

# Paraoksonaz ve Aril Esteraz Aktivite Ölçümlerinin Standardizasyonu

## [The Standardization of Paraoxonase and Arylesterase Activity Measurements]

Funda Gülcü<sup>(1)</sup>  
M. Ferit Gürsu<sup>(1)</sup>

(1) Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya  
Anabilim Dalı

**Yazışma Adresi**  
[Correspondence Address]

Doç.Dr.M.Ferit Gürsu  
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı 23119 ELAZIG  
Tel: +90 0424 2333555  
Faks: +90 0424 2388096  
E-mail: fegursu@yahoo.com

Kayıt tarihi 20 Şubat 2003; kabul tarihi 28 Mayıs 2003  
[Received 20 February 2003; accepted 28 May 2003]

### ÖZET

Bu çalışma; paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktivitesi ölçümlerinde karşılaşılan sorunların giderilmesine yönelik en uygun koşulların saptanması amaçlanmaktadır. Paraoksonaz ölçümü, substrat olarak kullanılan paraoksonun enzimatik hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenolün spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Arilesteraz ölçümünde ise substrat olarak fenil asetat kullanılmakta ve oluşan fenol spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Aktivite ölçümlerinde saptanan en uygun koşullar şunlardır:

1. Paraoksonaz ve arilesteraz ölçümleri hemolizli ve EDTA'lı plazmada çalışılmamalıdır.
2. Paraoksonaz aktivitesi ölçümünde substrat olarak kullanılan paraokson çözeltisi günlük hazırlanmalı ve çözücü olarak aseton kullanılmalıdır.
3. Substrat çözeltisi içerisinde 2 mM kalsiyum klorür ve 2 mM Paraokson bulunmalıdır.
4. Paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi ölçümü için optimal pH 8 olarak bulunmuştur.
5. Paraoksonaz ölçümü için dalga boyu 412 nm, arilesteraz için ise 270 nm olmalıdır.
6. Aktivite ölçümü azalan absorbans üzerinden yapıldığı için örnekler 37 °C'de 5 dakika izlenmelidir. Paraoksonaz ve arilesteraz enzimleri yakın bir gelecekte çok çalışılan enzimler olacağından ölçümlerde bu stabilitenin sağlanması faydalı olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Paraoksonaz, Arilesteraz, Paraokson, Fenilasetat, 4-nitrofenol.

### ABSTRACT

The aim of this present study is to solve the problems that are seen in the measurements of paraoxonase and arylesterase activities. The measurement of paraoxonase depends on the spectrophotometric measurement of 4-nitrophenol formed from the enzymatic hydrolysis of paraoxon. Phenylacetate is used as substrate in arylesterase measurement and phenol is measured spectrophotometrically. Optimum conditions to measure the enzyme activities are in following:

1. Paraoxonase and arylesterase measurements should not be studied in the plasma with EDTA and haemolysed plasma.
2. The paraoxon solution used in the measurement of paraoxonase activity should be prepared daily and it has to use acetone as solvent.
3. The substrate solution should include 2 mM calcium chloride and 2 mM paraoxon.
4. The optimum pH is 8 for paraoxonase and arylesterase activity measurements.
5. The paraoxonase measurement could be done in 412 nm and arylesterase activity in 270 nm.
6. Absorbance decreased with time during the activity measurement; therefore the activities should be followed for 5 minutes in 37°C. Paraoxonase and arylesterase take great interest and it is likely to be studied many times recently; therefore, it will be very useful to obtain this stability.

**Key Words:** Paraoxonase, Arylesterase, Paraoxon, Phenylacetate, 4-nitrophenol.

## GİRİŞ

Paraoksonaz (PON) (arildialkil fosfataz, [EC 3.1.8.1]) karaciğerde sentezlenen, organik fosforlu bir insektisit olan parationun aktif metaboliti paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip bir serum esterazdır (1,2). Enzim, paration dışında diizopropil florofosfat (DFP) gibi organik fosforlu insektisitlerle, yine aynı kimyasal gruptan olan sarin, tabun gibi sinir gazlarının; çeşitli karbamatların; fenilasetat, 4-nitrofenil asetat, 2-naftil asetat gibi birçok aromatik karboksilik asit esterlerinin hidrolizini de katalize etmektedir. Bununla birlikte, PON'un doğal substratı kesin olarak belli değildir. İnsan serum paraoksonazı (PON1) 43 kDa molekül ağırlığında 354 aminoasitlik bir protein olup, fiziksel olarak HDL ile bağlantılıdır (3,4). PON'un başlıca iki fonksiyonu bulunmaktadır: Bir pestisid olan paraokson gibi organofosfatlı bileşiklerin detoksifikasyonuna katılmak ve ayrıca lipit peroksitleri hidrolize ederek LDL'yi oksidasyondan korumak (5). PON1'in lipit peroksitlerin yanısıra hidrojen peroksit üzerine de etkili olup, peroksidaz benzeri aktiviteye de sahip olduğu düşünülmektedir. Ayrıca lipopolisakarid inaktivasyonu yolu ile bakteriyel endotoksinlere karşı koruma sağlamaktadır.

PON1 aktivitesi genetik olarak belirlenmektedir. PON1'de biri 55. pozisyonda (metiyonin/lösin, M/L), diğeri ise 192. pozisyonda (arjinin/glutamin, R/Q) olmak üzere iki aminoasit polimorfizmi bulunmaktadır (6). Proteinin 192. pozisyonundaki arjinin aminoasidi yüksek-aktiviteli paraoksonazı (B) belirtirken, bu pozisyonda glutamin bulunması ise düşük-aktiviteli enzimi (A) belirtmektedir (6). Farklı PON1 genotiplerinin atherosklerozu önlemedeki rolleri hala tartışmalı olmakla birlikte QQ düşük aktivite genotipli (Homozigot AA) bireylerin atheroskleroz riskinin oldukça yüksek olduğu giderek daha çok kabul edilmektedir.

Paraoksonaz ayrıca aktivite polimorfizmi göstermeyen arilesteraz aktivitesine de sahiptir (7). Arilesteraz (ARE) aktivitesinin, PON1 aktivitesindeki değişikliklerden bağımsız olarak asıl protein konsantrasyonunun bir göstergesi olduğu bildirilmektedir (8).

Paraoksonaz aktivite ölçümlerine ait metodlar Eckerson (9), Furlong (10) ve Smolen (11) tarafından geliştirilmiştir. Paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi ölçümlerinde kullanılan yöntemler temelde aynı olmakla birlikte farklı pH'larda çözeltiler kullanılmakta ayrıca farklı sıcaklıklarda reaksiyon oluşturulmaktadır (9-11). Ölçümlerde tam bir standardizasyon sağlanmadığından çeşitli sorunlarla karşılaşmaktadır. Paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümünde, substrat olarak paraokson gibi organofosfatların enzimatik hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenolün spektrofotometrik ölçümü esas alınmaktadır. Arilesteraz ölçümünde ise substrat olarak paraokson yerine fenil asetat kullanılmakta ve oluşan fenol ölçülmektedir.

Eckerson ve ark. (9) paraoksonaz aktivitesi ölçümlerinde Krisch (12)'den modifiye ettikleri bir metod uygulamışlardır. Bu metodda 1 mmol/L paraokson ve 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> içeren pH sı 10.5 olan 0.05 mol/L glisin tamponu kullanılarak bazal aktivite ve aynı solüsyona

1 mol/L NaCl ilavesi ile NaCl ile stimüle edilen paraoksonaz aktivitesi 25 °C'de 412 nm dalga boyunda ölçümlerle tespit edilmiştir. Krisch(12) ise ölçümlerinde 0.15 mol/L NaCl içeren glisin tamponu kullanmıştır. Zech ve Zurcher (13) pH sı 7.2 olan trietanolamin tamponu kullanarak paraoksonaz ölçümlerini yapmışlardır. Juretic ve ark. (1) ise paraoksonaz aktivite ölçümlerinde glisin tamponu yerine pH sı 8 olan Tris-HCl tamponu kullanmışlardır. Farklı literatürlerde sunulan metodoloji farklı olduğu için ölçüm sonuçlarının güvenilirliği azalmaktadır. Bu çalışmada PON1 ve arilesteraz aktivite ölçümlerinde karşılaşılan problemleri ve çözüm önerilerini araştırmak amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Fırat Tıp Merkezinde çalışmakta olan 12 sağlıklı personele ait serum örnekleri bir araya toplanarak serum havuzu oluşturulmuştur. Çalışmamızın başlangıcından itibaren aynı serum havuzu kullanılmış mümkün oldukça taze serumda çalışılmasına özen gösterilmiştir. Bir sonraki güne sarkan çalışmalar için serum havuzu -20°C' de derin dondurucuda saklanmıştır. Hemolizin ve EDTA'lı plazma örneklerinin denemesi için yine aynı gruptan alınan kan örnekleri kullanılmıştır.

Paraoksonaz (PON1) enzim aktivitesi ölçümünde substrat olarak paraokson, arilesteraz (ARE) ölçümünde ise substrat olarak fenil asetat kullanılmıştır. Kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıkta olup Merck ve Sigmadan sağlanmıştır. Serum havuzunda paraoksonaz aktivite ölçümlerinde farklı konsantrasyonlarda CaCl<sub>2</sub> ve yine farklı konsantrasyonlarda paraokson (O,O-diethyl-O-p-nitrophenylphosphate; Sigma Co, London, UK) ihtiva eden glisin ve Tris-HCl tamponları kullanılarak; farklı pH ve sıcaklıklarda (37 °C ve 25 °C'de) ölçümler yapılarak bazal paraoksonaz aktiviteyi incelenmiştir. Aynı solüsyonlara 0.5 mol/L ve 1 mol/L NaCl ilaveleri yapılarak da NaCl-stimüle paraoksonaz aktiviteyi tespit edilmiştir. Arilesteraz aktivitesi ölçümleri için ise Tris-HCl ve glisin tamponlarına substrat olarak paraokson yerine son konsantrasyonu 1 mmol/L ve 2 mmol/L olacak şekilde fenilasetat ilave edilmiştir. PON1'in enzimatik hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenol ile ARE'nin enzimatik hidrolizi sonucu oluşan fenol Techcomp 8500 II uv/vis spektrofotometresinde ölçülmüştür. Ayrıca reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin Techcomp 8500 II uv/vis spektrofotometresinde dalga boyu taraması yapılmıştır. PON1 aktivitesi çalışılırken enzimatik reaksiyonu takiben oluşan ürün 405 ve 412 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermiş ancak 412 nm'de daha ideal bir pik yüksekliği elde edildiği için ölçümlerin bu dalga boyunda yapılması tercih edilmiştir. ARE enzim aktivitesi ölçümünde ise 270 ve 279 nm dalga boylarında maksimum pikler elde edilmiş ve ölçümlerin 270 nm'de yapılması kararlaştırılmıştır.

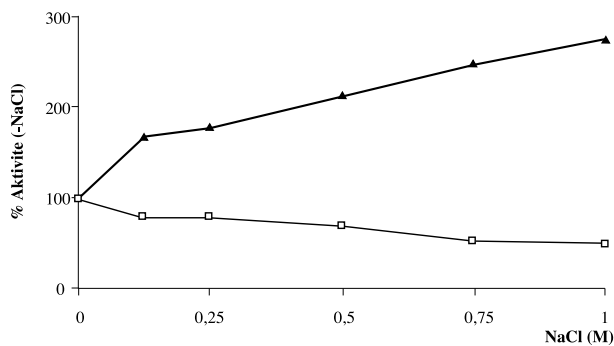
PON1 aktivitesi için 1 Ünite, 1 nmol 4-nitrofenol/ml serum/dk.; ARE aktivitesi için 1 Ünite, 1 mikromol fenol/ml serum/dk. olarak tanımlanmıştır. İstatistiksel analizler bilgisayar ortamında Minitab 10.1 programında yapılmış p<0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## BULGULAR

PON1 aktivitesi ölçümünü Mackness (14)'in metodu ile karşılaştırmak için Tris-HCl tamponu pH:10.5'da çalışıldığında serum havuzunda enzim aktivitesi üç ölçümün aritmetik ortalaması olarak  $107.70 \pm 46.05$  Unite/L bulunmuştur. Bu değer literatürdeki diğer değerler ile karşılaştırıldığında düşüktür (1,10,11). Benzer şekilde ARE aktivitesi ise  $59.33 \pm 21.97$  Unite/ml olarak saptanmıştır. PON1 ve ARE enzim aktivitelerinin optimal şartlarda çalışabilmesi için kinetik çalışmalar yapılmış ve ölçüm metodları arasındaki farklılıklar çalışılmıştır. Bu şekilde enzim aktivitelerinde % 50'lere varan kayıpların olduğu bir çok araştırmanın sonucunda tespit edilmiştir. Ayrıca PON1 enzim aktivitesi çalışılırken substrat olarak kullanılan paraoxonun alkol ve asetonunda çok zor çözünmesi nedeni ile substrat eksikliğinden kaynaklanan bir problemin olması ihtimali üzerinde durulmuş ve bir çok çalışmanın sonucunda paraoxonun tam olarak çözünmesi sağlanmıştır. Bununla ilgili literatürde herhangi bir bilgi olmadığı için bir çok organik molekülün (etanol, metanol,  $CCl_4$ , DMSO) etkisi araştırılmış ve en iyi çözügen olarak aseton tercih edilmiştir. Asetonun 15 ml'si üzerine eklenen paraoxonun mekanik bir karıştırıcıda 6-8 saat karıştırıldıktan sonra tam olarak çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu çözelti orijinal hacmine distile su ile tamamlanmıştır.

Şekil 1 farklı konsantrasyonlardaki NaCl tarafından PON1 aktivitesinin stimüle edilmesini, ARE aktivitesinin ise inhibisyonunu göstermektedir. Bu sonuca göre PON1'in tümüyle aktif, ARE'nin ise tümüyle inhibe olması nedeni ile 1 M NaCl'nin kullanılmasının uygun olduğu bulunmuştur. ARE enzim aktivitesi ölçülürken NaCl'nin kullanılmaması gerektiği ortaya konulmuştur.

Farklı pH ortamlarında bazal ve NaCl ile stimüle edilen PON1 aktiviteleri araştırıldığında pH:8 için bazal aktivite  $187.06 \pm 39.72$  U/L, NaCl ile stimüle edilen aktivite  $249.56 \pm 28.47$  U/L olarak; pH:10.5 için ise bazal aktivite  $138.42 \pm 26.35$  U/L, NaCl ile stimüle edilen aktivite  $192.76 \pm 42.57$  U/L olarak tespit edilmiştir (Şekil 2). Bu sonuçlarla, aynı şartlarda pH'nın 10.5 olmasının aktiviteyi %26 oranında azalttığı görülmüştür. PON1 aktivitesi ölçümlerinde pH'nın 8 olması gerektiği saptanmıştır. Şekil 3'de farklı sıcaklıklarda bazal ve NaCl ile stimüle edilmiş PON1 aktivitesi görülmekte-

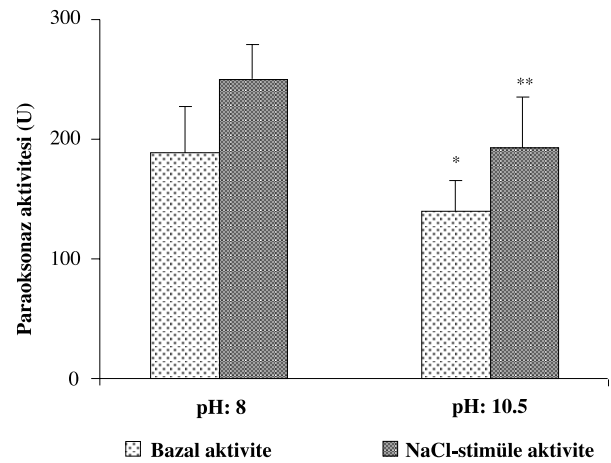


Şekil 1 NaCl tarafından paraoksonaz aktivitesinin stimülasyonu, arilesteraz aktivitesinin inhibisyonu.

▲ Paraoksonaz □ Arilesteraz

dir.  $37^\circ C$ 'de bazal aktivite  $187.06 \pm 39.72$  U/L, NaCl ile stimüle edilmiş aktivite  $249.56 \pm 28.47$  U/L ;  $25^\circ C$ 'de ise bazal aktivite  $151.45 \pm 31.53$  U/L, NaCl ile stimüle edilen aktivite  $202.94 \pm 39.61$  U/L olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre absorbans ölçümlerinin  $25^\circ C$ 'de yapılmasıyla aktivitede %20 dolayında azalma olduğu ortaya konulmuştur ( $37^\circ C$ 'ye göre bazal ve NaCl ile stimüle edilen aktivitede anlamlı azalma; her ikisi için  $p < 0.05$ ).  $25^\circ C$ 'de aktivitede kayıplar olması nedenleri ile  $37^\circ C$ 'deki ölçümlerinde daha uygun sonuçlar alınacağı bulunmuştur.

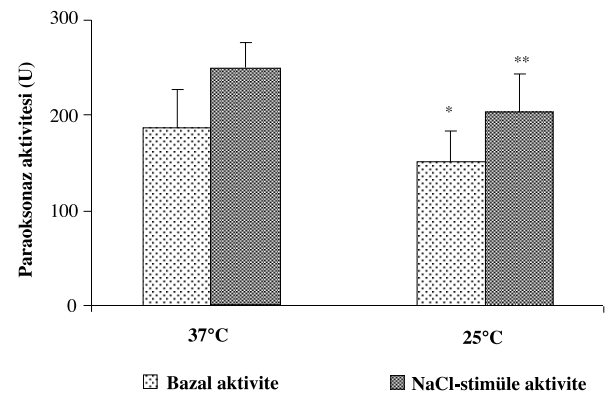
Paraoksonaz ve arilesteraz aktivite ölçümleri hemolizli veya EDTA'lı plazmada çalışılmamalıdır. Hemolizin aktiviteyi bireylere göre 2-8 kat artırdığı (Şekil 4), EDTA'lı plazma kullanıldığında ise %50'ye varan aktivite kayıplarıyla karşılaşılacağı görülmüştür.



Şekil 2 pH: 8 ve pH: 10.5'de bazal ve NaCl-stimüle paraoksonaz aktivitesi.

\* pH: 8'e göre bazal paraoksonaz aktivitesinde anlamlı azalma ( $P < 0.05$ ).

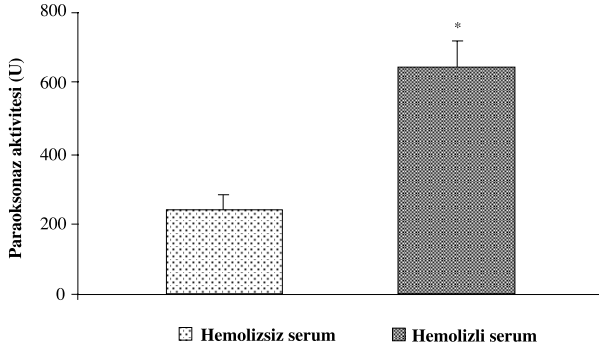
\*\* pH: 8'e göre NaCl-stimüle paraoksonaz aktivitesinde anlamlı azalma ( $P < 0.05$ ).



Şekil 3  $37^\circ C$  ve  $25^\circ C$ 'de ölçülen bazal ve NaCl-stimüle paraoksonaz aktiviteyi.

\*  $37^\circ C$ 'ye göre bazal paraoksonaz aktivitesinde anlamlı azalma ( $P < 0.05$ ).

\*\*  $37^\circ C$ 'ye göre NaCl-stimüle paraoksonaz aktivitesinde anlamlı azalma ( $P < 0.05$ ).

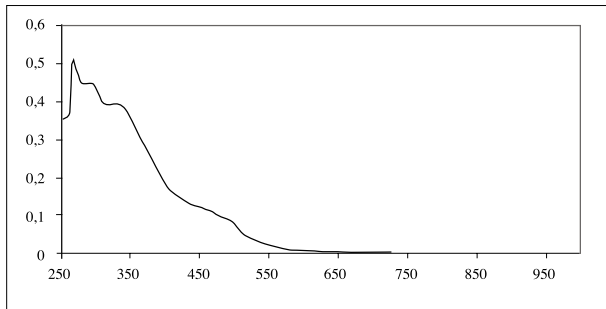


Şekil 4 Hemolizsiz ve hemolizli serumlarda paraoksonaz aktiviteleri.

\* Hemolizsiz serumla göre bazal paraoksonaz aktivitesinde anlamlı artış ( $P < 0.001$ )

## TARTIŞMA

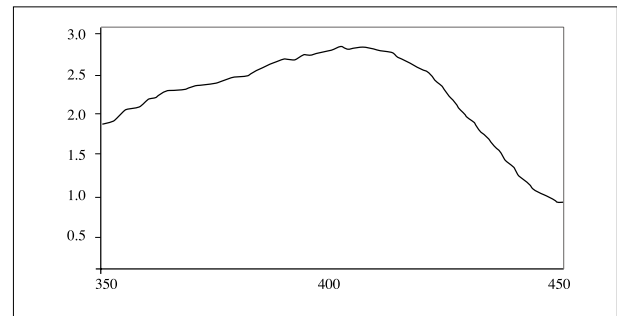
Çeşitli tuz solüsyonları paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerini etkilemektedir. Sodyum klorür, potasyum klorür ve amonyum klorür gibi çeşitli tuz ilavelerinin paraoksonaz aktivitesi üzerindeki stimulan etkileri araştırılmış ve en yüksek oranda stimülasyonun sodyum klorür ile gerçekleştiği tespit edilmiştir (7,9). Sodyum klorürün artan konsantrasyonlardaki ilaveleri PON 1 aktivitesinde stimülasyon oluşturmaya rağmen, ARE aktivitesi üzerinde inhibitör etki göstermektedir (Şekil 1) (7). Bu nedenle; PON1 aktivite ölçümlerinde 1 mol/litre NaCl ilave edilirken, ARE ölçümlerinde NaCl kullanılmamaktadır. 1M NaCl tarafından enzim aktivitesinde oluşturulan stimülasyon derecesi, PON1 aktivitesinin fenilasetat hidrolizi aktivitesine (ARE aktivitesi) oranı belirlenerek ya da fenilasetatın paraoksonaz A ve B fenotiplerinin aktivitesinde oluşturduğu inhibisyon derecesine göre (9) enzim aktivitesinin fenotipik ayrımı yapılabilmektedir. PON1 aktivitesi için pH'nın etkisi glisin ve Tris-HCl tamponları ile araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada Tris-HCl tamponu için optimal pH:11.2 olarak tespit edilirken (10); bir başka çalışmada ise tam aktivasyon için optimal pH: 7.5-8, olarak belirlenmiştir (14). Biz ölçümlerimizde en doğru sonucu elde etmek için 0.1 mol/litre ve pH 8 olan Tris-HCl tamponu kullanmayı uygun bulduk. Aynı şartlarda pH'nın 10.5 olması aktiviteyi yaklaşık %26 oranında azaltmaktadır ( $p < 0.05$ , Şekil 2). Farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi ölçümleri yapılarak, sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Aktivite ölçümleri yapılırken absorbansın zamanla azaldığı dikkat çekmektedir. Bu nedenle 37 °C'de 5 dakika bekleme süresi sonrasında örnekler 5 dakikaya kadar devamlı



Şekil 5 PON 1 aktivitesi ölçümünde kullanılan metodolojiye ait 4-nitrofenolün absorbans spektrumu.

izlenmelidir. Absorbans ölçümleri 25°C'de yapıldığında aktivitede yaklaşık %20 dolaylarında azalmalar tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ , Şekil 3). PON1 aktivitesi için spektrofotometrik ölçümler 405 veya 412 nm dalga boylarında yapılabilir, ancak 412 nm dalga boyunda yapılan ölçümler daha ideal görünmektedir (Şekil 5). ARE aktivite ölçümler 217 ve 270 nm'de yapılabilmeyle beraber, 270 nm'deki ölçümler daha stabil sonuçlar vermektedir (Şekil 6). ARE enzim aktivitesi ölçümlerinde başlangıç serumunun 40 misli kadar sulandırılarak dilüe edilmesi gerekmektedir; aksi takdirde yanlış pozitif sonuçlar elde edilmektedir. PON1 ve ARE aktivitesi ölçümlerinde farklı metodlar kullanılması ve çalışma esnasında farklı metodlarda çeşitli sorunlarla karşılaşılması üzerine PON1 ve ARE enzim aktivitesi ölçümlerinde karşılaşılan bu sorunların giderilmesine yönelik bu çalışma planlanmıştır. Bu ölçümlerde karşılaşılan sorunlar ve çözüm önerileri birçok çalışmadan sonra ortaya konulmuştur. Paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerinin ölçümünde serum ya da EDTA'sız plazma kullanılmalıdır. PON1 aktivite ve stabilizasyonu için  $Ca^{+2}$ 'a gereksinim göstermektedir. Kalsiyum hem ARE aktivitesi hem de PON1 A ve B fenotiplerinin aktivitesi için gereklidir (9,10). Kalsiyum, direkt katalitik reaksiyonlarda yer alarak ya da aktif bölgenin uygun konformasyonda tutulmasını sağlayarak etkisini göstermektedir. Ayrıca paraoksonun P=O bağına da polarize ederek fosforun nükleofilik saldırıya yatkınlığını sağlamakta ve dietilfosfatın aktif bölgeden ayrılmasını kolaylaştırmaktadır (4). EDTA bir Ca bağlayıcı olduğundan, varlığı PON1'i inaktive etmektedir. EDTA'lı plazma kullanıldığında yaklaşık %50'lik (%35-80) aktivite kayıpları ile karşılaşmıştır. Aynı kişilere ait serum ve plazmalarda PON1 aktiviteleri karşılaştırıldığında EDTA'lı plazmadaki ölçümlerde %80'lik bir inhibisyon görülmüştür; EDTA'lı plazma kullanımının oldukça hatalı sonuçlar alınmasına yol açacağı açık bir şekilde ortaya konulmuştur. Ayrıca hemolizin aktiviteyi bireylere göre 2-8 kat yükselttiği görülmüştür ( $p < 0.001$ , Şekil 4); bu nedenle hemolizli serum kullanımından da kaçınılmalıdır.

Bazı çalışmalarda ölçümde glisin tamponu (2,5,10) kullanılırken, bazılarında ise Tris-HCl tamponu (1,14) tercih edilmektedir. Biz ölçümlerimizde 0.1 mol/L Tris-HCl tamponunu (pH:8) kullanmayı tercih ettik çünkü pH'nın 10.5 olması halinde enzim aktivitesinde kayıplar bulunmuştur. PON1 aktivite ve stabilitesi için  $Ca^{+2}$  gerekli olduğu için substrat çözeltisi içerisinde kalsiyum klorür bulunmalıdır. Çeşitli çalışmalarda aktivite ölçümlerinde farklı konsantrasyonlarda kalsiyum klorür



Şekil 6 ARE aktivitesi ölçümünde kullanılan metodolojiye ait fenolün absorbans spektrumu.

kullanılmakla birlikte; biz ölçümlerimizde 2 mmol/litre kalsiyum klorür içeren substrat çözeltisi kullanmaktayız. PON1 aktivitesi ölçümünde substrat olarak kullanılan paraokson çözeltisinin mümkün olduğu kadar taze olarak günlük hazırlanması tercih edilmektedir. Paraokson metanol ya da asetonla çözülerek kullanılabilir. Ancak metanolde çözünmesi için yaklaşık 48 saat mekanik karıştırıcıda beklemesi gerekmektedir. Paraokson zor çözüldüğünden, çözünmesi için küçük porsiyonlar ve çözücü olarak da aseton kullanılması tercih edilmektedir. Ayrıca metanol ve aseton uçucu olduklarından, ağız kapalı çözücü kabı kullanılmalıdır. Sonuç olarak; PON1 aktivitesi ölçümlerinde 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 2 mmol/L paraokson (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfosfat) içeren 0.1 mol/L pH: 8 Tris-HCl buffer çözeltisi kullanılarak; 3,5 ml bu

reaktif karışıma 100µl serum örneğinin ilave edilmesiyle oluşan reaksiyon ürünü olan 4-nitrofenol 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek bazal aktivite tespit edilmektedir. Aynı substrat çözeltisine 1 mol/L NaCl ilave edilerek yapılan ölçümlerde ise NaCl ile stimüle edilmiş aktivite belirlenmektedir. ARE aktivitesi ölçümü ise aynı çözeltiye paraokson yerine substrat olarak fenilasetat eklenmesi sonucu oluşan fenolün 270 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır(1). Ancak belirtildiği gibi ARE aktivite ölçümlerinde NaCl kullanılmamaktadır. Paraoksonaz yakın bir gelecekte çok çalışılan ve ilgi çeken bir enzim olduğundan, paraoksonaz ve arilesteraz aktivite ölçümlerinde bu stabilenin sağlanması faydalı olacaktır.

## Kaynaklar

1. Juretic, D, Tadijanovic, M, Rekić, B, Simean-Rudolf, V, Reiner, E, Baricic, M. (2001) Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study. *Clin Sci.* 42, 146-150.
2. Li, W.F, Costa, L.G, Furlong, C.E. (1993) Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. *J Toxicol and Environ Health.* 40, 337-346.
3. Primo-Parma, S.L, Sorenson, R.C, Teiber, J, La Du BN. (1996) The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of multigene family. *Genomics.* 33, 498-509.
4. Mackness, M.I, Mackness, B, Durrington, P.N, Connelly, P.W, Hegele, R.A. (1996) Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 7, 69-76.
5. Mackness, B, Mackness, M.I, Arrol, S, Turkei, W, Durrington, P.N. (1998) The 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 Letters.* 423, 57-60.
6. Adkins, S, Gan, K.N, Mody, M, La Du, B.N. (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.
7. Eckerson, H.W, Wyte, C.M, La Du, B.N. (1983) The human serum paraoxonase/ arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet.* 35, 1126-1138.
8. Mackness, M.I, Arroll, S.I, Mackness, B, Durrington, P.N. (1997) Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high density lipoproteins in protecting low density lipoprotein against lipid peroxidation. *Lancet.* 349, 851-852.
9. Eckerson, H.W, Romson, J, Wyte, C.M, La Du, B.N. (1983) Human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their responses to salts. *Am J Hum Genet.* 35, 214-27.
10. Mueller, R.F, Hosnung, S, Furlong, C.E, Anderson, J, Giblett, E.R, Motulsky, A.G. (1983) Plasma paraoxonase polymorphism. A new enzyme assay, population, family, biochemical and linkage studies. *Am J Hum Genet.* 35, 393-408.
11. Smolen, A, Eckerson, H.W, Gan, K.N, Hailat, N, La Du, B.N. (1991) Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos.* 19, 107-112.
12. Krisch, K. (1968) Enzymatische hydrolyse von diethyl-p-nitrophenylphosphat (E600) durch menschliches serum. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 1, 41-45.
13. Zech, R, Zurcher, K. (1974) Organophosphate splitting serum enzymes in different mammals. *Comp Biochem Physiol.* 48,427-433.
14. Mackness, M.I. (1998) Why plasma should not be used to study paraoxonase. *Atherosclerosis.* 136, 195-196.