı protein (Cd14) ile bakteri yüzeyinden köken alan lipoprotein polisakkaridin etkileşimini önler; bu şekilde TNF α , IL-1, IL-6 gibi sitokin salınım kaskadının başlaması önlenmiş olur. PON1 tip ve düzeyinin bireylerin endotoksinlere karşı direnç ve sensitivitesinde fark yaratıp yaratmadığı sorusu hala açıklığa kavuşturulamamıştır.

ÇEŞİTLİ HASTALIKLARDA PON1 AKTİVİTESİ

Pilorik stenozlu bebeklerde düzeltme cerrahisi sonrasında bir hafta yüksek serum PON aktivitesi gözlenmiştir (4).

Kronik hastalığı olan Japonlarda ve bir başka çalışmada sistemik amiloidozda düşük PON aktivitesi bildirilmiştir (4).

Tavşan inflamasyon modelinde izlenen serum amiloid A ve seruloplazmin içeren akut faz HDL

artışı, apo AI, PON1 ve PAF-AH'ta belirgin azalma gösterilmiştir. Bu değişikliklerden HDL'nin antiinflamatuvar/antioksidan kompleksten proinflamatuvar/ prooksidan komplekse dönüşümü sorumlu tutulmuştur (4).

Patogenezinde lipid peroksidasyonu ve oksidatif hasar sonucu gelişen nöronal dejenerasyon olduğu bilinen Alzheimer hastalığının ateroskleroz ile ilişkisi bilindiğinden PON polimorfizmi yönünden incelenmiş, ancak istatistiksel anlamlı sonuç bulunamamıştır (56).

PON1 organofosfatlar dışında bazı ilaçlara substrat gibi davranabilir. Örn; PON1 proilaç antibiyotik prulifloksasini aktif antibiyotiğe çevirmede önemlidir (4).

Yüksek ateroskleroz riski altında bulunan üremik-böbrek transplantlı olgularda düşük PON/HDL ve PON/apo AI oranları izlenmiş ve bu olgularda HDL'nin antioksidan kapasitesinin azaldığı sonucuna varılmıştır (57).

Sporadik idiyopatik Parkinson hastalığında PON1 ile metabolize olan çevresel nörotoksinlerin yaşla birlikte ilerleyen nörodejenerasyondan sorumlu olabileceği ve B allelin hastalığa genetik yatkınlık oluşturabileceği ileri sürülmüştür (58).

Güney Asya kökenli PON2 A148/A148 homozigot yenidoğanlarda ileri yaşlarda koroner kalp hastalığı ile ilişkilendirilen düşük doğum kilosu ile korelasyon izlenmiştir (59).

Antikardiolipin antikorları pozitif bulunan bir grup hastada modifiye LDL'e karşı otoantikorların arttığı, PON1 aktivitesinin belirgin olarak düştüğü ve arteriel tomboz geliştirme riski yüksek olan R genotipin artma eğiliminde olduğu izlenmiştir (60).

Organofosfat pestisidlerine kronik maruz kalan Arg192 homo/heterozigot Çinli erkeklerde üreme ile ilgili fonksiyonların daha fazla etkilendiği izlenmiştir (61).



SONUÇ

HDL yapısında fosfolipidlere bağlı olarak bulunan PON1 enziminin LDL'yi ve HDL'yi oksidasyondan koruyarak ateroskleroza önlediği kesin olarak ortaya konmuştur. Son yıllardaki çalışmalara göre farklı PON1 genotiplerinin ateroskleroza önlemedeki rolleri hala tartışmalı olmakla birlikte QQ-düşük aktivite genotipine sahip bireylerin ateroskleroz riskinin daha düşük olduğu giderek daha çok kabul görmektedir. PON1 konusunda giderek artan yayınlara karşın hala pek çok konu araştırılmayı beklemektedir; PON1 aterosklerotik lezyonda okside lipidleri hidroliz edebilir mi, aterosklerotik lezyona PON1 uygulanması hasarı geri döndürebilir mi, diyet ya da diğer etkenlerle PON1 aktivitesini arttırmak mümkün müdür? Bu arada PON2 ve PON3 gen ürünlerinin rolü de hala bilinmemektedir.

KAYNAKLAR

1. Uriel, A. (1961) Characterisation des cholinesterases et d'autres esterases carboxylique apres electrophorese et immunoelectrophorese en gelose, I; applications a l'etude des esterases du serum humain normal. *Am Insttit Pasteur*. 101, 104
2. La Du, BN., Adkins, S., Kuo, CL., Lipsig, D. (1993) Studies on human serum paraoxonase/arylesterase. *Chem Biol Interactions*. 87, 25-34
3. Mackness, MI., Hallam, S., Peard, T., Warners, S., Walker, CH. (1985) The separation of sheep and human serum "A" esterase activity into the lipoprotein fraction by ultrasentrifugation. *Comp Biochem Physiol B*. 82(4), 675-7
4. Mackness, MI., Mackness, B., Durrington, PN., Connely, PW., Hegele, RA. (1996) Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Cur Opin Lipid*. 7, 69-76
5. Eckerson, HW., Romson, J., Wyte, C., La Du, BN. (1983) The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am J Hum Genet*. 35(2), 214-27
6. Gan, KN., Smolen, A., Eckerson, HW., La Du, BN. (1991) Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos*. 19(1), 100-6
7. Holvoet, P., Perez, G., Zhao, Z., Brouwers, E., Bernar, H., Collen, D. (1995) Malondialdehyde-modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease. *J Clin Invest*. 95, 2611-2619
8. Laplaud, PM., Dantoine, T., Chapman, MJ. (1998) Paraoxonase as a risk marker for cardiovascular disease: facts and hypotheses. *Clin Chem Lab Med*. 36(7), 431-441
9. La Du, BN., Aviram, M., Billecke, S., Navab, M., Primo-Parmo, S., Sorenson, RC., Standiford, TJ. (1999) On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact*. 119-120, 379-388
10. Adkins, S., Gan, KN., Mody, M., La Du, BN. (1993) Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: Glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet*. 52, 598-608
11. Mackness, MI., Arrol, S., Abbott, C., Durrington, PN. (1993) Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*. 104, 129-135
12. Sorenson, RC., Bisgaier, CL., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S., La Du, BN. (1999) Human serum PON/arylesterase's retained hydrophobic N terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids. *Thromb Vasc Biol*. 19, 2214-2225
13. Josse, D., Xie, W., Masson, P., Lockridge, O. (1999) Human serum paraoxonase (PON1); identification of essential aminoacid residues by group selective labelling and site-directed mutagenesis. *Chem Biol Interact*. 119-120, 71-8.
14. Eckerson, HW., Wyte, CM., La Du, BN. (1983) The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet*. 35(6), 1126-38
15. Aviram, M., Rosenblot, M., Bisgaier, CL., Newton, RS., Primo-Parmo, SL., La Du, BN. (1998) Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*. 101(8), 1581-1590
16. Mackness, MI., Arroll, SI., Mackness, B., Durrington, PN. (1997) Alloenzymes of paraoxonase

- and effectiveness of high density lipoproteins in protecting low density lipoprotein against lipid peroxidation. *The Lancet*. 349, 22
17. Furlong, CE., Richter, RJ., Seidel, SL., Motulsky, AG. (1988) Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/ arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifosoxon and paraoxon. *Am J Hum Genet*. 43, 230-238
 18. Mackness, B., Mackness, MI., Arrol, S., Turkie, W., Durrington, PN. (1998) Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *Febs Lett.* 423, 57-60
 19. Cao, H., Globa, AGI., Berthezene, F., Moulin, P. (1999) Paraoxonase protection of LDL against peroxidation is independent of its esterase activity towards paraoxon is unaffected by the Q→R genetic polymorphism. *J Lipid Res*. 40, 133-139
 20. Geldmacher, MM., Diepgen, TL., Duhme, C., Hommel, G. (1983) A study of the polymorphism and ethnic distribution differences of human serum paraoxonase. *Am J Phys Anthropol*. 62(3), 235-41
 21. Sutherland, WHF., Walker, RJ., Jong, SA., Van Rij, AM, Phillips, V. (1999) Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*. 19, 1340-1347
 22. Van der Gaag, MS., Van Tol, A., Scheek, LM., James, RW., Urgert, R., Schaafsma, G., Hendriks, HFJ. (1999) Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet controlled, randomised intervention study in middle aged man. *Atherosclerosis*. 147, 405-410
 23. Geldmacher, MM., Hommel, G., Dumbach, J. (1979) On the genetics of the human serum paraoxonase. *Hum Genet*. 50(3), 313-26
 24. Playfer, JR., Eze, LC., Bullen, MF., Evans, AP. (1976) Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity. *J Med Genet*. 13, 337-342
 25. Schmiegelow, K., Eiberg, H., Tsui, LC., Buchwald, M., Phelan, PD., Williamson, R., Warwick, W., Niebuhr, E., Mohr, J., Schwartz, M. (1986) Linkage between the loci for cystic fibrosis and paraoxonase. *Clin Genet*. 29 (5), 374-7
 26. Humbert, R., Adler, DA., Disteché, CM., Hassett, C., Omiecinski, CJ., Furlong, CE. (1993) The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet*. 3(1), 73-6
 27. Eiberg, H., Mohr, J. (1981) Genetics of paraoxonase. *Ann Hum Genet*. 45(4), 323-30
 28. Aynacıoğlu, AS., Cascorbi, I., Mrozikiewicz, PM., Nacak, M., Tapanyığıt, EE., Roots, I. (1999) Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population. *Toxicol and Appl Pharmacol*. 157, 174-177
 29. Karakaya, A., Suzen, S., Sardas, S., Karakaya, AE., Vural N. (1991) Analysis of the serum paraoxonase/ arylesterase polymorphism in a Turkish population. *Pharmacogenetics*. 1, 58-61
 30. Mackness, MI., Durrington, PN. (1995) HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*. 115, 243-253
 31. Mackness, MI., Arrol, S., Durrington, PN. (1991) Substrate specificity of human serum paraoxonase. *Biochem Society Transact*. 19, 304s
 32. Mackness, MI., Harty, D., Bhatnagar, D., Winocour, PH., Arrol, S., Ishola, M., Durrington, PN. (1991) Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 86, 193-199
 33. Mackness, MI., Walker, CH., Carlson, LA. (1987) Low A-esterase activity in serum of patients with fish-eye disease. *Clin Chem*. 33(4), 587-8
 34. Mackness, MI., Peuchant, E., Dumon, MF., Walker, CH., Clerc, M. (1989) Absence of "A" esterase activity in the serum of a patient with Tangier disease. *Clin Biochem*. 22(6), 475-8
 35. Mackness, MI., Arrol, S., Durrington, PN. (1991) Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein. *FEBS Lett*. 286(1-2), 152-154
 36. Mackness, MI., Durrington, PN. (1995) Paraoxonase: another factor in NIDDM cardiovascular disease. *Lancet*. 346(30), 856
 37. Rousselot, DB., Therond, P., Beaudeau, JL., Peynet, J., Legrand, A., Delattre, J. (1999) High density lipoproteins and the oxidative hypothesis of atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med*. 37(10), 939-948



38. Stein, O., Stein, Y. (1999) Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis*. 144, 285-301
39. Liu, K., Cuddy, E., Pierce, GN. (1992) Oxidative status of lipoproteins in coronary disease patients. *Am Heart J*. 123, 285-290
40. Regnström, J., Nilsson, J., Tornvall, P., Landou, C., Hamsten, A. (1992) Susceptibility to low density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet*. 339(8803), 1183-1186
41. Watson, AD., Berliner, JA., Hama, SY., La Du, BN., Fauli, KF., Fogelman, AM., Navab M. (1995) Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*. 96, 2882-2891
42. Navab, M., Hama-Levy, S., Van Lenten, BJ., Fonarow, GC., Cardinez, CJ., Castellani, LW., Brennan, ML., Lusa, AJ., Fogelman, AM. (1997) Oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/PON ratio. *J Clin Invest*. 99(8), 2005-2019
43. Van, LB., Hama, SY., Beer, FC., Stafforini, DM., Mclyntyre, TM., Prescott, SM., La Du, BN., Fogelman, AM., Navab M. (1995) Anti inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. *J Clin Invest*. 96, 2758-67
44. Durrington, PN., Mackness, B., Mackness, MI. (1999) Role of HDL in preventing atherogenic modification of LDL. *Atherosclerosis*. 146(suppl), 813
45. Heinecke, JW., Aldons, JL. Paraoxonase gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis? *Elektronik yayın*
46. Serrato, M., Marian, AJ. (1995) A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary heart disease. *J Clin Invest*. 96, 3005-3008
47. Sanghera, DK., Saha, N., Aston, CE., Kamboh, MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17, 1067-1073
48. Antikainen, M., Murtomaki, S., Syvanne, M., Pahlman, R., Tahvanainen, T., Jauhiainen, M., Frick, MH., Ehnholm, C. (1996) The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest*. 98(49), 883-885
49. Herrmann, SM., Blanc, H., Poirier, O., Arveiler, D., Luc, G., Evans, A., Vidal, PM., Bard, JM. (1996) The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM study. *Atherosclerosis*. 126, 299-303
50. Blatter-Garin, M., James, RW., Dussoix, P., Blanche, H., Passa, P., Frougel, P., Ruiz, J (1997) Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J. Clin Invest*. 99(1), 62-66,
51. Salonen, JT., Malin, R., Tuomainen, TP., Nyssönen, K., Lakka, TA., Lehtimäki, T. (1999) Polymorphism in high density lipoprotein paraoxonase gene and risk of acute myocardial infarction in men: prospective nested case-control study. 319, 487-489
52. Sanghera, DK., Christopher, EA., Saha, N., Kamboh, MI. (1998) DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet*. 62, 36-44
53. Mackness, B., Durrington, PN., Mackness, MI. (1999) Polymorphisms of paraoxonase genes and low density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet*. 353(6), 468-469
54. Mackness, B., Durrington, PN., Abuashia, B., Boulton, AJM., Mackness, MI. (2000) Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Science*., 98, 355-363
55. Sözmén, B., Delen, Y., Girgin, FK., Sözmén, EY. (1999) Catalase and paraoxonase in hypertensive Type II diabetes mellitus: correlation with glycemic control. *Clin Biochem*. 32(8), 423-427

56. Sodeyama, N., Yamada, M., Itoh, Y., Suematsu, N., Matsushita, M., Otomo, E., Mizusawa, H. (1999) No association of paraoxonase gene polymorphism with atherosclerosis or Alzheimer's disease. *Neurology*. 53, 1146-1148
57. Paragh, G., Asztalos, L., Seres, I., Balogh, Z., Loscey, L., Karpati, I., Matyus, J., Katona, E., Harangi, M., Kakuk, G. (1999) Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney-transplanted patients. *Nephron*. 83(2), 126-131
58. Kondo, I., Yamamat, M. Genetic polymorphism of paraoxonase-I and susceptibility to Parkinson's disease. (1998) *Brain Res*.28(9),271-3
59. Busch, CP., Ramdath, DD., Ramsewak, S., Hegele, RA. (1999) Association of PON2 variation with birth weight in Trinidadian neonates of South Asian ancestry. *Pharmacogenetics*. 9(3), 351-6
60. Lambert, M., Boullier, A., Hachulla, E., Fruchart, JC., Teissier, E., Hatron, PY., Duriez, P. (2000) Paraoxonase activity is dramatically decreased in patients positive for anticardiolipin antibodies. *Lupus*. 9(4), 299-300
61. Padungtod, C., Niu, T., Wang, Z., Savitz, DA., Christiani, DC., Ryan, LM., Xu, X. (1999)
62. Paraoxonase polymorphism and its effect on male reproductive outcomes among Chinese pesticide factory workers. *Am J Ind Med*. 36(3), 379-87
63. Heijmans, BT., Westendorp, RGJ., Lagaay, AM., Knook, DL., Kluft, C., Slagboom, PE. (1999) Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis*. 149: 91-97
64. Cascorbi, I., Laule, M., Mrozikiewicz, PM., Andel, C., Baumann, G., Roots, I., Stangl, K. (1999) Mutations in the human paraoxonase 1 gene: frequencies, allelic linkages and association with coronary artery disease. *Pharmacogenetics*. 9(6): 755-61
65. Garin, MCB., James, RW., Dussoix, P., Blanche, H., Passa, P., Frougel, P., Ruiz J. (1997). Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. *J Clin Invest*. 99:62-66