



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SAĞLIKLI KİŞİLERDE PARAOKSONAZ VE
ARİLESTERAZ AKTİVİTELERİNİN MİKROPLAK
OKUYUCUYA UYARLANMIŞ ÖLÇÜMLERİ İLE
ENDOTEL FONKSİYONLARI VE KAROTİS ARTER
İNTİMA MEDIA KALINLIĞI ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Dr. PALMET GÜN ATAK

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. ÖNDER ŞİRİKÇİ

İSTANBUL 2010

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca danışmanlığımı yapan, bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Önder Şirikçi'ye teşekkürlerimi sunarım.

Değerli hocalarım Prof. Dr. Kaya EMERK'e, Prof. Dr. Yavuz TAGA'ya, Prof. Dr. Süha YALÇIN'a, Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER'e, Prof. Dr. Serpil BİLSEL'e, Prof. Dr. Goncagül HAKLAR'a eğitimime katkılarından ve gösterdikleri yakınlık ile anlayıştan ötürü teşekkür ederim.

Kardiyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Yelda Başaran'a ve Uzm. Dr. Beste Özben'e tez çalışmalarımındaki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Beraber geçirdiğimiz yıllar boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitimim süresince hep yanımda olan aileme ve sevgili eşime teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Önsöz	i
İçindekiler	ii
Özet	iii
Summary	iv
Simge ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller ve Tablolar listesi	vi
1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	2
2.1. Ateroskleroz	2
2.2 Paraoksonaz Enzimi	4
2.2.1. Paraoksonaz enziminin yapısı ve özellikleri	7
2.2.2. PON1-HDL ilişkisi	10
2.2.3. PON1 Aktivitesi ve PON1 Polimorfizmi	12
2.2.4. Ateroskleroz ve PON1	13
2.3 Endotel	15
2.3.1. Endotel Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi	15
2.3.1.1. Brakiyal Arter Doppler Ultrasonografisi	15
3. Gereç ve Yöntem	17
3.1. Kullanılan gereçler	17
3.2. Kimyasal maddeler	17
3.3. Yöntemler	17
3.3.1. Paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümü	18
3.3.2. Arilesteraz enzim aktivitesi ölçümü	20
3.3.3. Apo A1 ölçümü	21
3.3.4. HDL ölçümü	22
3.3.5. FMD (Flow Mediated Dilatation) Ölçümü	22
3.3.6. CIMT (Karotis arter intima-medya kalınlıkları) Ölçümü	23
3.3.7. İstatistiksel analiz	23
4. Bulgular	24
5. Tartışma	32
6. Kaynaklar	39

ÖZET

Aterosklerotik kalp hastalığı, en sık görülen kardiyovasküler hastalıktır. Paraoksonaz (PON1) plazmada yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) yapısında bulunan bir ester hidrolazıdır. PON1'in düşük dansiteli lipoproteini (LDL) oksidasyondan koruduğu gösterilmiştir. Endotel fonksiyon bozukluğu atroskleroz gelişiminde önemli bir faktördür. FMD (flow mediated dilatation) brakial arter doppler ultrasonografisi ile uygulanan nitrik oksite bağlı damar genişlemesini vazomotor bir indeks olarak veren bir tekniktir. FMD ve CIMT (karotis arter intima medya kalınlığı) ölçümleri aterosklerozu gösteren non invaziv teknikler olup koroner arter hastalığı erken tanısında önem taşırlar.

Biz çalışmamızda sağlıklı bir grupta non-invaziv yöntemlerle, FMD ile endotel fonksiyon bozukluğunu ve Karotis arter intima-medya kalınlıkları ile PON1 ve Arilesteraz enzim aktiviteleri arasında olası bir ilişkiyi araştırmayı ve bu parametrelerin aterosklerozun erken tayini için bir gösterge olup olmadıklarını göstermeyi amaçladık. Enzim aktivite tayinleri mikroplak okuyucuya uyarladığımız spektrofotometrik metotla gerçekleştirildi. PON1 ve arilesteraz (ARE) arasında istatistiksel olarak anlamlı korrelasyon bulundu. Çalışma grubu PON1 enzim aktivitesi dağılımı bimodaldi. PON1 enzim aktivitesi ile FMD ve CIMT arasında bir ilişki bulunmadı. ARE enzim aktivitesi ile CIMT arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki bulundu. Literatürde PON1 ve FMD arasında ilişki gösteren yayınlar olup bu konuda daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

SUMMARY

Atherosclerosis and coronary vascular diseases are the major causes of morbidity and mortality in the western world. PON1 is an ester hydrolase which is within the structure of high-density lipoprotein (HDL). PON1 protects LDL from oxidative modification. Endothelial dysfunction is thought to be an important factor in the development of atherosclerosis. FMD (flow mediated dilatation) is an ultrasonographic technique which provokes the release of nitric oxide, resulting in vasodilation that can be quantitated as an index of vasomotor function. Both FMD and CIMT (carotid artery intima-media thickness) are non invasive techniques that have been associated with coronary risk factors.

The aim of this thesis is to characterize the relationship between paraoxonase, arylesterase activities and FMD, CIMT as an early marker of atherosclerosis. Enzyme activities were quantified by a spectrophotometric method adapted to a microplate reader. The correlation between PON1 and arylesterase activities was statistically significant. PON1 activity in our study population was bimodal, and showed no correlation with FMD and CIMT. We found a significant negative correlation between ARE and CIMT. Further studies are needed to understand the relationship between PON1 and FMD that were seen in some studies.

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABCA1	: ATP binding cassette protein
ApoA1	: apolipoprotein A1
Apo J	: clusterin
ARE	: arilesterase
CIMT	: carotid artery intima-media thickness
FMD	: Flow mediated dilatation
GSPx	: glutathion peroksidase
HDL	: high density lipoprotein
LDL	: low density lipoprotein
LCAT	: lecithine cholesterol acyl transferase
NID	: Nitrate induced dilatation
NO	: Nitric oxide
PAFAH	: platelet activating factor acetyl hydrolase
PON	: paraoksonase

ŒEKİL VE TABLOLARIN LİSTESİ

1. Œekillerin Listesi

Œekil 1. Paraoksonun Enzimatik Hidrolizi

Œekil 2. Aromatik esterlerin hidrolizi

Œekil 3. Lakton hidrolizi

Œekil 4. PON1 enziminin yapısı

Œekil 5. PON1 proteininin üç boyutlu yapısı.

Œekil 6. PON1' in HDL' ye transferi

Œekil 7. PON1 enzimi pararaoksonaz aktivitesi dalgaboyu-absorbans taraması

Œekil 8. Paraoksonaz enzim aktivitesi absorbans zaman grafiği

Œekil 9. Fenilasetatın enzimatik hidrolizi

Œekil 10. Arilesteraz enzim aktivitesi absorbans zaman grafiği

Œekil 11. PON1 ve ARE enzim aktivitelerinin birbirlerine karŒı çizilmiş saçılım grafikleri

Œekil 12. PON1/ARE oranı frekans histogramı

2.Tabloların Listesi

Tablo 1. Çalışma grubu demografik verileri

Tablo 2. Brakiyal arter ultrasonografik değerlendirmesi ve CIMT

Tablo 3. Çalışma grubu serum PON, ARE, HDL ve ApoA1 değerleri

Tablo 4. PON1 enzim aktivitesi ile yaş, BMI, sistolik kan basıncı, HDL, Apo A1, ARE enzim aktivitesi, FMD, CIMT arasındaki ilişki

Tablo 5. ARE enzim aktivitesi ile yaş, BMI, sistolik kan basıncı, HDL, Apo A1, FMD, CIMT arasındaki ilişki

Tablo 6. PON/HDL oranı ile yaş, BMI, sistolik kan basıncı, Apo A1, FMD, CIMT arasındaki ilişki

Tablo 7. PON1 enzim aktivitesi düşük (QQ) fenotipli bireylerde PON1 ile yaş, BMI, sistolik kan basıncı, HDL, Apo A1, FMD, CIMT arasındaki ilişki

Tablo 8. PON1 enzim aktivitesi düşük (QQ) fenotipli bireylerde PON/HDL oranı ile yaş, BMI, sistolik kan basıncı, Apo A1, FMD, CIMT arasındaki ilişki

Tablo 9. PON1 enzim aktivitesi yüksek (QR, RR) fenotipli bireylerde PON1 ile yaş, BMI, sistolik kan basıncı, HDL, Apo A1, FMD, CIMT arasındaki ilişki

Tablo 10. PON1 enzim aktivitesi yüksek (QR, RR) fenotipli bireylerde PON/HDL ile yaş, BMI, sistolik kan basıncı, Apo A1, FMD, CIMT arasındaki ilişki

Tablo 11 QQ genotipi ve QR, RR genotipi taşıyan grupta ölçülen parametrelerin ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel değerlendirmeleri

Tablo 12. Sigara içen ve içmeyen grupta ölçülen parametrelerin ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel değerlendirmeleri

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aterosklerotik kalp hastalığı, en sık görülen kardiyovasküler hastalıktır ve tüm dünyada olduğu gibi toplumumuzda da ölüm sebepleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Bu hastalıkla ilgili risk faktörlerinin ve belirteçlerin tanımlanması, hastalığın önlenmesi ve erken tanısı için büyük önem taşımaktadır.

Aterosklerotik plakta bulunan ve oluşumunda rolü olan başlıca moleküller lipidler ve lipoproteinlerdir. Dokulara kolesterol taşıyan düşük dansiteli lipoprotein (low density lipoprotein, LDL) bir risk faktörü olarak tanımlanırken, dokulardan kolesterolü alan yüksek dansiteli lipoprotein (high density lipoprotein, HDL) koruyucu olarak nitelendirilmiştir. HDL'nin bu etkiyi göstermesinde yapısında bulunan bazı proteinlerin (apolipoproteinler ve enzimler) rol oynadığı bilinmektedir. Bu enzimlerden biri olan paraoksonaz (PON1) öncelikle organofosfatlara karşı etkinliği tanımlanmış, daha sonra ise HDL ile olan etkileşimi ve lipid peroksidleri hidroliz etmedeki fonksiyonu gösterilmiş olan bir enzimdir.

Endotel hücreleri vasküler tonusu kontrol ederler, trombosit aggregasyonu ve düz kas hücre çoğalmasını inhibe ederler, vazoaaktif maddeler salgılayarak damar homeostazını korumada önemli bir rol üstlenirler. Endotel fonksiyon bozukluğu, aterosklerozda erken evrede gözlenen bozukluklardan birisidir. Endotel fonksiyon bozukluğunun invaziv ve non-invaziv yöntemlerle tayini aterosklerozun klinik bulgu vermeden erken evrelerde gösterilmesi açısından önemlidir. Endotel fonksiyon bozukluğunun önemli göstergelerinden birisi nitrik oksit (NO) tayinidir. Bir diğeri ise, brakial arter doppler ultrasonografisi ile non-invaziv olarak akım aracılı genişlemeyi (flow mediated dilatation, FMD) belirlemektir.

Biz çalışmamızda sağlıklı bir grupta FMD ve Karotis arter intima-medya kalınlıkları (carotid artery intima-media thickness,CIMT) ile PON1 ve Arilesteraz enzim aktiviteleri arasında olası bir ilişkiyi araştırmayı ve bu parametrelerin aterosklerozun erken tayini için bir gösterge olup olmadıklarını göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz

Kardiyovasküler hastalıklar endüstrileşmiş ülkelerde başlıca mortalite ve morbidite nedenidir. Kalp ve beyin gibi yaşamsal organları besleyen damarlarda aterosklerotik lezyonlar sonucu gelişen bu hastalıklar, 2005 yılında yayınlanan Avrupa kardiyovasküler hastalık istatistiklerine göre Avrupadaki ölümlerin yaklaşık yarısının (%49) sebebinin oluşturmaktadır (1). Kardiyovasküler hastalıklar için genetik yatkınlık, hipertansiyon, diyabet, yüksek kolesterol, obezite, stres, sigara ve yetersiz fiziksel aktivite risk faktörü olarak gösterilmektedir (2).

İskemik kalp hastalığı olarak da adlandırılan koroner arter hastalığı, miyokardın oksijen ihtiyacı ile kan akımı arasındaki dengesizlik sonucu gelişen birbiri ile yakından ilişkili sendromlar grubuna verilen isimdir. İskemik kalp hastalığının en sık görülen sebebi, koroner arterin aterosklerozuna bağlı olarak gelişen koroner arteriyel kan akımındaki azalmadır.

Ateroskleroz, esas olarak arterlerde endotel fonksiyon bozukluğu ve intimal duvarlarda dejenerasyon ile seyreden, kronik, ilerleyici ve inflamatuvar bir hastalık olup genetik ve çevresel faktörlerin etkisinde gelişmektedir. Aterosklerotik değişiklikler, yaşamın ilk yıllarında başlayarak orta ve ileri yaşlarda kardiyovasküler hastalıklar şeklinde ortaya çıkmaktadır. Ateroskleroz oluşumunda en önemli faktör, kolesterolün düşük dansiteli lipoproteinler (low density lipoprotein, LDL) şeklinde kanda yüksek oranda bulunmasıdır (2). Birçok hücrenin katıldığı ateroskleroz oluşumunda endotel hücreleri ve düz kas hücreleri rol oynamaktadırlar. Hasarsız, normal bir damar endotelinde hücreler arasından az miktarlarda monosit ve lipoproteinler subendotel aralığa geçebilmekte veya tersi olabilmektedir. Monositler bu bölgeye geldikten sonra makrofajlara dönüşerek fagositoz yapmaktadırlar. Ateroskleroz oluşum teorilerine göre endotel hasarı nedeniyle bölgeye toplanan monosit ve makrofajlar dolaşımdaki kolesterolü alarak köpük hücrelerini meydana getirmektedirler. Daha sonra trombositlerin hasarlı bölgeye gelmesi ve çeşitli büyüme faktörlerinin (makrofaj, endotel, trombosit kaynaklı) ve sitokinlerin salınımı sonucunda düz kas hücrelerinin buraya göç etmesi ve çoğalması ile ateroskleroz

meydana gelmektedir. Köpük hücreleri içinde biriken kolesterol plazma kaynaklı olup özellikle LDL kolesterolü içermektedir. Deneysel ve klinik çalışmalar, aterosklerozun en önemli nedenlerinden birinin hiperlipidemi olduğunu göstermektedir. Aterosklerozun meydana gelmesinde en önemli basamak ise değişime uğramış olan okside LDL'nin damar duvarında birikimidir. Okside LDL, damar duvarına kolayca yerleşebilmekte sitokinlerin salınımına ve nitrik oksit (vazodilatör, antiaterojenik ve trombosit agregasyonunu azaltır) salınımının inhibisyonuna neden olmaktadır (2). Okside LDL damar duvarında yağlı lezyon oluşumundan komplike plak gelişimine kadar aterosklerozun her aşamasında endotel hasarını ve aterosklerozu hızlandırmaktadır.

Yüksek dansiteli lipoprotein (high density lipoprotein, HDL) düzeyleriyle kardiyovasküler hastalıklar arasında zıt bir ilişki olduğu gösterilmiştir (3). Serum total kolesterol ve LDL düzeylerinin yüksek; buna karşılık HDL düzeylerinin düşük olması, aterosklerotik kalp hastalığı için risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (3). HDL'nin ateroskleroza karşı koruyucu etkisinde başlangıçta ters kolesterol taşınımındaki rolüne odaklanılmıştır. LDL, çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (VLDL) dolaşımında trigliseridlerini kaybedip kolesterolden zengin hale gelmeleri ile oluşur ve dokulara kolesterolü taşır. HDL ise dokulardaki kolesterolü alır, alınan kolesterol esterleştirilir, daha da hidrofobik hale getirilerek HDL'nin merkezine yerleştirilir ve bu şekilde kolesterol karaciğere taşınır. Ancak HDL'nin aterosklerozdaki koruyucu rolü, ters kolesterol taşınması ile sınırlı değildir. HDL aynı zamanda nitrik oksit gibi bazı damar genişletici moleküllerin sentezini artırır, inflamasyon ve tromboz oluşumunu önleyici etki gösterir, adezyon moleküllerinin sentezini azaltır ve endotel tamirini uyarır. Yapılan çalışmalarda HDL düzeyinin, koroner arter hastalığı gelişme olasılığını en iyi gösteren parametrelerden biri olduğu gösterilmiştir (4). HDL kolesterol düzeyindeki her 1 mg/dL artışa karşılık koroner arter hastalığı gelişiminde % 2-3 oranında azalma olduğu öne sürülmüştür (5). HDL'nin bir başka önemli etkisi ise, aterosklerozun başlangıç ve gelişiminden sorumlu tutulan LDL'deki oksidatif değişimleri önlemesidir. HDL, yaklaşık %50 konsantrasyonda protein, daha düşük konsantrasyonlarda kolesterol ve fosfolipid içeren heterojen bir yapıya sahiptir (6). Karaciğer ve ince barsaktan sentezlenen HDL'nin yapısında apolipoprotein A1 (apo A1), apolipoprotein A2 (apo A2),

glutasyon peroksidaz (GSPx), trombosit aktive edici faktör asetil hidrolaz (PAHAF) ve Paraoksonaz (PON1) bulunmaktadır (6).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda HDL'nin ateroskleroza karşı koruyucu etkilerinin, yapısında bulundurduğu PON1 ve trombosit aktive edici faktör asetil hidrolaz (platelet activating factor acetyl hydrolase, PAFAH) gibi enzimlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu enzimlerin lipid peroksidasyonu sonucu oluşan okside fosfolipidleri detoksifiye ettikleri ve okside LDL'nin indüklediği ateroskleroz gelişiminde rol oynayan mekanizmaları inhibe ettikleri ileri sürülmüştür (6).

PAFAH, hem proinflamatuvar bir molekül olan platelet aktive edici faktörü, hem de oksitlenmiş fosfolipitleri hidroliz edici özelliği ile koruyucu etkide önemli rolü olduğu düşünülen bir moleküldür. Ancak PAFAH insanda, HDL'den çok LDL üzerinde bulunan bir enzimdir (7). HDL'ye özgü olan ve lipid peroksitleri hidroliz etmede güçlü etkisi olduğu gösterilen enzim ise PON1'dir (8, 9). *In vivo* ve *in vitro* koşullarda PON1 eksikliğinde, LDL oksidasyonunun arttığı ve buna paralel olarak ateroskleroz gelişiminin hızlandığı gösterilmiştir (8).

2.2. Paraoksonaz Enzimi

Organofosfat yapıları insektisitler ve sinir gazları *in vivo* olarak sitokrom p-450 bağımlı mikrozomal monooksijenazlar ile, oksidatif desülfürasyon tepkimesiyle, oldukça toksik oksijen analoglarına (okson) aktive olurlar (oksidatif desülfürasyon) (10). Sonrasında ester bağı taşıyan aktif ürünler, esterazlarla hidrolize edilerek vücuttan uzaklaştırılırlar. Bu kimyasallar asetilkolinesterazın zayıf inhibitörleridir, organofosfat zehirlenmelerinde görülen semptomlar bu inhibisyon sonucu oluşmaktadır.

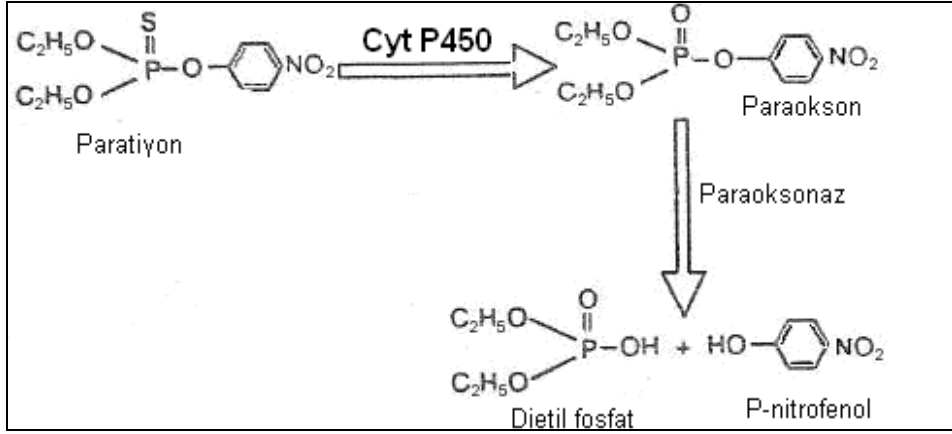
Vücuda alınan paratyonun enzimatik biyotransformasyonu sonucu oluşan paraokson kuvvetli bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür ve paratyon zehirlenmesi sırasında görülen kolinerjik krizden sorumludur. Paraokson sinaptik bileşelerde asetilkolin birikimine yol açarak aşırı sinir uyarısına sebep olmaktadır (8).

Paraoksonaz, paratyonun oksidatif desülfürasyonu ile oluşan paraoksonu hidroliz ederek paranitrofenol ve dietilfosfat oluşumuna yol açar (Şekil 1). Bu süreç daha çok tiyonlar ve oksonları detoksifiye edebilen enzimlerin (glutasyon-S

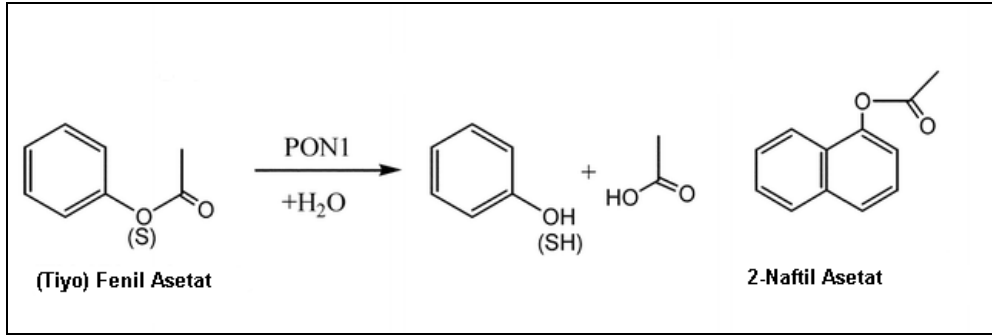
transferaz, monooksijenaz, PON1) yer aldığı karaciğerde olur ve hepatik organofosfat metabolizması detoksifikasyon yönündedir. Memelilerde hepatik detoksifikasyondan kaçan herhangi bir okson, etki edeceği hedef dokulara ulaşmadan önce kanda da serum paraoksonaz enzimi ile hidroliz edilebilir. Bazı organofosfatların (örneğin primifosmetilokson), serum paraoksonaz enzimi ile hidrolizi hızlıdır, aslında beyine hiç aktif organofosfat ulaşmayacağı tahmin edilebilir (8).

İnsan serum paraoksonaz enzimi paratyon, diazion ve kloropirifos gibi çok sayıda insektisin toksik okson metabolitlerini ve soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir ajanlarını hidroliz edebilmektedir. İnsan sağlığı açısından organofosfatlı bileşikler terörizm tehdidi kadar bir çevresel risk de oluşturur. Paraoksonaz enziminin çok yönlü bir araştırma konusu olmasının en önemli nedenlerinden biri budur (8).

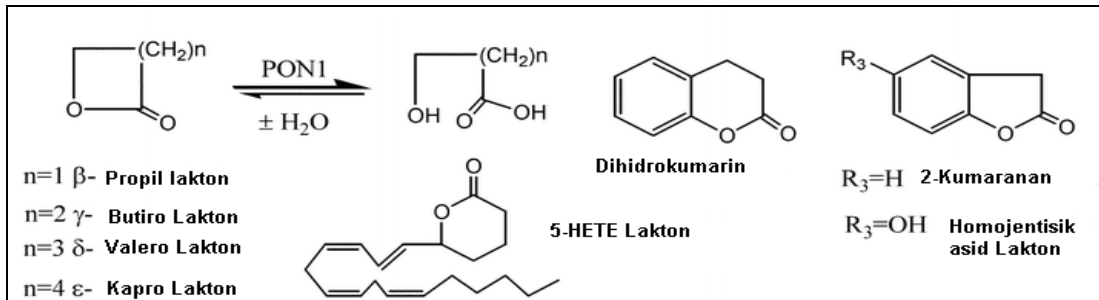
Paraoksonaz enziminin PON1 aktivitesi, substrat olarak paraokson kullanıldığında ölçülen aktivitesidir ve bu substrat enzime ismini vermiştir. PON1'in arilesteraz aktivitesi ise substrat olarak fenilasetat kullanılması ile ölçülen aktivitesidir (8) (Şekil 2). Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenmemiştir. Ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3). Söz konusu aktivitelerin tümünün tek bir aktif merkezde mi yoksa birden fazla aktif merkezde mi gerçekleştiği ve substrat seçiciliğinin nasıl belirlendiği de henüz tespit edilmemiştir (9).



Şekil 1. Paraoksonun Enzimatik Hidrolizi (Azarsız E, Sözmen EY 2000; Turk J Biochem; 25(3):109-19' dan alınmıştır)



Şekil 2. Aromatik esterlerin hidrolizi (Billecke, S., Dragonov, D ve arkadaşları 2004; (2000). Drug Met Dis. 28, 1335-1342'den alınmıştır)



Şekil 3. Lakton hidrolizi . (Billecke, S., Dragonov, D ve arkadaşları 2004; (2000). Drug Met Dis. 28, 1335-1342'den alınmıştır)

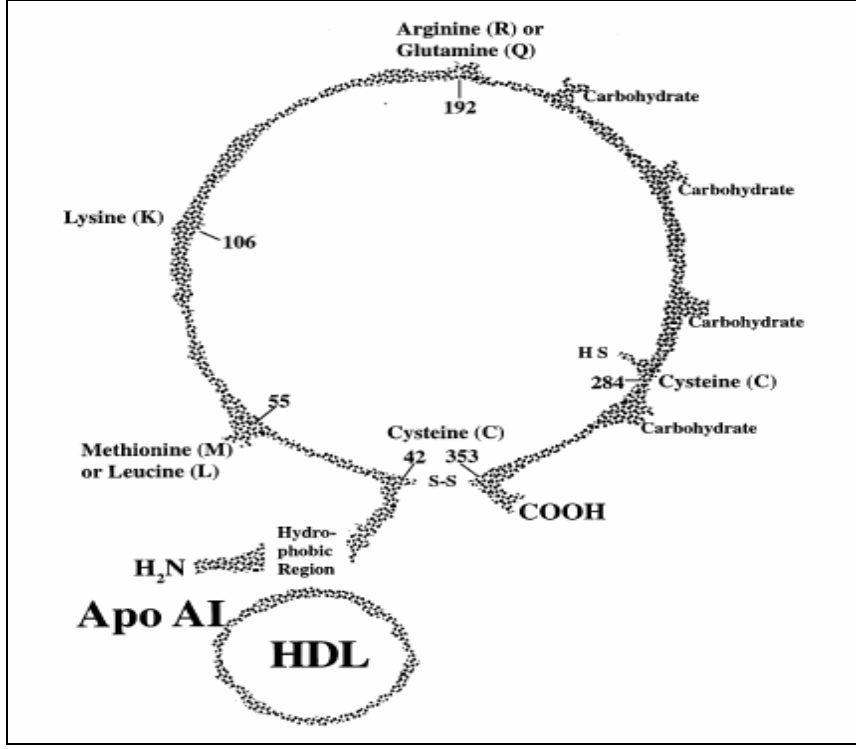
PON1 [(PON) arildialkilfosfataz, E.C.3.1.8.1.] ve arilesteraz [(ARE) E.C.1.1.2] her ne kadar iki ayrı enzim olarak algılansa da, yapılan çalışmalar sonucu insan serumunda tek gen ürünü enzimin hem ARE hem de PON1 aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (8, 9).

Paraoksonazla ilgili çalışmalar organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeni ile önceleri toksikoloji alanında iken son yıllarda antioksidan etkileri nedeni ile konu güncellik kazanmış; farklı kardiyovasküler hastalıklarda enzim aktiviteleri incelenmiş, lipoproteinlerle ve lipid peroksidasyonu ile ilişkisi araştırılmış ve enzimin aminoasit dizisi belirlenmiştir (8).

Son yıllarda yapılan yapı, aktivite çalışmalarında, PON1'in doğal aktivitesinin laktonaz olduğunu bildirilmiştir ve son yayınlar, enzimi Ca-bağımlı lipofilik laktonaz olarak tanımlamaktadır (9, 11). PON1 özellikle LDL ve HDL lipitlerinin okside olmasını önleyerek ve HDL ile LDL'de 5-hidroksieikozotetraenoik asit lakton gibi yağ asidi oksidasyon ürünlerini metabolize ederek ateroskleroza karşı koruyuculuğunu sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile göstermekte denmektedir (9, 11). PON1 ile yapılan enzim aktivite çalışmalarında enzimin lakton halkası içeren ilaçları ve ilaç ön maddelerini hidrolize ettiği gösterilmiştir. PON1 enzimi prulifloksasin'i aktif kinolon antibiyotiği NM394'e hidrolize eder. Yine diüretik bir ilaç olan spironolakton ve 3-hidroksimetilglutaril-KoA redüktaz inhibitörleri olan mevastatin, lovastatin ve simvastatin bu enzim tarafından hidrolize edilir (9).

2.2.1. Paraoksonaz enziminin yapısı ve özellikleri

İnsan PON1 proteini 354 aminoasitten oluşan, 43 kDa molekül ağırlığında glikoprotein yapıda bir moleküldür. İzoelektrik noktası 5.1'dir. Yapısında üç karbonhidrat zinciri vardır (total ağırlığın %15.8'i) (8). Aminoasit içeriğinde yüksek miktarda lösin bulunur, ayrıca katalitik bölgede üç sistein aminoasidi mevcuttur. Bunlardan 284. pozisyondaki serbest halde iken, diğer ikisi (42.-352. amino asitler) arasında disülfid bağı bulunur (Şekil 4). Bu bağ ile yapı stabilize edilir (8, 12).



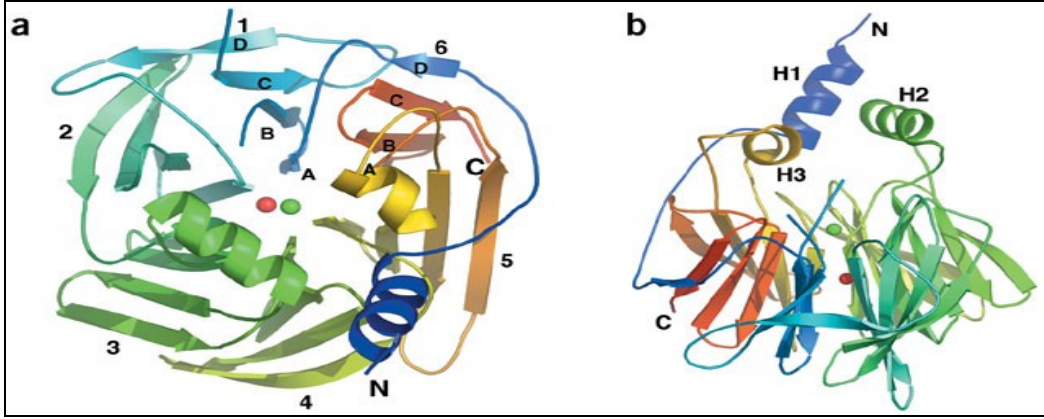
Şekil 4. PON1 enziminin yapısı (Azarsız E, Sözmen EY 2000; *Turk J Biochem*; 25(3):109-19' dan alınmıştır.)

PON1, pervane şeklinde yerleşmiş ve herbiri 4 sıradan oluşan 6 adet β tabakadan meydana gelmiştir (Şekil 5). PON1'in yapısında hem stabilite hem de aktivite için iki adet kalsiyum iyonu bulunur (8). Yapısal kalsiyum uzaklaştırılırsa geri-dönüşümsüz denatürasyon meydana gelir. Kalsiyum direkt katalitik reaksiyonda yer alır veya aktif alanın uygun konformasyonunu sağlar. Ayrıca paraoksonun "P=O" bağımlı polarize ederek fosforun nükleofilik saldırıya yatkınlığını sağlar ve böylece dietilfosfatın aktif alandan ayrılmasını kolaylaştırır. Kalsiyum iyonunun aktivitede oynadığı önemli rolden dolayı enzim aktivitesinin ölçümünde serum yada heparinli plazma kullanılır (8, 9). PON1'in organofosfat substratlarına karşı hidrolitik aktivitesi kalsiyuma bağımlı iken, lipid peroksidlerin birikimini önlemede kalsiyumun gerekli olmadığı bildirilmektedir (9).

PON1'in yapısında 3 tane hidrofobik heliks yapısı (H1, H2 ve H3) vardır (Şekil 5). H2 ve H3 hidrofobik heliksler aktif bölgede bulunmaktadır ve aktif bölge, enzimin HDL'ye bağlanmasında rol oynamaktadır (12).

PON1 üzerinde 4 tane potansiyel N-glikozillenme bölgesi vardır. İki tanesi (Asn 227 ve Asn 270) β -kırmalı tabakaların merkezinde, diğer ikisi yüzeye bakan

bölgede (Asn 253 ve Asn 324) yer almaktadır. PON1 memeli hücrelerinde eksprese edildikten sonra bu noktalardan glikozillenir (12). PON ailesinin hidrolitik aktivitesi için glikozilasyon önemli değildir (12). Ancak enzimin yapısında bulunan bu karbohidrat moleküllerinin hücre membranlarına spesifik olmayan bağlanmada veya kararlılığı ve çözünürlüğü arttırmada etkili olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 5. PON1 proteininin üç boyutlu yapısı. (a) 6'lı β pervane yapısının üstten görünümü. N, C terminali ve merkezde 2 kalsiyum iyonu (Ca1, yeşil; Ca2, kırmızı) (b) 6'lı β pervane yapısının yandan görünümü. H1, H2, H3 helixlerinin görünümü (Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov ve arkadaşları 2004; Nat Struct Mol Biol. 11, 412-9'den alınmıştır)

İnsanlarda 7. kromozomun uzun kolunda, q21.3 bölgesinde birbirine komşu oldukları bildirilen, PON1, PON2 ve PON3 olarak adlandırılmış, üç adet PON geni bulunur ve bu üç gen PON gen ailesi olarak adlandırılır (9, 12). Farelerde de 6. kromozom üzerinde üç gen birbirine komşu olacak şekilde konumlanmıştır (13). PON1 geninin 9 ekzonu ve 8 intronu bulunmaktadır. Genin boyutu 26,86 kb'dır ve mRNA'sı 2393 baz çiftidir.

PON1, PON2, PON3 genlerinin ürünü olan proteinler, aminoasit dizilimi açısından birbirleriyle yaklaşık %53 homoloji göstermektedir (12). Her üç proteinin dokulardaki ekspresyonları, dağılımları birbirinden farklıdır. PON1 proteini karaciğer ve pankreasta yüksek, beyin ve akciğerde ise az miktarda eksprese olmaktadır. Sentezlenen ve dolaşıma katılan PON1 HDL yapısında yer almakta,

toksik bazı bileşiklerin metabolizmasının yanı sıra plazmada lipoproteinlerin oksidasyonunu önlemede rolü olduğu düşünülmektedir (14).

Genetik faktörler ve çeşitli çevresel faktörler PON1 ekspresyonunu ve aktivitesini düzenler. PON1 aktivitesi bireyler arası (10 kattan 40 kata kadar) ve etnik gruplar arası değişkenlik gösterir, cinsiyete bağlı değişiklik gözlenmez (15, 16). Serum PON1 düzeyinin ve aktivitesinin bireyler arasında değişken oluşunun bir nedeni PON genindeki kodlama ve promotor bölgelerinde çok sayıda polimorfizm bulunmasıdır. Bireyler arasındaki değişkenliğin diğer sebebi beslenme şekli ve alışkanlıklardır. Sigara PON1 düzey ve aktivitesini geri dönüşümsüz olarak azaltır (17). Farelerle yapılan çalışmalarda yüksek kolesterol içeren diyetin karaciğer dokularında PON1 mRNA düzeylerini düşürdüğü izlenmiştir (18).

PON2 proteini karaciğer, beyin, kalp, böbrek, aort düz kas hücreleri ve testis dokularında (endotel tabakasında) hücre içi protein olarak eksprese edilir, arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesi yoktur (10).

PON3 karaciğerde sentezlenip, serumda HDL ile birlikte bulunmaktadır. PON1'e göre arilesteraz aktivitesi sınırlıdır ve paraoksonaz aktivitesi yoktur ama statin gibi laktonları hidrolize edebilir (9, 10).

2.2.2. PON1-HDL ilişkisi

HDL partikülünün antioksidan aktivitesi, taşıdığı apolipoproteinler (apoA-1, apoE, apoJ, apoA-2, apoA-4) ve enzimler ile ilişkilidir. HDL molekülünün majör antioksidan aktivite içeren enzimleri PON1, PAFAH, lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) ve glutatyon peroksidaz'dır (GSPx) (6). Hem PON1'in hem de PAFAH'ın öncelikle LDL'de oluşmuş okside fosfolipidleri hidrolize uğratarak ateroskleroz gelişimine karşı koruyucu oldukları gösterilmiştir. Ancak PON1 enziminden yoksun fareler kullanılarak yapılan çalışmalarda PAFAH'ın bu işlevi PON1 olmadan yerine getiremediği ve bu korumadan birincil sorumlu enzimin PON1 olduğu bildirilmiştir (18).

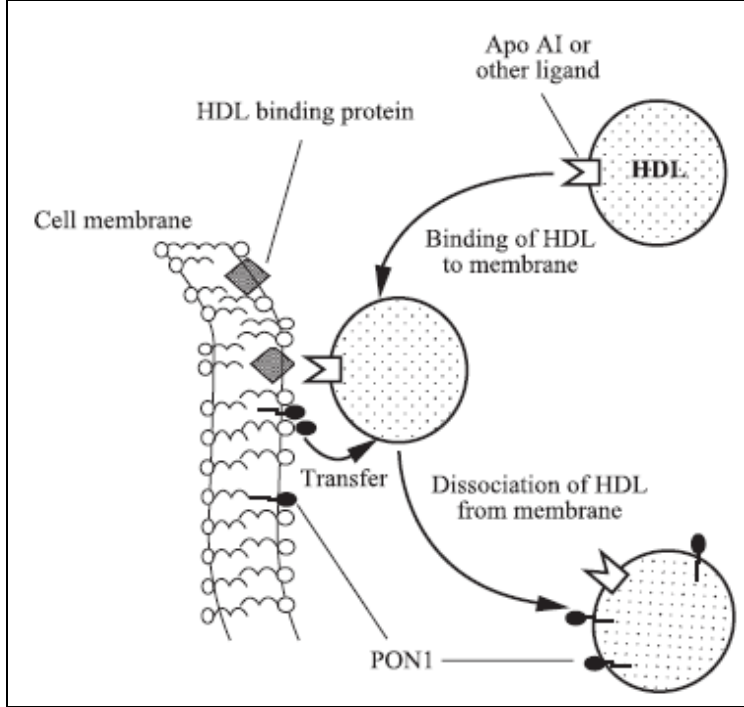
PAFAH ve LCAT enzimleri de LDL'ye bağlı okside fosfolipidleri hidroliz ederler, ancak okside fosfolipidleri hidroliz eden bu üç enzim arasındaki ilişki açık değildir. PAFAH'ın HDL'deki fosfolipidleri hidroliz edici etkisinin daha belirgin

olduğu gösterilmiştir (18). HDL ile ilişkili PON1'in makrofajlardan HDL'ye ATP'ye bağlı taşıyıcı protein (ABCA1) aracılı kolesterol akışını arttırdığı gösterilmiştir (19). PAFAH insanda, HDL'den çok LDL üzerinde bulunan bir enzimdir. HDL'ye özgü olan ve lipid peroksitleri hidroliz etmede güçlü etkisi olduğu bildirilen enzim ise PON'dur.

HDL alt gruplarından moleküler yapısı daha büyük olan HDL2'nin kardiyoprotektif etkisinin, moleküler yapısı daha küçük olan HDL3'e göre daha çok olduğu tespit edilmiştir. Ancak yapılan araştırmaların bazılarında PON1 enziminin daha çok HDL3 ile ilişkili olduğu, bazılarında ise HDL2 ile ilişkili olduğu da bulunmuştur. Bu konuda tam bir kesinlik mevcut değildir (20). PON1 taşıyan HDL alt grupları, ApoA1 ve Apo J (clusterin) proteinlerini de içermektedir. Apo AI ve Apo J'nin PON1'in fosfolipidlere bağlanması ve stabilizasyonunda rolü olduğu düşünülmektedir (12).

Deakin ve arkadaşlarının (21) Chinese Hamster Ovary (CHO) hücrelerini kullanarak PON1 salınımını incelediği hücre kültürü çalışmalarında lipoproteinlerin yokluğunda çok az PON1'in salındığını gözlemlenmiştir. Fosfolipid miçellerinin ve HDL'nin salınımını stimüle etmesine rağmen LDL'nin ve lipidsiz apoAI'in salınımında hiçbir etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar, PON1'in dolaşıma salınabilmesi için uygun bir alıcıya ihtiyacı olduğunu ve HDL'nin en etkili fizyolojik alıcı olduğunu göstermektedir. HDL yaklaşık 10 nm çapında, bileşiminde öncelikle membran bileşenleri (fosfolipidler, kolesterol ve kolesterol esterleri), apo AI ve amfipatik helikslerin yer aldığı bir partiküldür. PON1, N-terminalde hidrofobik bir sinyal dizisine sahiptir. PON1 salınımından önce bu bölgenin çıkarılmasıyla oluşturulan mutant-PON1'in HDL'ye bağlanamadığı gösterilmiştir (22). Bu da, PON1'in HDL'ye hidrofobik N-terminal sinyal dizisi ile bağlandığını göstermektedir. N-terminalin tamamı membranı geçen heliks yapıdadır (Şekil 5). N-terminal yapının 19-18 kalıntısı hidrofilik heliks yapıdadır ve heliks1 (H1) olarak adlandırılmaktadır. Heliks H2'de H1 gibi amfipatik yapıdadır. H1 ve H2 yapılarının birbirine yakın hidrofobik kısımları bir araya gelerek potansiyel membrana bağlanma yüzeyi oluştururlar (22). Hepatositlerin zarlarındaki fosfolipid çift tabakasında bulunan PON1 hidrofobik N-terminal sinyal dizisi ile HDL'deki fosfolipidlere bağlanır (22). Kan dolaşımı ile HDL periferdeki arterlere ulaşır ve burada PON1

endoteldeki fosfolipidlere taşınır, subendotelyal alanda antioksidan olarak görev yapar (22).



Şekil 6. PON1'in HDL'ye transferi (Richard W. James ve Sara P. Deakin 2004; *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 37, No. 12'den alınmıştır)

2.2.3. PON1 Aktivitesi ve PON1 Polimorfizmi

Epidemiyolojik ve moleküler çalışmalar sonucu, PON1 genininin kodlama ve promotor bölgelerinde çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. Farklı etnik geçmişleri olan populasyonlarda bu polimorfizmlerin görülme sıklığı değişir.

İlk olarak 1979'te Mallinckrodt ve arkadaşları (23) enzimin genetik polimorfizm sergilediğini ve enzimin aktivitesinin trimodal dağılım gösterdiğine dikkat çekmişlerdir. Kodon 192'de adenin yerine guanin bazının geçmesi (A→G mutasyonu), proteinde glutamin (Q genotipi) yerine arjinin (R genotipi) aminoasidinin yer almasına neden olur. Bu da bireylerde yüksek enzim aktivitesine yol açar (23).

PON1, enzim aktivitesi açısından QQ (eski adlandırma AA) homozigot, QR (eski adlandırma AB) heterozigot, RR (eski adlandırma BB) homozigot şeklinde trimodal bir dağılım gösterir. R alleli proteinin paraoksonaz aktivitesi Q alleleline göre 8 kat daha yüksektir. Homozigot RR bireyler yüksek aktivite gösterirken, QR heterozigot bireyler ılımlı yüksek ve QQ homozigot bireyler düşük aktivite gösterirler (24). Polimorfizm ARE aktivitesini etkilemez. Bu nedenle ARE aktivitesi PON1 aktivitesindeki değişikliklerden bağımsız olarak asıl protein konsantrasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir (25).

PON 1 fenotipleri kantitatif ve kalitatif olarak farklı özellikler gösterirler. PON1'e ait iki izoenzimin (Q ve R) tuz ve pH'a farklı yanıtlarını temel alan iki fenotip tanımlanmıştır. Paraokson, Q ve R izoenzimleri için ayırt edici bir substrattır. Tuz ile stimule edilen R fenotipi paraoksona karşı daha yüksek enzim aktivitesine sahiptir. 1M NaCl varlığında paraoksonazın düşük aktiviteli formu (Q) inhibe olur, yüksek aktiviteli formun aktivitesi ise (R) aksine maksimum düzeye çıkar. Paraoksonun Q ve R izoenzimleri için ayırt edici bir substrat olmasına karşın fenilasetat ayırt edici bir substrat değildir, her iki izoenzim tarafından da benzer hızlarda hidroliz edilir. Bu nedenle, 1M NaCl varlığında ölçülen ve tuzla uyarılmış PON1 aktivitesini veren değer, fenilasetat ile ölçülen ARE aktivite değerine bölünmesi ile elde edilen oran (PON1/ARE) fenotip tanımlanmasında kullanılır (25). Türkiye'de R alleli sıklığı doğu popülasyonuna göre daha düşük Avrupa ırkına yakın değerler göstermektedir (26).

2.2.4. Ateroskleroz ve PON1

PON1'in antioksidan enzim olması nedeniyle kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, sepsis, Alzheimer ve Parkinson gibi pek çok hastalığın gelişmesine karşı koruyucu rol oynayabileceği düşünülmektedir (27).

PON1 enzimi eksik olan farelerin diyet ile indüklenen ateroskleroza duyarlı hale geldikleri ve bu farelerin HDL'lerinin LDL oksidasyonunu önleyemedikleri gösterilmiştir (18). PON1'in LDL'nin yanı sıra HDL'yi de oksidasyondan koruduğu ve böylece makrofajlardan kolesterol çıkışını artırdığı gösterilmiştir. Bu durum

makrofajlarda kolesterol birikimini engelleyerek köpük hücre oluşumunu ve aterosklerozun gelişimini yavaşlatmaktadır (28). PON1, lipid peroksidlerin yanısıra hidrojen peroksit üzerine de etkilidir. Aterojenez sırasında arter duvarı hücrelerince üretilen majör toksik oksijen metaboliti olan hidrojen peroksit, oksidatif koşullarda daha potent ürünlere dönüşerek LDL oksidasyonuna neden olur. PON1'in okside LDL'deki kolesteril linoleat hidroperoksitlerini ve hidroksetleri indirgemesi nedeni ile peroksidaz benzeri aktivitesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca lipopolisakkarid inaktivasyonu yolu ile bakteriyel endotoksinlere karşı koruma sağlamaktadır (29).

Mackness ve arkadaşları (30) yaptıkları bir araştırmada obezite, dislipidemi, hipertansiyon, insülin direnci ve bozulmuş glukoz toleransı geliştirilen, kombine leptin ve LDL reseptör eksikliği olan farelerde düşük PON1 aktivitesi saptamışlardır. İnsan PON1 geninin adenovirüs aracılığı ile bu farelere enjeksiyonu sonucu, PON1 ekspresyonunun, ateroskleroz gelişimini inhibe ettiği, total plak hacmini azalttığı, plazmadaki ve plaktaki okside LDL miktarını azalttığını göstermişlerdir. PON1 ekspresyonunun, plazma total kolesterol, trigliserid düzeylerini ve HDL profilini etkilemediği bu nedenle PON1'in antiaterosklerotik etkisini lipid ve lipoproteinleri azaltarak değil, LDL oksidasyonunu azaltarak gösterdiği sonucuna varılmıştır.

PON1 QR polimorfizmiyle koroner kalp hastalığı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (8). Bazı çalışmalarda PON1 RR genotipinin koroner kalp hastalığında daha yüksek bir sıklıkla mevcut olduğu gösterilmiştir. Bu da PON1 RR gen polimorfizminin aterosklerozda bir risk faktörü olabileceği varsayımına yol açmıştır.

2.3. Endotel

Vasküler homeostazın ana düzenleyicisi endotel hücreleridir. Endotel hücreleri vasküler tonusu kontrol ederler, trombosit aggregasyonu ve düz kas hücre çoğalmasını inhibe ederler, vazoaaktif maddeler salgılayarak damar homeostazını korumada önemli bir rol üstlenirler (31). Endotel fonksiyon bozukluğu, aterosklerozda erken evrede gözlenen bozukluklardan birisidir. Endotel fonksiyon bozukluğunun invaziv ve non-invaziv yöntemlerle tayini aterosklerozun klinik bulgu vermeden erken evrelerde gösterilmesi açısından önemlidir. Endotel fonksiyon bozukluğunun önemli göstergelerinden birisi NO tayinidir. Bir diğeri ise, brakiyal arter doppler ultrasonografisi ile non-invaziv olarak akım aracılı genişlemeyi (flow mediated dilatation, FMD) belirlemektir.

2.3.1. Endotel Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

Endotel fonksiyonlarını değerlendirmenin esaslarından biri; endotelin NO salgılatan bir uyarana verdiği cevaba bakmaktır. Asetil kolin, bradikinin, serotonin gibi endojen yolla üretilen maddelerin intravenöz yolla uygulanması ve bunu takiben damar çapında veya akım hızındaki değişikliğin ölçülmesi de değerlendirme metodudur. Bu metodlar invaziv girişim gerektirmektedirler. Bu nedenle non-invaziv metodların araştırılması gündeme gelmiştir.

2.3.1.1. Brakiyal Arter Doppler Ultrasonografisi

Başlangıçta endotel fonksiyonları, koroner arter içine verilen vazoaaktif maddelere (asetil kolin ya da nitrogliserin) karşı oluşan vazomotor tonus cevabı ile değerlendirilmekte iken, arteryel yüksek rezolüsyonlu ultrasonografi (USG) cihazlarının gelişmesi ile birlikte endotel fonksiyonları non-invaziv olarak büyük yüzeyel arterler (örneğin: brakiyal arter) üzerinde incelenmeye başlanmıştır. Brakiyal arterin tercih edilmesinin sebebi, endotel yapısı ve aterosklerotik değişiklikler açısından koroner arterlerle korelasyon göstermesidir (32, 33).

Brakiyal arterden yüksek rezolüsyonlu ultrason ile akıma bağlı dilatasyonun (flow mediated dilatation; FMD) ve nitratla indüklenmiş dilatasyonun (nitrate induced dilatation; NID) değerlendirmesi, sırasıyla endotel bağımlı ve endotelden bağımsız vazodilatasyonu gösteren girişimsel olmayan testler olup, akıma bağlı dilatasyon ilk kez Celermajer ve arkadaşları (34) tarafından tanımlanmıştır.

Non-invaziv metotların esası; kan akımının geçici olarak kesilmesini sağlamaya dayanır. Ön kola uygulanan tansiyon aleti manşonunun sistolik basıncın birkaç mmHg üzerinde şişirilmesi ile bu geçici oklüzyon sağlanabilir. Yaklaşık 4-5 dakikalık oklüzyonu takiben, kan akım hızında ve bunu takiben damar çapındaki artış; üretilen NO miktarı ile doğru orantılıdır (33, 34).

Endotel; üzerinde bulunan “shear stress” reseptörleri sayesinde kan akım hızını algılayabilir. Bazal koşullarda kanın lineer akış hızını 15-20 cm/sn olacak şekilde düzenler. Endotelde azalan shear stress’e cevap olarak, akut vazodilatasyon ve kronik damar duvar kalınlaşması meydana gelir. Endotel disfonksiyonu varlığında; koroner kan akımındaki benzer artışa cevaben, vazodilatasyon meydana gelmemekte ve hatta belki de vazokonstriksiyon olmaktadır (31, 32). İskeminin bir komponenti de, artmış kan akımına cevap olarak uygunsuz damar vazokonstriksiyonuna yol açan endotel disfonksiyonudur.

Akıma bağlı vazodilatasyon; çoğunlukla NO’ya bağlıdır. Nitrik oksit sentaz inhibitörleri kullanılarak yapılan hayvan deneylerinde, reaktif hiperemi aşamasında vazodilatasyonun daha az olduğu görülmüştür (35). Spesifik NO sentaz inhibitörleri kullanılarak yapılan hayvan deneylerinde, kontrol grubuna göre 2 kat daha fazla ateroskleroz geliştiği saptanmıştır. Aynı şekilde, NO prekürsörü olan L-arginin uygulandığı zaman ise, kontrol grubuna göre ateroskleroz gelişiminin %50 azaldığı görülmüştür (36).

Endotel fonksiyonlarının değerlendirmesinde kullanılan en yaygın noninvaziv metod; yüksek çözünürlüklü brakiyal arter Doppler USG’dir. Ayrıca, koroner arterlerdeki endotel disfonksiyonu, brakiyal arterin endotele bağlı vazoreaktivitesinin bozulması ile paralellik göstermektedir (37). Bu nedenle bu metod, koroner kalp hastalıklarının predikte edilmesinde de kullanılabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Gereçler

pH metre (*WTW inoLab*, Almanya)

Otoanalizör (*Roche Diagnostic Hitachi Modüler P800*, Almanya)

Nefelometre (*Dade Behring BN Pro Spec*, Almanya)

Mikroplak okuyucu (*Tecan Infinite M200*, İsviçre)

3.2. Kimyasal Maddeler

Paraoxon (*Sigma*, USA)

Fenil asetat (*Sigma*, USA)

Tris Hidroklorür Bazı (*Sigma*, USA)

Kalsiyum klorür (CaCl_2) (*Sigma*, USA)

Sodyum klorür (NaCl) (*Sigma*, USA)

HDL ölçümü reaktifleri (*Roche Diagnostic*, Almanya)

Apo A1 ölçümü reaktifleri (*Dade Behring*, Almanya)

Diğer malzemeler

96 kuyucuklu polistren mikroplak (655160) (Greiner bio-one)

96 kuyucuklu sikloolefin mikroplak (655801) (Greiner bio-one)

3.3. Yöntemler

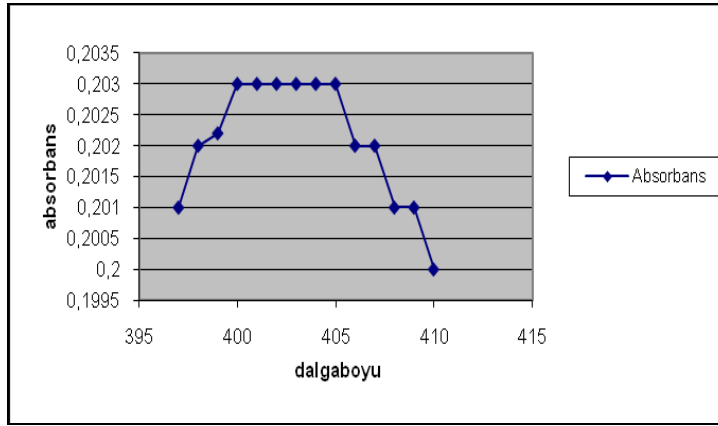
MAR-YÇ-2009-0290 protokol nolu çalışma 25.06.2009 tarihinde Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylandı. Çalışmaya bilinen kronik bir hastalığı olmayan ve kronik ilaç kullanımı olmayan fizik muayeneleri normal olan 85 gönüllü dahil edildi. Katılanların fizik muayeneleri, brakial ve karotis arter doppler-ultrasonografik değerlendirmeleri Kardiyoloji polikliniğinde gerçekleştirildi. 8 saatlik gece açlığını takiben alınan kan örneğinden

HDL, apo A1 çalışıldı. Her örnekten 1 mL ayrıldı ve -20°C’de dondurularak saklandı. Bu örnekler çözüldükten sonra PON1 ve ARE düzeyleri çalışıldı.

3.3.1. Paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümü

PON1 aktivite ölçümleri Eckerson’un yöntemi referans alınarak yapıldı (24). Yöntemin ilkesi, örnekteki PON1 enziminin paraokson substratını 37°C’de enzimatik olarak dietil fosfata ve paranitrofenole hidroliz etmesine dayanır (Şekil 1).

PON1 ölçümleri için spektrofotometrede 1 M paranitrofenol çözeltisi hazırlanarak dalgaboyu taraması yapıldı ve maksimum absorbans 405 nm’de elde edildi (Şekil 7).



Şekil 7. PON1 enzimi paraoksonaz aktivitesi dalgaboyu-absorbans taraması

Serum PON aktivitesi ölçümü, 2 mmol/L CaCl₂, 1 mol/L NaCl içeren 0,1 M Tris-HCl tamponu (pH 8) içinde değişik paraokson konsantrasyonları denenerek en uygun enzim substrat oranı bulunarak 37 °C’de, 405 nm dalgaboyunda kinetik olarak gerçekleştirildi.

Reaksiyonda oluşan paranitrofenol miktarı, örnekteki PON1 aktivitesi ile orantılı olduğu için, PON1 enzim aktivitesinin bir ünitesi (U), dakikada oluşan paranitrofenolün mikromol cinsinden miktarı olarak kabul edildi. Sonuçlar U/L olarak ifade edildi.

Mikroplaktaki kuyucuklarda ölçüm yapabilmek için serum havuzu oluşturularak enzim aktivitesinin birim zamanda lineer olarak arttığı en uygun substrat

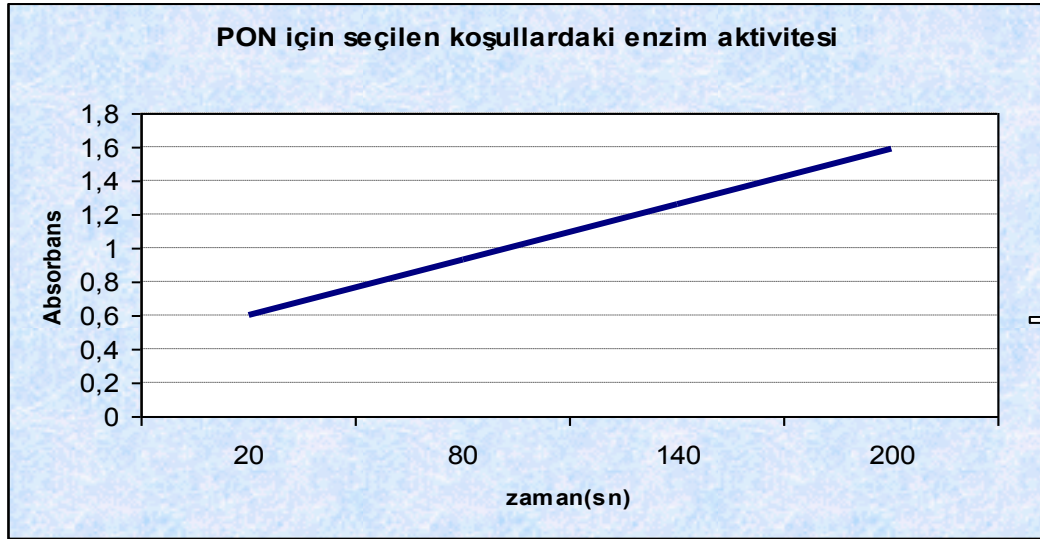
konsantrasyonu ve örnek seyrelme oranı seçildi. PON için nihai paraokson konsantrasyonu 3 mM ve örnek seyreltilmesi de 1:11 olarak bulundu. Enzim aktivitesi $\Delta A/\Delta t \times 1/e \times 1/\text{ışık yolu} \times \text{toplam hacim}/\text{örnek hacmi}$ formülü kullanılarak hesaplandı. Ölçümlerde polistren mikrolaklar kullanıldı.

Paranitrofenol için 37°C , pH:8, 405 nm dalgaboyunda molar absorbtivite katsayısı $\epsilon = 17600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alındı (25).

Işık yolu sabiti kuyucuğun total hacmi ve yarıçapı sabitleri kullanılarak hesaplandı .

$$220 \text{ mL} = \pi \cdot r^2 h = 3,14 \times (3,3175 \text{ mm})^2 \times h$$

$$h = 6.366 \text{ mm} = 0,6366 \text{ cm} \text{ bulundu.}$$

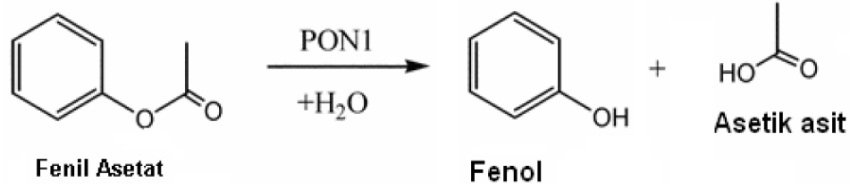


Şekil 8. Paraoksonaz enzim aktivitesi absorbans zaman grafiği

Ölçümlerimizin kesinliğini belirlemek için yeni bir serum havuzu oluşturuldu. Seçtiğimiz koşullarda solusyonlar hazırlandı. Plaklardaki kuyucuklara pipetlemeler yapıldı. Plaklarda ilk satırdaki kuyucuklarda blank ölçümler alındı. 48 örneğin enzim aktivitesi çalışıldı. Bu ölçümlerde ortalama enzim aktivitesi 323 ± 19 (ortalama \pm standart sapma) IU/L, CV %5,9 idi.

3.3.2. Arilesteraz enzim aktivitesi ölçümü

Arilesteraz aktivite ölçümleri Eckerson'un yöntemi referans alınarak yapıldı (25). Yöntemin ilkesi, örnekteki Arilesteraz enziminin fenil asetat substratını 37°C'de enzimatik olarak fenol ve asetik asite hidroliz etmesine dayanır (Şekil 9).



Şekil 9. Fenilasetatın enzimatik hidrolizi

Arilesteraz ölçümleri için spektrofotometrede 1 mol/L fenol çözeltisi hazırlanarak dalgaboyu taraması yapıldı ve maksimum absorbans 270 nm'de elde edildi

Serum arilesteraz enzim aktivitesi ölçümü, 2 mmol/L CaCl₂ içeren 0,1 M Tris-HCl tamponu (pH 8) içinde değişik fenilasetat konsantrasyonları denenerek en uygun enzim substrat oranı bulunarak 25 °C'de, 270 nm dalgaboyunda kinetik olarak gerçekleştirildi.

Reaksiyonda oluşan fenol miktarı örnekteki arilesteraz aktivitesi ile orantılı olduğu için, Arilesteraz enzim aktivitesinin bir ünitesi (U) dakikada oluşan fenolün mikromol cinsinden miktarı olarak kabul edildi. Sonuçlar kU/L olarak ifade edildi.

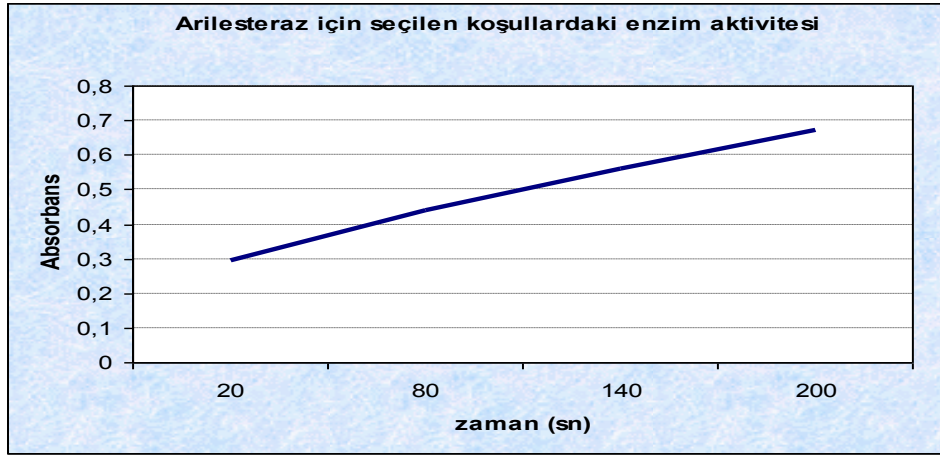
Mikroplaktaki kuyucuklarda ölçüm yapabilmek için serum havuzu oluşturularak enzim aktivitesinin birim zamanda lineer olarak arttığı en uygun substrat konsantrasyonu ve örnek seyrelme oranı seçildi Arilesteraz için nihai fenilasetat konsantrasyonu 1.9 mM ve örnek seyreltilmesi de 1:400 olarak seçildi. Enzim aktivitesi de $\Delta A/\Delta t \times 1/e \times 1/\text{ışık yolu} \times \text{toplam hacim}/\text{örnek hacmi}$ formülü kullanılarak hesaplandı. Ölçümlerde sikloolefin mikroplaklar kullanıldı.

Fenol için 25°C, pH:8, 270 nm dalgaboyunda molar absorbtivite katsayısı $C= 1297 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alındı (24).

Işık yolu sabiti kuyucuğun total hacmi ve yarıçapı sabitleri kullanılarak hesaplandı

$$200 \text{ mL} = \pi r^2 h = 3,14 \times (3,385\text{mm})^2 \times h$$

$h = 5,558 \text{ mm} = 0,555 \text{ cm}$ bulundu.



Şekil 10. Ariesteraz enzim aktivitesi absorbans zaman grafiği

Ölçümlerimizin kesinliğini belirlemek için yeni bir serum havuzu oluşturuldu, Seçtiğimiz koşullarda solusyonlar hazırlandı. Plaklardaki kuyucuklara pipetlemeler yapıldı. Plaklarda ilk satırdaki kuyucuklarda blank ölçümler alındı. 48 örneğin enzim aktivitesi çalışıldı. Bu ölçümlerde ortalama enzim aktivitesi $69,6 \pm 5,6$ (ortalama \pm standart sapma) kIU/L, CV %8,1 idi.

3.3.3. Apo A1 ölçümü

Apo A1 düzeylerinin ölçümleri immunonefelometrik yöntem kullanılarak yapıldı (38). Serum örnekleri BN ProSpec cihazında Dade Behring (Almanya) firmasının reaktifleri kullanılarak çalışıldı. Yöntemde serum örnekleri Apo A1'e karşı oluşturulan spesifik antikorlarla muamele edildi, meydana gelen immun komplekslerin 840nm dalgaboyunda yaptıkları saçılımlar ölçüldü. Saçılan ışığın şiddeti ile konsantrasyon doğru orantılı olduğu için standart hesaplandı ve ölçümler g/L olarak rapor edildi.

3.3.4.HDL ölçümü

HDL ölçümü, enzimatik kolorimetrik yöntem kullanılarak yapıldı (39). Serum örnekleri Hitachi Moduler P800 otoanalizöründe Roche Diagnostic (Almanya) firmasının reaktifi kullanılarak çalışıldı.

HDL düzeyi, polietilenglikol (PEG) kolesterol esteraz ve PEG kolesterol oksidaz kullanılarak enzimatik olarak belirlenir. PEG ile modifiye edilmiş kolesterol esteraz ve kolesterol oksidaz lipoprotein fraksiyonlarına karşı selektif katalitik aktivite gösterir. Kolesterol esterleri, PEG kolesterol esteraz enzimi etkisiyle serbest kolesterol ve yağ asidlerine ayrılır. Kolesterol, kolesterol oksidaz enziminin etkisiyle Δ^4 -Kolestenon ve hidrojen peroksida çevrilir. Hidrojen peroksid, peroksidaz enziminin etkisiyle 4-aminofenazon ve N-(2-hidroksi-3-sülfopropil)-3,5-dimetoksianilin (HSDA) ile etkileşerek pembe mavi renkte bir bileşik oluşturur. Rengin yoğunluğu HDL konsantrasyonu ile direkt orantılıdır ve spektrofotometrik olarak 600 nm'de belirlendi sonuçlar mg/dL olarak verildi.

3.3.5.FMD (Akıma Bağlı Vazodilatasyon) ölçümü

Çalışmamızda tüm kardiyolojik muayeneler, FMD ve CIMT ölçümleri aynı hekim tarafından gerçekleştirildi. İşlem öncesinde hastalar endotel fonksiyonlarını etkileyebileceği bilinen kafein, sigara benzeri maddeleri tüketmemeleri konusunda uyarıldı. 10 dakikalık dinlenme periyodu sonrası sabit sıcaklık ve sessizlik sağlanmış ortamda brakial arterin çapı ve Doppler ile kan akım hızı tesbit edildi.

Tekniğin esası; brakial arter çapının tansiyon aletinin manşonu şişirilmeden önce (bazal) ve manşon şişirilip 5 dakika bekletildikten sonra indirilmesini takiben hemen ölçülmesine dayanır. Bu yolla geçici olarak kan akımının oklüzyonu sağlanmakta ve ardından manşonun indirilmesi ile meydana gelen reaktif hiperemi; oklüzyona endotelin bir cevabı olarak meydana getirilen vazodilatasyonu (endothelium-dependent vasodilation) göstermektedir. Brakial arter Doppler USG ile kan akım hızı ve damar çapındaki artış ölçülmektedir.

Oklüzyon sonrası ölçüm manşon indirildikten 1 dakika sonra ve diyastolun sonunda yapılır ve $FMD = \text{arter çap farkı} / \text{bazal arter çapı} (\%)$ formülü ile hesaplanır.

3.3.6. CIMT (Karotis arter intima-medya kalınlığı) Ölçümü

Karotis arter intima-medya kalınlığı ölçümü ultrasonografi cihazı ile hasta supin pozisyonda boyun hafif ekstansiyonda iken yapılır. Hastanın vücut yapısı ve ultrasonografi cihazının özelliklerine göre uygun probler seçilerek ölçüm alınır.

3.3.7. İstatistiksel analiz

Verilerden normal dağılım gösterenler aritmetik ortalama \pm standart sapma, normal dağılım göstermeyenler ortanca (en küçük değer - en büyük değer) olarak ifade edildi. Gruplardaki parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Simirnov testi ile değerlendirildi. Ortalamalar arasındaki farkın anlamlılığı normal dağılıma uyanlar için Student's t testi, uymayanlar için Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Parametreler arası ilişki Pearson (r) ve Spearman (r_s) korelasyon testleri ile değerlendirildi. Sayısal olmayan değişkenler arasındaki ilişki ki-kare testi ile değerlendirildi. İstatistiksel analizler Windows uyumlu GraphPad InStat Version 3.05 programı ile yapıldı. İstatistiksel olarak p değeri < 0,05 ise anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma grubumuz yaşları 17 ile 62 arasında değişen 44 kadın, 41 erkek bireyden oluştu. Yaşları 35 ± 10 (ort \pm SD) olan grubun yaş dağılımı normal dağılıma uygundu. Tanımlanmış kronik bir hastalıkları olmayan, kronik bir ilaç kullanımı olmayan, arteriyel tansiyonları normal olan grupta 25 kişi aktif sigara içicisiydi. Çalışma grubunun demografik verileri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışma grubu demografik verileri

	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	En Küçük	En Büyük
Yaş (yıl)	35	10	34	17	62
Boy (cm)	169	10	167	150	192
Kilo (kg)	74	15	75	43	130
BMI (kg/m ²)	26,1	4,9	25,8	15,8	40,1
Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	86	11	84	60	122
Diastolik Kan Basıncı (mmHg)	121	12	126	91	138
Nabız/dk	75	9	72	54	115

Çalışma grubunun FMD değerleri $11,58 \pm 4,92$ (ort \pm SD) olarak bulundu. Çalışma grubunun doppler ultrasonografisi ile ölçülen CIMT değerleri $0,50 \pm 0,1$ (ort \pm SD) bulundu. Çalışma grubunun brakial arter ultrasonografisi ile değerlendirilen FMD ölçümleri ve ultrasonografik CIMT ölçümleri Tablo 2’de özetlendi.

Tablo 2. Brakial arter ultrasonografik değerlendirmesi ve CIMT

	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	En Küçük	En Büyük
Bazal Çap (mm)	3,44	0,61	3,49	1,82	5,35
FMD Çap (mm)	3,83	0,65	3,81	2,09	5,69
FMD (%)	11,58	4,92	11,84	2,03	29,89
CIMT (mm)	0,50	0,10	0,47	0,34	0,82

Grubun PON1 enzim aktivitesi değerleri normal dağılım göstermiyordu. PON1 enzim aktivitesi 290,1 (36,3 - 799,3) ortanca (en küçük-en byk) IU/L bulundu. Grubun ARE enzim aktivitesi $101,9 \pm 26,4$ (ort \pm SD) kIU/L idi ve normal dağılım gösteriyordu. Grubun HDL düzeyleri 49 ± 15 (ort \pm SD) mg/dL ve Apo A1 düzeyleri $1,2 \pm 0,3$ (ort \pm SD) g/L idi ve normal dağılım gösteriyorlardı. Çalışma grubu biyokimyasal parametrelerinin sonuçları Tablo 3’de özetlendi.

Tablo 3. Çalışma grubu serum PON, ARE, HDL ve ApoA1 değerleri

Serum Değerleri	Ortalama	Standart sapma	Ortanca	En Kkk	En Byk
PON (IU/L)	306,9	193,2	290,1	36,3	799,3
ARE (kIU/L)	101,9	26,4	101,1	37,4	159,4
HDL (mg/dL)	49	15	48	18	126
Apo A1 (g/L)	1,2	0,3	1,2	0,2	2,0

PON1 ve ARE enzim düzeyleri ile grubun diğer parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon olup olmadığı araştırıldı. PON1 enzim aktivite düzeyleri ile ARE enzim aktivite düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon vardı ($r_s = 0,56$, $p < 0,0001$). PON1 enzim aktivite düzeyleri ile FMD, CIMT, HDL, ApoA1, yaş, BMI, sistolik kan basıncı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon bulunmadı (Tablo 4).

Tablo 4. PON1 enzim aktivitesi ile yaş, BMI, sistolik kan basıncı, HDL, Apo A1, ARE enzim aktivitesi, FMD, CIMT arasındaki ilişki

PON (IU/L)	Yaş	BMI (kg/m ²)	Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	HDL (mg/dL)	ApoA1 (g/L)	ARE (kIU/L)	FMD (%)	CIMT (mm)
r_s	-0,06	-0,04	0,07	0,09	0,11	0,56	-0,19	-0,16
P	0,69	0,70	0,54	0,38	0,28	<0,0001	0,07	0,14

Çalışma grubunun HDL ile ApoA1 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon vardı ($r = 0,57$, $p < 0,0001$).

HDL ile BMI düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı ancak ters bir korrelasyon gösterildi ($r = - 0,47$, $p < 0,0001$).

Çalışma grubunun brakial arter ultrasonografisi ile ölçülen FMD değerleri ile CIMT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ancak ters bir korrelasyon vardı ($r = -0,25$, $p = 0,02$).

ARE enzim aktivite düzeyleri ile HDL düzeyleri ($r = 0,26$, $p = 0,01$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon bulundu. ARE enzim aktivite düzeyleri ile ApoA1 düzeyleri arasında ($r = 0,20$, $p = 0,06$) benzer korrelasyon vardı ancak istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmadı. ARE enzim aktivite düzeyleri ile CIMT arasında ($r = -0,23$, $p = 0,02$) istatistiksel olarak anlamlı ancak ters bir korrelasyon bulundu. ARE enzim aktivite düzeyleri ile FMD arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon yoktu (Tablo 5).

Tablo 5. ARE enzim aktivitesi ile yaş, BMI, sistolik kan basıncı, HDL, Apo A1, FMD, CIMT arasındaki ilişki

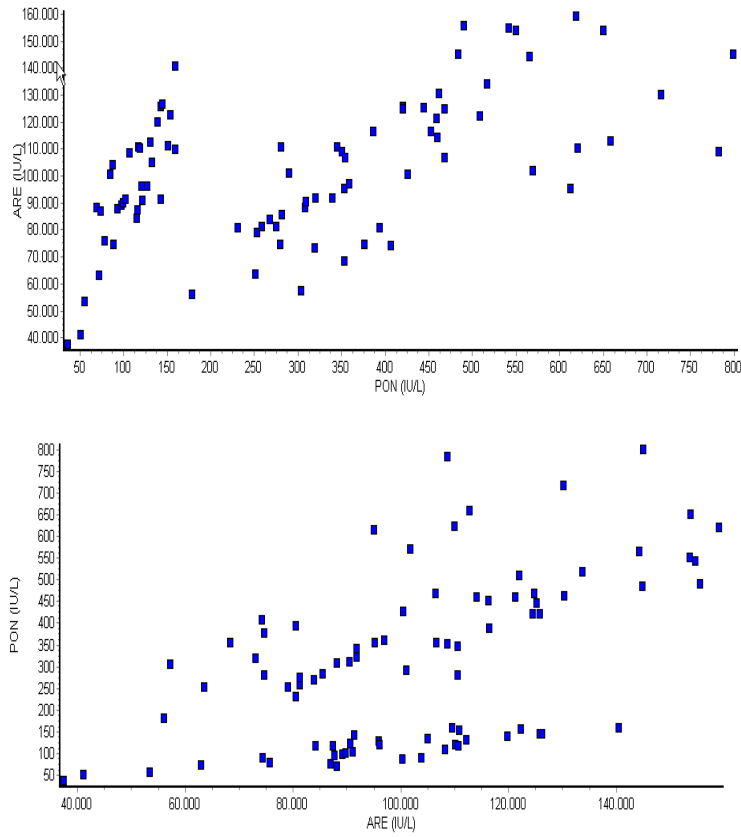
ARE (kIU/L)		Yaş	BMI (kg/m ²)	Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	HDL (mg/dL)	ApoA1 (g/L)	PON (IU/L)	FMD (%)	CIMT (mm)
	r		-0,04	-0,03	0,01	0,26	0,20	0,56	-0,07
p		0,66	0,75	0,91	0,01	0,06	<0,0001	0,50	0,02

PON1 enzim aktivitesindeki değişikliklerin HDL konsantrasyonuna bağlı olabileceği düşünülüp PON1/HDL oranları hesaplandı. PON1/HDL oranı ile BMI düzeyleri ($r_s = 0,24$, $p = 0,02$) istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon bulundu. PON1/HDL oranı ile sistolik kan basıncı düzeyleri arasında ($r_s = 0,23$, $p = 0,03$) istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon bulundu. PON1/HDL oranı ile ARE düzeyleri arasında ($r_s = 0,32$, $p < 0,01$) istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon bulundu. PON/HDL ile diğer parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon yoktu. (Tablo 6).

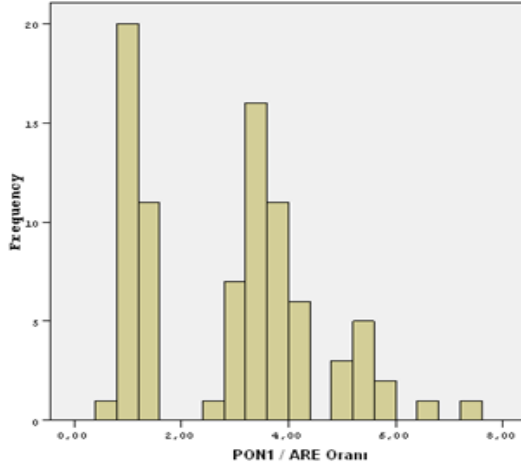
Tablo 6. PON/HDL oranı ile yaş, BMI, sistolik kan basıncı, Apo A1, FMD, CIMT arasındaki ilişki

PON/HDL		Yaş	BMI (kg/m ²)	Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	ApoA1 (g/L)	ARE (kIU/L)	FMD (%)	CIMT (mm)
	r_s	0,06	0,24	0,23	-0,15	0,32	-0,07	0,02
	p	0,55	0,02	0,03	0,16	<0,01	0,51	0,86

PON1 ve Arilesteraz enzim aktiviteleri saçılım grafiği hazırlandı ve PON1 aktivitesinin bimodal dağılım gösterdiği gözlemlendi (Şekil 11). PON1/ARE oranlarının frekans analizi de en az iki modu olan bir dağılım gösterdi (Şekil 12).



Şekil 11: PON1 ve ARE enzim aktivitelerinin birbirlerine karşı çizilmiş saçılım grafikleri



Şekil 12: PON1/ARE oranı frekans histogramı

Analiz sonucunda PON1/ARE oranı 1,45 den küçük olanların QQ homozigot fenotipte, 1,45 den büyük olanların QR ve RR fenotiplerinde yer aldıkları kabul edildi (25). Gen sıklığı değerleri QQ fenotip için 0,38, QR ve RR fenotipleri için 0,62 olarak hesaplandı.

QQ fenotipinde bulunanlar daha belirgin olarak ayrıştıkları için, çalışma grubu PON1 aktivitesi açısından düşük aktiviteliler (QQ) ve orta ve yüksek aktiviteliler (QR, RR) olmak üzere iki alt gruba ayrıldı. Böylece, PON aktivitesinin gösterdiği bi- veya trimodal geniş dağılımın olası korrelasyonları gizleme olasılığını görmek için bu alt gruplarda PON1 enzim aktivitesi ve PON/HDL oranları ile FMD, CIMT, HDL, ApoA1, yaş, BMI, sistolik kan basıncı arasında bir korrelasyon olup olmadığı değerlendirildi (Tablo 7- 10).

Fenotiplere göre alt gruplara ayırdığımızda da düşük aktiviteli (QQ) ve yüksek aktiviteli (QR, RR) bireylerde PON1 enzim aktivitesi FMD ve CIMT arasında istatistiksel olarak bir ilişkiye rastlanmadı.

Düşük aktiviteli (QQ) ve yüksek aktiviteli (QR, RR) bireylerde PON1/HDL oranı ile FMD ve CIMT arasında istatistiksel olarak bir ilişkiye rastlanmadı.

Düşük aktiviteli (QQ) ve yüksek aktiviteli (QR, RR) bireylerde PON1/HDL oranı ile BMI arasında sırası ile, ($r=0,39$ $p=0,03$) ve ($r=0,49$ $p<0,01$) anlamlı bir ilişki bulundu.

Yüksek aktiviteli (QR, RR) bireylerde PON1/HDL oranı ile sistolik kan basıncı arasında ($r=0,36$ $p=0,01$) anlamlı bir ilişki bulundu.

Tablo 7. PON1 enzim aktivitesi düşük (QQ) fenotipli bireylerde PON1 ile yaş, BMI, sistolik kan basıncı, HDL, Apo A1, FMD, CIMT arasındaki ilişki

QQ PON (IU/L) n=32		Yaş	BMI (kg/m ²)	Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	HDL (mg/dL)	Apo A1 (g/L)	FMD (%)	CIMT (mm)
	r	0,02	-0,12	-0,08	0,26	0,28	0,08	-0,18
p	0,93	0,49	0,67	0,14	0,12	0,63	0,31	

Tablo 8. PON1 enzim aktivitesi düşük (QQ) fenotipli bireylerde PON/HDL oranı ile yaş, BMI, sistolik kan basıncı, Apo A1, FMD, CIMT arasındaki ilişki

QQ PON/HDL n=32		Yaş	BMI (kg/m ²)	Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	Apo A1 (g/L)	FMD (%)	CIMT (mm)
	r	-0,08	0,39	0,25	-0,18	-0,04	-0,04
p	0,67	0,03	0,15	0,31	0,81	0,82	

Tablo 9. PON1 enzim aktivitesi yüksek (QR, RR) fenotipli bireylerde PON1 ile yaş, BMI, sistolik kan basıncı, HDL, Apo A1, FMD, CIMT arasındaki ilişki

QR, RR PON (IU/L) n=53		Yaş	BMI (kg/m ²)	Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	HDL (mg/dL)	Apo A1 (g/L)	FMD (%)	CIMT (mm)
	r	0,02	0,20	0,02	0,13	0,15	-0,02	-0,15
p	0,87	0,14	0,88	0,34	0,26	0,89	0,26	

Tablo 10. PON1 enzim aktivitesi yüksek (QR, RR) fenotipli bireylerde PON/HDL ile yaş, BMI, sistolik kan basıncı, Apo A1, FMD, CIMT arasındaki ilişki

QR, RR PON/HDL n=53		Yaş	BMI (kg/m ²)	Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	Apo A1 (g/L)	FMD (%)	CIMT (mm)
	r	0,21	0,49	0,36	-0,17	-0,01	0,11
p	0,14	<0,01	0,01	0,21	0,99	0,44	

Çalışma grubu düşük (QQ) ve orta-yüksek aktiviteliler (QR, RR) olmak üzere iki alt gruba ayrıldı. Düşük (QQ) ve orta-yüksek aktiviteli (QR, RR) bu iki grubun yaş, BMI, sistolik kan basıncı, HDL, Apo A1, FMD, CIMT, ARE ortalama değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak Student's t-testi ile değerlendirildi (Tablo 11). Çalışma grubunda düşük aktiviteliler (QQ) ve orta-yüksek aktiviteliler (QR, RR) FMD değerleri arasındaki fark anlamlı bulundu ($p=0,03$). Düşük aktiviteliler (QQ) ve orta-yüksek aktiviteliler (QR, RR) CIMT değerleri arasındaki fark anlamlı değildi ($p=0,15$).

Tablo 11. QQ genotipi ve QR, RR genotipi taşıyan grupta ölçülen parametrelerin ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel değerlendirmeleri

	QQ Genotipi (n=32)	QR, RR Genotipi (n=53)	p Değeri
Yaş	36,2 ±7,9	34,9 ±11,5	0,27
BMI (kg/m ²)	26,7 ± 5	25,7 ± 4,7	0,18
sis.KB (mmHg)	120,6 ± 12,6	121,9 ± 12,8	0,29
HDL (mg/dL)	48,9 ± 12,5	48,7 ± 15,7	0,48
FMD (%)	12,8 ± 5,6	10,8 ± 4,3	0,03
CIMT (mm)	0,5 ± 0,09	0,49 ± 0,1	0,15
Apo A1 (g/L)	1,24 ± 0,28	1,23 ± 0,27	0,45
PON (IU/L)	109 ± 33	426 ± 144,9	<0,0001
Ary (kIU/L)	94,6 ± 23,5	106,3 ± 27,2	0,02
PON/HDL	2,3 ± 0,8	9,57 ± 5,1	<0,001

Sigara ile PON1 aktivitesi arasındaki dağılımı incelemek için, sigara içenler ve içmeyenler ile düşük ve yüksek aktiviteliler olacak şekilde 4x4 olasılık tabloları hazırlandı. Sigara içimi ile düşük ve yüksek aktiviteye sahip olma dağılımı arasında ki-kare testi uygulanarak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulundu ($p=0,84$). Sigara içen ve içmeyen grupta ölçülen diğer parametrelerin ortalamaları arasındaki fark Mann Whitney testi ile değerlendirildi. Sigara içenlerde ApoA1, HDL ve ARE düzeyleri ortalamaları, içmeyenlerden anlamlı olarak daha düşüktü (sırası ile; $p=0,01$, $p<0,01$, $p=0,03$).

Tablo 12. Sigara içen ve içmeyen grupta ölçülen parametrelerin ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel değerlendirmeleri

	Sigara İçen (n=25)	Sigara İçmeyen (n=60)	p Değeri
Apo A1 (g/L)	1,17±0,27	1,26±0,28	p=0,01
HDL (mg/dL)	44,4±19,7	50,6±11,4	p<0,01
PON / HDL	8,3±8,0	6,2±3,7	p=0,41
ARE (kIU/L)	95,1±23,6	104,8±27,1	p=0,03
FMD (%)	11,6±4,6	11,5±5,0	p=0,41
CIMT (mm)	0,52±0,1	0,49±0,09	p=0,09

5.TARTIŞMA

PON1 enzimi karaciğerde sentezlenir, dolaşımında HDL yapısında yer alır, toksik bazı bileşiklerin metabolizmasının yanı sıra plazmada lipoproteinlerin oksidasyonunu önlemede rolü olduğu düşünülmektedir (14). PON1'in özellikle LDL ve HDL lipitlerinin okside olmasını önleyerek ve HDL ve LDL'de 5-hidroksieikozotetraenoik asit lakton gibi yağ asidi oksidasyon ürünlerini metabolize ederek ateroskleroza karşı koruyucu rolü olduğu düşünülmektedir (9,11). *In vivo* ve *in vitro* koşullarda PON1 eksikliğinde, LDL oksidasyonunun arttığı ve buna paralel olarak ateroskleroz gelişiminin hızlandığı gösterilmiştir (8, 18).

PON1 enzim aktivite tayini substrat olarak kullanılan paraoksonun 4-nitrofenol'e dönüşüm hızının kinetik olarak spektrofotometrik metotla ölçülmesi esasına dayanır. Biz ölçümlerimizi Eckerson'un yöntemini referans alarak mikropalak okuyucuya uyarladık. Literatürde mikropalak okuyucuda enzim tayininin yapıldığı başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Manuel spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde uygun görülen enzim substrat oranı seçilerek kuvartz küvetlerde tek bir örneğin kinetik ölçümleri gerçekleştirilir. Toksik paraokson ve fenilasetat substrat solusyonları ışıktan korunarak, en az 20 dakika süre ile karıştırılarak homojenize edilir. Bu ölçümlerdeki zorluklar arasında en önemlisi substrat çözeltilerinin iki saat içinde spontan hidroliz geliştirmeleridir. Küvetlerde tek tek ölçüm yapıldığından stabil ölçümler yapabilmek için süre kısıtlıdır. Çok örnekli çalışmalarda aynı substrat solusyonundan ölçüm gerçekleştirebilmek zorlaşır. Her ölçüm sonrası kuvartz küvetlerin toksik substat solusyonundan temizlenmesi gerekmektedir, aseton gibi çözücüler kullanılarak yapılan temizlemede küvette artıklar kalabilmektedir. Ayrıca farklı günlerde yapılan ölçümlerde ortamın ısı değişiklikleri, kullanılan tampon çözeltilisinin pH'sının stabilitesi gibi etmenler ölçülen enzim aktivitelerinde tutarsızlıklar oluşabilmesine neden olmaktadır. Bu nedenlerle PON1 ve ARE enzimlerinin ölçüm yöntemlerini mikropalak okuyucuya uyarlayarak daha fazla sayıda örneği eş zamanlı olarak çalışabilmeyi ve bir örneğin üçlü ölçümlerini alarak pipetlemeden kaynaklanabilecek hataları en aza indirmeyi sağladık. Sonuç olarak bir plakta 28 örneğin enzim aktivitesi 4 dakikada ölçüldü. Her plakta ilk 12 kuyucuğu blank ölçümleri için ayırdık. Ardarda serum havuzu ile yaptığımız ölçümlerde iki

plaktaki blank ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,08$), bu da bize solusyonlarımızda enzim aktivitesini etkileyecek spontan bir hidrolizin olmadığını gösterdi.

Bu çalışmada endotel disfonksiyonunun bir göstergesi olarak kabul edilen FMD ve CIMT değerleri ile paraoksonaz ve arilesteraz enzimleri arasındaki korrelasyon değerlendirildi.

Çalışma grubumuz tanımlanmış kronik bir hastalıkları olmayan ve kronik ilaç kullanımını olmayan, yaşları 35 ± 10 (ort \pm SD) olan 85 gönüllü bireyden oluşturuldu. Çalışma grubunun HDL düzeyleri 49 ± 15 (ort \pm SD) mg/dL, ApoA1 düzeyleri $1,2 \pm 0,3$ (ort \pm SD) g/L ölçüldü.

Çalışma grubunun FMD değerleri $11,58 \pm 4,92$ (ort \pm SD) idi. Literatürdeki görüş FMD değerleri %10 altında olan bireylerde endotel disfonksiyonu olduğu yönündedir (33). Bizim grubumuzdaki 31 kişinin % FMD değerleri %10'nun altında tespit edilmiştir.

Çalışma grubunun Doppler ultrasonografisi ile ölçülen CIMT değerleri ortalaması $0,50 \pm 0,1$ mm bulundu. Literatürde CIMT'nin normal değer aralığı ile ilgili bir kesin bir veri yoktur. Bazı çalışmalarda 0,6 mm, bazı çalışmalarda ise 0,8 mm üzerindeki değerlerin koroner aterosklerozla ilişkili olduğu kabul edilmektedir (40). Çalışma grubumuzda 11 kişinin CIMT değerleri 0,6 mm üzerinde ölçüldü.

Bu veriler çalışma grubumuzda klinik bulgusu olmayan fakat preaterosklerotik süreçte olan bireyler olabileceğini düşündürdü.

Çalışma grubunun brakial arter ultrasonografisi ile ölçülen FMD değerleri ile CIMT düzeyleri arasında anlamlı korrelasyon gösterildi ($r= -0,25$, $p=0,02$). Bu ilişki bize preaterosklerotik süreçteki endotel fonksiyonu bozukluğunun non-invaziv göstergeleri olan FMD ve CIMT ölçümlerinin tutarlı olduğunu düşündürdü.

Ölçümlerimizde çalışma grubunun PON1 enzim aktivitesi düzeylerini 290,1 (36,3- 799,3) IU/L bulduk. PON1 enzim aktivitesi değerleri istatistiksel olarak normal dağılım göstermiyordu. Literatürde sağlıklı insanlarda ölçülen PON1 enzim aktivitesi ölçümlerinin oldukça geniş bir değer aralığında olduğu görülmektedir. Mackness ve arkadaşları 282 sağlıklı bireyde yaptıkları ölçümlerde PON1 enzim aktivitesi ortalamasını 214,6 (26,3–620,8) IU/L (41), Yukio İkeda ve arkadaşları 161 sağlıklı bireyde yaptıkları ölçümlerde PON1 enzim aktivitesini 129 ± 62 (ort \pm SD) IU/L (42)

bulmuşlardır. Türkiyede yapılmış çalışmalarda da farklı sonuçlara rastlanmaktadır. Karakaya ve arkadaşları 51 sağlıklı bireyde yaptığı ölçümlerde PON1 enzim aktivitesini $321,29 \pm 16,04$ (ort \pm SD) IU/L (43) bulmuşlardır. Bulunan normal değerlerin farklı oluşunun nedenleri arasında; enzim aktivitesinin tayini için kullanılan metodun farklı olması, manuel yöntemlerdeki standardizasyon problemleri, enzim aktivitesi hesaplanırken kullanılan absorbtivite katsayısının farklı olması, grubun yaşlarının farklı olması, grup seçimi için kullanılan kriterlerin farklı olması ve popülasyonların farklı olması olabilir.

Grubun ARE enzim aktivitesi $101,9 \pm 26,4$ (ort \pm SD) kIU/L olup literatür ile uyumlu idi (24). Erel ve arkadaşları 160 sağlıklı bireyde yaptıkları ölçümlerde ARE enzim aktivitesi 169 ± 24 (ort \pm SD) kIU/L (44) bulmuşlardır. Sağlıklı insanlarda PON1 enziminin ARE aktivitesi ile yapılan çalışmalara daha az rastlanmaktadır. Fenilasetatin PON1 ile hidrolizini gösteren ARE aktivitesi PON1 polimorfizimlerinden etkilenmemektedir. Bu bağlamda fenilasetat ya da polimorfizim etkisinden bağımsız farklı substratlarla PON1 enzim aktivitesinin ölçülerek hastalıklarla ilişkisinin incelenmesi daha tanısal verileri sağlayabilir.

Çalışmamızda PON1 enzim aktivitesi ile HDL arasında ($r_s = 0,09$, $p=0,38$) ve PON1 enzim aktivitesi ile Apo A1 arasında ($r_s = 0,11$, $p=0,28$) istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyona rastlanmadı. ARE enzim aktivitesi ile HDL arasında ($r = 0,26$, $p=0,02$) istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon bulundu. ARE enzim aktivitesi ile Apo A1 arasında ($r = 0,20$, $p=0,06$) istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon yoktu. Bu durum PON1de aktivitede önemli değişikliklere yol açan polimorfizimlerin etkisi olabilir şeklinde yorumlandı. PON1 enzimi ile diğer parametrelerin korrelasyonlarının incelenmesinde enzim kütle ölçümleri ile de faydalı veriler sağlanabileceği düşünüldü.

Endotel disfonksiyonu zemininde gelişen aterosklerotik süreçlerde PON1 aktivitesinde azalma çalışmalarla desteklenmiştir (45). PON1 aktivitesinde azalma HDL'deki azalmaya bağlı olabilir. PON1 HDL'ye bağlı bir enzimdir, HDL azaldığı için, enzim miktarı dolayısıyla da enzim aktivitesi azalabilir. HDL'nin lipid çevresi değişmiş olabilir. Böylece, HDL ve PON1'in etkileşimi bozulabilir ve bunun sonucunda PON1 aktivitesi azalmış olabilir. PON1'in sentezi azalmış ve/veya

katabolizması artmış olabilir. Bu enzim lipid peroksidlerinin oluşumunu önlemektedir, bunu yaparken aktivitesi azalmış olabilir (16).

PON1 enzim aktivitesindeki değişikliklerin HDL konsantrasyonuna bağlı olabileceği düşünülüp PON1/HDL oranları hesaplandı. PON1/HDL oranları diğer parametreler arasındaki korrelasyonlar incelendi. PON1/HDL oranı ile ARE arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon vardı ($r_s = 0,32$, $p < 0,01$). Ancak yine PON1 enzim aktivitesi ile olduğu gibi PON1/HDL oranı ile FMD ($r_s = -0,07$, $p = 0,51$) ve PON1/HDL oranı ile CIMT ($r_s = 0,02$, $p = 0,86$) düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon bulunmadı.

PON1 enzim aktivitesi ve BMI düzeyleri arasında ($r_s = -0,04$, $p = 0,70$) bir korrelasyon yokken, PON1/HDL düzeyi ile BMI düzeyleri ($r_s = 0,24$, $p = 0,02$) ve sistolik kan basıncı düzeyleri arasında ($r_s = 0,23$, $p = 0,03$) istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon ortaya çıktı.

ARE enzim aktivitesi ile CIMT düzeyleri arasında ($r = -0,23$, $p = 0,02$) istatistiksel olarak anlamlı ancak ters bir korrelasyon mevcuttu. Bu korrelasyon klinik ateroskleroz belirtileri görülmeden endotel fonksiyonunu değerlendirmesi açısından ARE enzim aktivitesi tayininin daha değerli olduğunu gösterdi.

PON1 enzim aktivite düzeyleri ile ARE enzim aktivite düzeyleri arasında korelasyon testine göre istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcuttu ($r_s = 0,56$, $p < 0,0001$). PON/ARE oranı histogramına bakarak çalışma grubunda PON1 enzim aktivite düzeyleri yönünden bimodal bir dağılım olduğunu görüldü. Gen sıklığı değerleri QQ fenotipi için 0,38, QR ve RR fenotipleri için 0,62 olarak hesaplandı. Paraoksonaz/arilesteraz'ın polimorfik dağılımı ırklar arasında büyük değişkenlik göstermektedir (15). Avrupa populasyonlarında bimodalite ve % 53 düşük aktivite izoformu izlenmekte, Avrupa'dan uzaklaştıkça bu oran azalmaktadır. Afrika ve Uzakdoğuda dağılım unimodaldir, bu ırklarda düşük aktiviteli genotip saptanmamıştır. İngilizlerde PON1 aktivite dağılımının düşük ve yüksek aktivite alelleri içeren bimodal özellikte olduğu bulunmuştur (13). Aynacıoğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Türk toplumun PON1 QQ genotipi için gen sıklığı 0,49, QR ve RR genotipi için gen sıklığı 0,51 (46) bulunmuştur. Karakaya ve arkadaşları (43) trimodal dağılımı Türk populasyonunda göstermişlerdir. Bizim çalışma grubumuz kronik hastalığı olmayan, kronik ilaç kullanım hikayesi olmayan

85 kişiden oluşmaktaydı. Daha çok kişinin katılımıyla oluşturulan bir grupla orta ve yüksek aktiviteliler arasındaki ayrım ortaya çıkabilir ve trimodal bir dağılım gösterilebilirdi ya da PON1 gen tayinine yönelik incelemelerle kesin bir ayrım yapılabilirdi.

Polimorfizm tayini yapılan bazı çalışmalarda genotipler arasında koroner arter hastalığı gelişmesi açısından anlamlı farklar izlenmiştir. Mackness ve arkadaşları, İngiltere'de farklı iki bölgede PON1 polimorfizmi ile koroner arter hastalığı risk ilişkisini araştırdıklarında PON1R allel sıklığını koroner arter hastalığı ile ilişkili (47) bulmuşlardır. R alloenziminin lipid peroksidleri hidrolize edici etkisinin daha düşük, böylece LDL'nin oksidasyonunu geciktirmede daha az etkili olduğu ileri sürülmüştür (45). PON1 QR polimorfizmiyle koroner kalp hastalığı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda çelişkili sonuçlar da mevcuttur. Bazı çalışmalar da PON1 RR genotipinin koroner kalp hastalığında daha düşük bir sıklıkta olduğu ya da etkilemediği yönündedir.

Çalışmamızda fenotipleme yapılan çalışma grubu PON1 aktivitesi açısından düşük aktiviteliler (QQ) ve orta ve yüksek aktiviteliler (QR, RR) olmak üzere iki alt gruba ayrıldı. Bu alt gruplarda PON1 enzim aktivitesi ve PON/HDL oranları ile FMD, CIMT, HDL, ApoA1, yaş, BMI, sistolik kan basıncı, arasında ilişki istatistiksel olarak değerlendirildi.

İstatistiksel analizler sonucunda alt grupların (QQ, QR-RR) PON1 enzim aktiviteleri ile FMD değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon bulunmadı (sırası ile $r_s = 0,08$, $p=0,63$ ve $r_s = 0,02$, $p=0,89$).

İstatistiksel analizler sonucunda alt grupların (QQ, QR-RR) PON1 enzim aktiviteleri ile CIMT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon bulunmadı (sırası ile $r_s = -0,18$, $p=0,31$ ve $r_s = -0,15$, $p=0,26$).

İstatistiksel analizler sonucunda alt grupların (QQ, QR-RR) PON1/HDL oranları ile FMD değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon bulunmadı (sırası ile $r_s = -0,04$, $p=0,81$ ve $r_s = -0,01$, $p=0,99$).

İstatistiksel analizler sonucunda alt grupların (QQ, QR-RR) PON1/HDL oranları ile CIMT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korrelasyon bulunmadı (sırası ile $r_s = -0,04$, $p=0,82$ ve $r_s = 0,11$, $p=0,44$).

PON1/HDL oranı ile sistolik kan basıncı düzeyleri arasında ($r_s = 0,23$, $p=0,03$) istatistiksel olarak gösterilen ilişki QR-RR genotipli yüksek aktiviteli alt grupta da mevcuttu ($r_s = 0,36$, $p=0,01$). Kimura ve arkadaşları (48) yaptıkları çalışmada tansiyon artışı ile FMD'nin düştüğünü gözlemlemişlerdir.

Çalışmamızda PON1 ve arilesteraz enzim aktiviteleri ile FMD ve CIMT arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (Tablo 4, Tablo 5). Korelasyon katsayı değerleri negatifti. Negatif korelasyon katsayı değerleri düşük ve orta yüksek aktiviteli gruplarda gruplarda da gözlemlendi. Düşük ve orta yüksek aktiviteli gruplarda sigara içimi ile enzim aktivitesi arasında bir ilişki bulunmadı ($p=0,84$). Bu iki grubun yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi ($p=0,27$). Bu durum 53 kişiden oluşan orta-yüksek aktiviteli grupta enzim aktivitesi ile endotel fonksiyonlarını etkileyebilecek başka bir faktör olabileceğini düşündürdü. PON1 QR polimorfizmiyle koroner kalp hastalığı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalarda PON1 RR genotipinin koroner kalp hastalığında daha yüksek bir sıklıkla mevcut olduğu gösterilmiştir. Bu da PON1QR gen polimorfizminin aterosklerozda bir risk faktörü olabileceği varsayımına yol açmıştır (45). Bizim çalışmamıza benzer bir çalışma Mackness ve arkadaşları (47) tarafından İngiltere'de yapılmıştır. Farklı iki şehirden oluşturulan 186 ve 165 kişiden oluşan sağlıklı iki grupta PON1 enzim aktivitesi ve PON1QR polimorfizmini incelemişlerdir. R alleli yüksek ve PON1 enzim aktivitesi yüksek grup koroner arter hastalığı açısından diğer gruba göre daha riskli bulunmuştur. Bu grubun serum PON1 enzim konsantrasyonu diğer gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük ölçülmüş. Bu sonuç bize enzim aktivitesi ölçümündense konsantrasyonu tayini ile daha anlamlı sonuçlar alınabileceğini düşündürdü.

Sigaranın LDL oksidasyonunu arttırarak PON1 enzim aktivitesini azalttığı çalışmalarla gösterilmiştir (15). Bizim çalışma grubumuzda sigara içimi ile düşük ve yüksek aktiviteye sahip olma dağılımı arasında ki-kare testi uygulanarak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulundu ($p=0,84$). Sigara içen ve içmeyen grupta ölçülen diğer parametrelerin ortalamaları arasındaki fark Mann Whitney testi ile değerlendirildi. Sigara içenlerde ApoA1, HDL ve ARE düzeyleri ortalamaları, içmeyenlerden anlamlı olarak daha düşüktü ve bu fark literatürle uyumlu olarak değerlendirildi (sırası ile; $p=0,01$, $p<0,01$, $p=0,03$) (15).

Sonuç olarak bu çalışma ile PON1 ve ARE enzim aktiviteleri tayini mikropalak okuyucuya uyarlanarak manuel spektrofotometrik yöntemle göre hem ölçüm tutarlılığı hem de ölçüm hızı yönünden üstün bir yöntem standardize edilmiş oldu. Bu yöntem ile sağlıklı bireylerde yapılan PON1 ve ARE enzim aktivite ölçümleri değerlendirildi. Çalışma grubunda PON1 aktivitesi yönünden bimodal bir dağılım izlendi. Yapılan PON1 ve ARE enzim aktivite ölçümleri ile endotel disfonksiyonunun non invaziv göstergesi kabul edilen FMD ölçümleri arasında bir korrelasyon yoktu. Yapılan PON1 ve ARE enzim aktivite ölçümleri ile grubun CIMT değerleri arasında olası bir korrelasyon incelendi. ARE enzim aktivite düzeyleri ile CIMT arasında ($r = -0,23$, $p = 0,02$) istatistiksel olarak anlamlı ancak ters bir korrelasyon bulundu. İncelenen tüm istatistiksel değerlendirmeler ışığında PON enzim kütle ölçümünün de yapıldığı daha çok katılımlı çalışmalar ile preaterosklerotik sürecin değerlendirilmesi açısından daha tanısal verilere ulaşılabilceği düşünöldü.

KAYNAKLAR

1. National Institutes of Health. Detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). NIH Publication 2001; No.01-3670
2. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell* 2001; 104: 503–516.
3. Pocock SJ, Shaper A G, Phillips A. Concentration of high density lipoprotein cholesterol, triglycerides and total cholesterol in ischemic heart disease. *British Medical Journal* 1989; 298: 998-1002.
4. Calabresi L, Gomaschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: From bench to bedside. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003; 23: 1724-1731.
5. Barter P. The role of HDL-cholesterol in preventing atherosclerotic disease. *European Heart Journals Supplements* 2005; 7: 4-8.
6. Ansell BJ, Watson KE ve diğerleri. High Density Lipoprotein Function Recent Advances. *Journal of the American College of Cardiology* 2005; 46(10): 1793-1798
7. Guerra R, Zhao B, Mooser V. Determinants of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: heritability and relationship to plasma lipoproteins. *Journal of Lipid Research* 1997; 38: 2281-2288
8. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *General Pharmacology* 1998; 31(3): 329-336.
9. Billecke S, Dragonov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, La Du BN. Human serum paraoxonases isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metabolism and Disposition* 2004; 28: 1335-1342.
10. La Du B, Novais J. Human serum organophosphatase. *Enzymes Hydrolysing Organophosphorus Compounds* (Edited by Reiner E., Aldrige W. N. and Hoskin F. C. G) 1989; pp. 41–52.
11. Jakubowski H. Calcium-dependent Human Serum Homocysteine Thiolacone Hydrolase. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 3957-3962.

12. James RW, Deakin SP. The Importance of High Density Lipoproteins for Paraoxonase-1 Secretion, Stability, and Activity. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 37(12): 1986-1994
13. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Conelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Current Opinion Lipidology* 1996; 7: 69-76.
14. Arrol S, Mackness MI, Durrington PN. Low density lipoprotein associated with enzymes and the prevention of low density lipoprotein oxidation. *European Journal of Laboratory Medicine* 1996; 4: 33-48
15. Ferre N, Camps J, Ballart JF ve diğerleri. Regulation of Serum Paraoxonase Activity by Genetic, Nutritional, and Lifestyle Factors in the General Population. *Clinical Chemistry* 2003; 49(9): 1491-1497
16. Costa LG, Vitalone A, Colea TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology* 2005; 69: 541-550
17. Nishio E, Watanabe Y. Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 236: 289-293
18. Rosenblat M, Vaya J, Shih D, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 2005; 179(1): 69-77
19. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, ve diğerleri. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 2008; 16: 284-287.
20. Bergmeier C, Siekmeier R, Gross W. Distribution Spectrum of Paraoxonase Activity in HDL Fractions. *Clinical Chemistry* 2004; 50(12): 2309-2315
21. Deakin S, Leviev I, Gomaschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 4301–4308
22. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, ve diğerleri. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and

- anti-atherosclerotic enzymes. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2004; 11: 412-419.
23. Mallinckrodt V, Geldmacher M. On the genetics of human paraoxonase (E.C. 3.1.1.2.). *Human Genetics* 1979; 50(3): 313-326
 24. Eckerson HW, Wyte C, La Du BN. The Human Serum Paraoxonase/Arylesterase Polymorphism. *The American Journal of Human Genetics* 1983; 35: 1126-1138.
 25. Eckerson HW, Romson J, Wyte C, et al. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *The American Journal of Human Genetics* 1983; 35(2): 214-27
 26. Azarsız J E, Sözmen E Y. Paraoksonaz ve klinik önemi. *Turkish Journal of Biochemistry* 2000; 25(3): 109-119
 27. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2001; 21: 473-480
 28. Rosenblat M, Vayab J, Shihc D, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 2005; 179: 69–77
 29. La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, Standiford TJ. On the physiological roles of the paraoxonases. *Chemico-Biological Interactions* 1999; 120: 379-388
 30. Mackness B, Quarck R, Verreth W, Mackness M, Holvoet P. Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006; 26: 1545-1550
 31. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cell. *Human Pathology*. 1987;18: 234-9
 32. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ ve diğerleri. Guidelines for the Ultrasound Assessment of Endothelial-Dependent Flow-Mediated Vasodilation of the Brachial Artery. *Journal of the American College of Cardiology* 2002; 39(2): 257-265

33. Frick M, Suessenbacher A, Alber HF ve diğ erleri. Prognostic Value of Brachial Artery Endothelial Function and Wall Thickness. *Journal of the American College of Cardiology* 2005; 46(6): 1006-1010
34. Celermajer D S, Sorensen K E, et al Non- invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340: 1111-1115
35. Cayette A J, Palacino J J, Cohen R A. Chronic inhibition of nitric oxid production accelerates neointimal formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1994; 14: 753-759
36. Hamon M, Vallet B, Bauters C, et al: Long-term administration of L-arginine reduces intimal thickening and enhances neoendothelium-dependent acetylcholine relaxation after arterial injury. *Circulation* 1994; 90: 1357-1362
37. Faulks MD, Wright A, Hoit B. Detection of endothelial dysfunction with brachialartery ultrasound scanning. *American Heart Journal* 2003; 145: 943-951
38. Sandkamp M. Apolipoprotein- Diagnostik: klinische relevanz. *Diagnose and Labor* 1990; 40: 37-43
39. Allain CC, Poon L S, Chan CSG. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry* 1974; 20: 470-475
40. Dijk JM, Graaf Y, Boots M. Carotid intima–media thickness and the risk of new vascular events in patients with manifest atherosclerotic disease: the SMART study. *European Heart Journal* 2006; 27 (16): 1971-1978
41. Mackness B, Durrington PN , Boulton AJM, Hine D ve Mackness MI. Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls. *European Journal of Clinical Investigation* 2002; 32(4): 259-264
42. Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, Nakauchi Y ve arkadaşları. Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998; 47(5): 598-602
43. Karakaya A, İbis S, Kural T, Köse SK, Karakaya AE. Serum paraoxonase activity and phenotype distribution in Turkish subjects with coronary heart

- disease and its relationship to serum lipids and lipoproteins *Chemico-Biological Interactions* 1999; 118: 193–200
44. Selek Ş. Anjiografi ile koroner arter hastalığı teşhisi konulan hastalarda yüksek dansiteli lipoprotein enzimleri olan paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktivitelerinin ve lipit oksitlenebilirliğinin araştırılması. Harran Üniversitesi Tıp fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Diyarbakır, 2006.
45. Mackness B, Mackness M . Paraoksonase 1: biochemistry and contribution to atherosclerosis. *International Congress Series* 2004; 1262: 91– 94
46. Aynacıoğlu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Nacak M, Tapanyigit EE, Roots I. Paraoksonase 1 mutations in a Turkish population. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1998; 157: 174-177
47. Mackness B, Mackness MI, Durrington PN, Arrol S, Evans AE, McMaster D, et al. Paraoksonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. *European Journal of Clinical Investigation* 2000; 30: 4-10.
48. Kimura Y ve diğerleri. Impaired endothelial functions in hypertensive elderly patients evaluated by high resolution ultrasonography. *The Canadian Journal of Cardiology* 1999; 15(5): 563-568