

**T.C**  
**Harran Üniversitesi**  
**Tıp Fakültesi**  
**Biyokimya Anabilim Dalı**

**ANJİYOĞRAFİ İLE KORONER ARTER HASTALIĞI TEŞHİSİ**  
**KONULAN HASTALARDA YÜKSEK DANSİTELİ LİPOPROTEİNİN**  
**ENZİMLERİ OLAN PARAOKSONAZ VE ARİLESTERAZ ENZİM**  
**AKTİVİTELERİNİN VE LİPİD OKSİTLENEBİLİRLİĞİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Dr.Şahbettin SELEK**

**Biyokimya Anabilim Dalı**  
**Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Özcan EREL**

**Şanlıurfa**  
**2006**

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>2.1. Koroner arter hastalığı</b> .....	3
<b>2.2. Aterosklerozun patogenezi</b> .....	3
<b>2.2.1. Normal arter duvarı</b> .....	3
<b>2.2.2. Aterogenezde rol alan hücreler</b> .....	4
<b>2.2.2.1. Endotel hücresi</b> .....	4
<b>2.2.2.2. Düz kas hücresi</b> .....	5
<b>2.2.2.3. Makrofajlar</b> .....	6
<b>2.2.2.4. Trombositler</b> .....	7
<b>2.2.2.5. T-Lenfositleri</b> .....	7
<b>2.2.3. Ateroskleroz patogenezinde rol alan maddeler</b> .....	7
<b>2.2.3.1. Adezyon molekülleri</b> .....	7
<b>2.2.3.2. Sitokinler</b> .....	8
<b>2.2.3.3. Büyüme Faktörleri</b> .....	8
<b>2.2.3.3.1. Platelet derivated growth factor (PDGF)</b> .....	8
<b>2.2.3.3.2. Fibroblast Growth Factor-<math>\beta</math> (FGF-<math>\beta</math>)</b> .....	9
<b>2.2.3.3.3. Transforming Growth Factor-<math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>)</b> .....	9
<b>2.2.3.3.4. Heparin-Binding Epidermal Growth Factor (HB-GF)</b> .....	9
<b>2.2.4. Aterogenezde temel basamaklar</b> .....	9
<b>2.2.4.1. Endotel disfonksiyonu</b> .....	9
<b>2.2.4.2. LDL'nin oksidasyonu</b> .....	10
<b>2.2.4.3. Köpük hücre oluşumu</b> .....	10
<b>2.2.4.4. Lipid çekirdeği'nin (lipid core) oluşumu</b> .....	11
<b>2.2.4.5. Fibröz başlık (fibrous cap) oluşumu</b> .....	12
<b>2.2.4.6. İmmün mekanizmalar</b> .....	12
<b>2.2.4.7. Plak vaskülarizasyonu</b> .....	13
<b>2.2.5. Ateroskleroz patogenezinin açıklamaya yönelik hipotezler</b> .....	13
<b>2.2.5.1. Hasara yanıt hipotezi</b> .....	13
<b>2.2.5.2. Monoklonal hipotez</b> .....	14
<b>2.2.6. Aterosklerozda Lipidler ve Lipoproteinler</b> .....	16
<b>2.2.6.1. Modifiye LDL</b> .....	16

2.2.6.2. Oksidan stres ve LDL oksidasyonu.....	17
2.2.7. Koroner arter hastalığı teşhis yöntemleri.....	29
2.2.7.1. Elektrokardiogram (ECG veya EKG).....	29
2.2.7.2. Stres testi (egzersiz ECG).....	30
2.2.7.3. Nükleer scanning.....	30
2.2.7.4. Koroner anjiyografi (veya arteriyografi).....	30
2.3. Paraoksonaz /Ariesteraz(PON1).....	31
2.3.1. Tarihçe.....	31
2.3.2. Genetik ve polimorfizm.....	31
2.3.3. Yapı ve etki.....	33
2.3.4. PON1'in diğer isimleri.....	36
2.3.5. PON1 ve organofosfatlar arasındaki ilişki.....	39
2.3.6. PON1'in substratları ve inhibitörleri.....	41
2.3.7. PON1 ve ateroskleroz arasındaki ilişki.....	42
2.3.8. PON1' in Ox-LDL ile etkileşimi.....	44
2.3.9.Çeşitli hastalıklarda PON1.....	46
2.3.10. Bakteriyel endotoksinlerin toksisitesine karşı koruma.....	48
<b>3. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>50</b>
3.1. Hasta seçimi.....	49
3.2. Kullanılan cihaz ve aletler.....	49
3.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	50
3.4. Paraoksonaz Aktivitesinin ölçümü.....	50
3.5. Aril esteraz aktivitesinin ölçümü.....	52
3.6. LDL oksidasyonu ve lag faz.....	52
3.7. Rutin biyokimya tetkikleri.....	53
3.8.Total peroksit ölçümü.....	53
3.9. Lipid hidroperoksit ölçümü.....	53
3.10. İstatistiksel analiz.....	54
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>55</b>
4.1. Anjiyografi sonuçlarına göre bulgular.....	55
4.2. PON1 fenotipine göre bulgular.....	59
4.3. Lipid oksidasyonuna göre bulgular.....	62
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>64</b>
<b>6.KAYNAKLAR.....</b>	<b>74-89</b>

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1:</b> <i>Doğal ve Ox-LDL özellikleri</i> .....	20
<b>Tablo 2:</b> <i>Farklı uyaranlarla LDL modifikasyonunda oluşan değişiklikler</i> .....	25
<b>Tablo 3:</b> <i>Hasta ve kontrol gruplarında fiziksel değerlerin karşılaştırılması</i> .....	55
<b>Tablo 4:</b> <i>Hasta ve kontrol gruplarının analiz sonuçları</i> .....	55
<b>Tablo 5:</b> <i>Hastalıklı damar sayısına göre analiz sonuçları</i> .....	56
<b>Tablo 6:</b> <i>Hasta grubundaki biyokimyasal parametrelerin korelasyon analizleri</i> .....	58
<b>Tablo 7:</b> <i>Kontrol ve hasta grubundaki fenotipik dağılım</i> .....	60
<b>Tablo 8:</b> <i>Hastalıklı damar sayısına göre fenotipik dağılım</i> .....	60
<b>Tablo 9:</b> <i>Hasta grubunun fenotipik dağılıma göre analiz sonuçları</i> .....	61

## ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: Normal arter duvar bileşenlerinin gösterimi.....	4
Şekil 2 'Hasara tepki" hipotezine göre aterosklerozun oluşumu.....	15
Şekil 3: LDL'nin yapısı .....	18
Şekil 4: LDL ve LDL reseptör tipleri.....	19
Şekil 5: Oksidasyon evreleri ve yakalayıcı reseptörler ile etkileşim .....	21
Şekil 6: PUFA peroksidasyonu .....	23
Şekil 7: Bakır indükleyici LDL oksidasyonu .....	29
Şekil 8: Paraoksonazın HDL ile etkileşimi .....	34
Şekil 9: PON1 Enziminin hücrelerden HDL'ye transferi .....	36
Şekil 10: PON1 enziminin üç boyutlu yapısı.....	37
Şekil 11: PON1'in aminoasit dizilimi.....	38
Şekil 12: PON1 ve hidroliz aktivitesi.....	40
Şekil 13: Paraoksonazın Substratları ve İnhibitörleri.....	41
Şekil 14: Paraoksonazın Substratları ve İnhibitörleri .....	41
Şekil 15: Oksidatif stress altında plazma LDL, HDL ve PON1 etkileşimi .....	45
Şekil 16: Hasta grubundaki PON1 enziminin fenotipik dağılımı .....	59
Şekil 17: Kontrol grubundaki toplam oksitlenebilirlik düzeyi ve lag fazları .....	62
Şekil 18: Hasta grubundaki toplam oksitlenebilirlik düzeyi ve lag fazları .....	63

## KISALTMALAR

KAH	: Koroner Arter Hastalığı
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
HT	: Hipertansiyon
DM	: Diabetes Mellitus
IDDM	: İnsülin Bağımsız Diabetes Mellitus
PON1	: Paraoksonaz/Arilesteraz
Ox-LDL	: Oksitlenmiş Düşük Dansiteli Lipoprotein
PGI <sub>2</sub>	: Prostaglandin
VWF	: Von Willebrand faktör
NO	: Nitrik oksit
ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
TNF- $\alpha$	: Tümör Nekrotizan Faktör- $\alpha$
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
PGE	: Prostaglandin
MCP-1	: Makrofaj Kemotaktik Proteini-1
MCSF	: Monosit Koloni Uyarıcı Faktör
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
IFN- $\gamma$	: İnterferon- $\gamma$
FGF- $\beta$	: Fibroblast Growth Factor - $\beta$
TGF- $\beta$	: Transforming Growth Factor- $\beta$
HB-GF	: Heparin-Binding Epidermal Growth Factor
Apo E	: Apolipoprotein E
Apo A	: Apolipoprotein A
Apo B	: Apolipoprotein B
MUFA	: Tek Karbonlu Doymamış Yağ Asidi
PUFA	: Çok Karbonlu Doymamış Yağ Asidi
mmLDL	: Çok az değişikliğe uğramış LDL
SOD	: Süper Oksit Dismutaz

MDA	: Malondialdehit
C	: Karbon Atomu
Lp (a)	: Lipoprotein (a)
MI	: Myokard infarktüsü
LOOH	: Lipid hidroperoksit
TBARS	: Thiobarbitürik asit reaksiyon maddeleri
HTL	: Homosistein Thiolacton
HTLase	: Homosistein thiolaktonaz
VLDL	: Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
AUC	: Area Under Curve (Eğri altı alan)
PON1/HDL	: Paraoksonazın HDL'ye oranı

## TEŞEKKÜR

Harran üniversitesi tıp fakültesi biyokimya anabilim dalında sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince hiçbir konuda desteğini esirgemeyerek beni teşvik edip yönlendiren, bana sadece hocalık değil, aynı zamanda bir baba bir ağabey gibi davranan Sayın Hocam Prof. Dr. Özcan EREL'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca eğitimim süresince her zaman destek, ilgi ve anlayışını gördüğüm, yetişmemde büyük katkıları olan Sayın Hocalarım Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT ve Doç.Dr.Nurten AKSOY'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin hazırlanmasında büyük katkıları olan kardiyoloji anabilim dalı öğretim üyeleri Doç.Dr.Recep DEMİRBAĞ ve Doç.Dr.Remzi YILMAZ'a teşekkürü bir borç bilirim. Yine tezimin hazırlanmasında büyük emekleri olan Öğretim Görevlisi Hakim ÇELİK ve Biyolog Necla ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca asistanlık eğitimim boyunca her türlü destek ve fedakarlıklarını gördüğüm tüm biyokimya personeline teşekkür ederim.

Son olarak sadece asistanlık eğitimimde değil hemen her konuda beni yalnız bırakmayan ve çocuklara sahip çıkıp uygun çalışma ortamı sağlayan eşim Ayşe'ye ve onları her gördüğümde bütün dert ve kederlerimi unutturan içimin gülen yüzleri; Oğlum Muhammed Feyyaz ve kızım Şeyda'ya sevgilerimle.....



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kalp ve damar hastalıkları tüm dünyada ve ülkemizde önde gelen ölüm nedenidir. Bu hastalıkların yaklaşık 2/3'nü koroner arter hastalığı (KAH) oluşturmaktadır (1).

Yapılan bir çok epidemiyolojik çalışmalar KAH oluşumunda bazı risk faktörlerinin eşlik ettiğini göstermiştir. Bu risk faktörleri; yaşam biçimi, biyokimyasal ve fizyolojik özellikler gibi değiştirilebilir nitelikte olabileceği gibi, yaş, cinsiyet ve kalıtım gibi değiştirilmesi yada giderilmesi olanaksız faktörlerde olabilir (2,3).

Koroner arter hastalığı oluşumunda, biyokimyasal parametrelerin içinde total ve LDL-kolesterol'ün yüksek olması, HDL-kolesterol'ün düşük olması, hipertansiyon, diabetes mellitus, obesite ve trombojenik faktörler'in etkisinin büyük olduğu unutulmamalıdır. Ayrıca sigara, alkol, sedanter yaşam gibi fizyolojik etkilerinde önemli bir rolü olduğunu hatırlatmakta fayda vardır.

Koroner arter hastalığı etiolojisinin multifaktöriyel bir özelliğe sahip olması nedeniyle KAH'na yakalanma riskinin belirlenmesi için, her bir risk faktörü'nün varlığı veya yokluğu yanında, derecesi veya şiddeti de belirlenmeli, bu kapsamda, değiştirilemeyen risk faktörlerine karşılık, varolan risk faktörlerinin değiştirilmesiyle neler sağlanabileceği hesaplanmalıdır (4).

Bizim toplumumuzda KAH gelişiminde rol oynayan en önemli risk faktörleri olarak kötü beslenme alışkanlığı, sigara içimi, diyabet, hipertansiyon, şişmanlık, okside LDL, trigliserit yüksekliği ile bunlarla ilişkili olan HDL-kolesterol düzeyi düşüklüğü ön plana çıkmaktadır (3).

Koroner arter hastalığına yol açan en sık ve en önemli etken ateroskleroz olup, aterosklerozun ise en önemli risk faktörü kan lipidleridir. Dolayısıyla KAH riskinin teşhisi konusunda yapılan çalışmaların büyük kısmı kan lipidlerin düzeyi olup, gelişmiş ve gelişmekte olan bir çok ülkelerde halkın büyük bir kısmında kolesterol seviyesi normalden yüksektir. Bu da yüksek KAH insidansı açısından önemlidir (5). Kolesterolün KAH riskiyle bağlantısı, yapısına girdiği lipoproteinlerin türüne ve miktarına göre değişmektedir. LDL'de bulunan kolesterol ateroskleroz nitelikte iken, HDL'deki kolesterol büyük ölçüde koruyucudur. LDL konsantrasyonunun düşmesi ve HDL kolesterol seviyesinin yükselmesi koroner lezyon oluşumunu geciktirmektedir (6,7).

Ateroskleroz; koroner arterlerde çok yavaş gelişen ve ancak uzun yıllar geçtikten sonra değişik derecelerde kalıcı darlıklara neden olan bir hastalıktır. KAH'nın patogenezinin

yalnız başına ateroskleroz sorumlu değildir. Ani olarak gelişen dinamik koroner olayların da (koroner arter spazmı, koroner arter trombozu) önemli rol oynadıkları anlaşılmaktadır. Kalıcı olsun dinamik olsun, olayların başlama noktası koroner arterlerde bölgesel olarak gelişen damar endotel fonksiyon bozukluğu ve/veya endotel zedelenmesidir (1).

Damar endoteli, sadece damar sistemini çepe çevre saran bir bariyer olmayıp, aynı zamanda dolaşım homeostazını ve kan basıncını dengeleyen, onarım olaylarını düzenleyen bir endokrin sistem olarak görev yapar. Endotel zedelenmesi durumunda kalp damar sisteminde ciddi patolojik olaylar meydana gelir. Hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve başka bir çok risk faktörü, endotel fonksiyonlarının bozulmasında ve/veya endotel zedelenmesinde önemli rol oynar, ateroskleroz ve dolayısıyla miyokard iskemisi gelişmesine neden olur (1). Endotel hasarı ile devam edip ateroskleroza kadar giden bu süreçte KAH oluşumunda çok ciddi etkileri olan ve henüz yeni yeni önemi farkedilen paraoksonaz ve arilesteraz enzimlerini araştırmayı ve lipid oksitlenebilirliği üzerinde amaç edinilmiştir.

Paraoksonaz/Arilesteraz (PON1) enzimleri glikoprotein yapısında olup karaciğer tarafından sentez edilen, aromatik karboksilik asit esterlerini hidroliz eden ve HDL'ye sıkıca bağlı olan esterazlardır (8-11). LDL'nin oksidasyonu ve dolayısıyla lipid peroksidlerinin birikimi sırasında HDL'nin bu enzimatik mekanizmalarla lipid peroksidlerini azalttığı bir çok çalışmalarla ortaya konulmuştur (11-16).

Paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri çevresel faktörlerden etkilenebilmekte ve popülasyonlara göre farklılık göstermektedir (16-20). Literatür taraması sırasında, farklı ülkelerde ve çeşitli hastalıklarda serum PON1 aktivitelerinin araştırıldığı görülmektedir. Ancak ülkemizde PON1 aktivitesinin aterosklerotik koroner arter hastalığı ile olan ilişkisini araştıran çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu nedenle, biz araştırmamızda sağlıklı ve aterosklerotik KAH olan bireyler ile PON1 aktivitesinin arasında nasıl bir ilişki olduğunu araştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Koroner Arter Hastalığı

Myokard hücrelerinin beslenmesini sağlayan koroner arterlerin direk veya dolaylı olarak etkileyen nedenler sonucu ortaya çıkan kardiyovasküler sistem hastalıklarına koroner arter hastalığı denir. Kalbi besleyen koroner arterler çıkan aortun dalları olan sol ana koroner arter ile sağ koroner arterdir. Sol ana koroner arterde sol ön inen dal ve sirkumfleks dal olmak üzere iki dala ayrılır. Koroner arterler musküler arter yapısında olup çapları genellikle 0,5-10 mm arasındadır. Kalp dakika hacminin %5'i koronerlerden geçmektedir. KAH tüm ölüm nedenleri arasında tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de ön sırada gelmektedir. KAH görülme sıklığı yaşla beraber artmaktadır. KAH'larının en önemli nedenlerinin başında %99 gibi oranda ateroskleroz gelmektedir. Bu nedenle koroner arter hastalıklarının yerine aterosklerotik kalp hastalıkları, iskemik kalp hastalıkları gibi terimlerde kullanılmaktadır. Diğer etiyolojik nedenler nadir görülmektedir (21).

### 2.2. Aterosklerozun Patogenezi

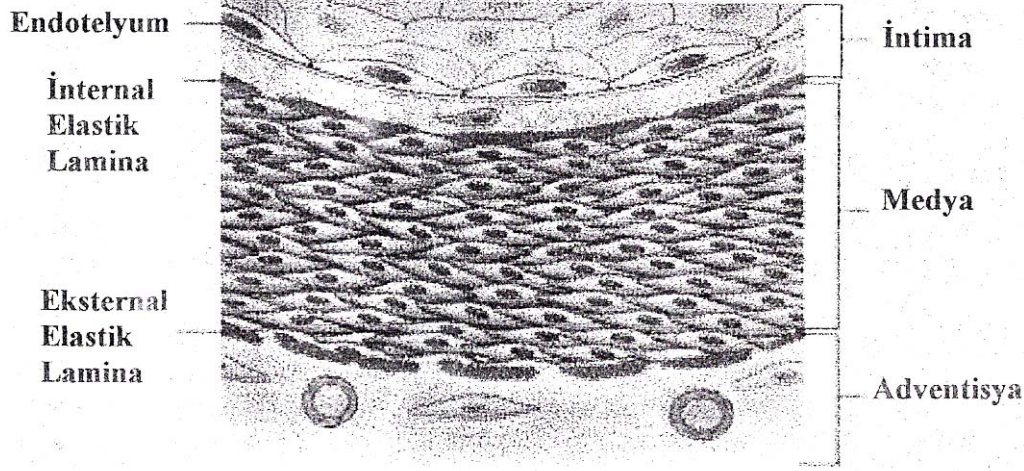
Ateroskleroz uzun süreli bir oluşumdur. Çeşitli faktörlerin etkisiyle uzun yıllar sonucunda oluşmakta ve etkileri ortaya çıkmaktadır. Yaklaşık 30-40 yıl kadar önce ateroskleroz, endotel altında lipid ve ölü doku parçacıklarının birikmesi olarak tarif edilirdi. Oysa şimdi çok iyi biliniyor ki, Ateroskleroz; etkilenen arterin intimasında yağ birikimi ile başlayan düz kas hücre proliferasyonu ile giden ve pek çok etkenin rol aldığı, sonuçta arter lümeninin daralmasıyla noktalanan bir süreci içerir (22,23).

Aterosklerozda rol alan hücreler ve aterosklerozun oluşum mekanizmasına girmeden önce normal arter duvarından kısaca bahsetmekte fayda vardır.

#### 2.2.1. Normal Arter Duvarı

Normal arter duvarı üç tabakadan oluşur (Şekil 1). En içte arter lümenini çepe çevre saran tabaka intimadır. Tek sıra biçiminde dizilmiş endotel hücreleri, bunları destekleyen subendotelyal matriks ve bazal membran intimayı oluşturur. Diğer memelilerden farklı olarak, insan intimasında az sayıda da olsa düz kas hücresi bulunmaktadır. İntima tabakasında bulunan endotel hücrelerinin yüzeyi dolaşımdaki kan ile sürekli temas halindedir. Arteriyel endotel hücreleri, vasküler homeostazın dengelenmesinde de yüksek öneme sahiptirler. Orta tabakaya media adı verilir. Kollajen, elastik lifler ve glikozaminoglikanlardan oluşan bir

matriks içinde konsantrik olarak dizilmiş düz kas hücrelerinden oluşur. En dış tabakaya ise adventisya denir. Gevşek bir bağ dokusu yapısında olan bu tabaka, kollajen lifleri, elastik lifler, fibroblastlar, sinir lifleri ve bazı düz kas hücrelerinden oluşmaktadır (21).



**Şekil 1.** Normal arter duvar bileşenlerinin gösterimi (24).

## 2.2.2. Aterogeneizde Rol Alan Hücreler

### 2.2.2.1. Endotel Hücresi

Arterlerin iç yüzeyini kaplayan endotel hücreleri devamlı, kesintisiz, sık bir tabaka oluşturmaktadır. Normal endotel oldukça seçici, geçirgen bir bariyer olup dolaşımdaki ürünlerin aktif transport ile girişlerini kabul etmektedir. Endotel tabakasının hemostaz, inflamasyon ve damar tonusuyla ilgili aktif fonksiyonları vardır ve günümüzde organizmanın en büyük endokrin organı olarak kabul edilmektedir (25).

Endotel hücreleri arasındaki bağlar, normalde albuminden daha büyük moleküllerin geçişine izin vermeyecek kadar sıkıdır. Lipoproteinler albuminden çok daha büyük olduğundan, endotel bariyerini ancak plazmolemma vezikülleri aracılığıyla geçebilirler. Bu mekanizma lipoprotein reseptörlerinden bağımsız olup ve kandaki lipoprotein düzeyiyle ilişkilidir. Endotelde herhangi bir hasar meydana geldiğinde, bu bariyer özelliği bozulmakta ve lipoproteinlerin subendotelyuma geçişi hızlanmaktadır. Endotel altına lipid geçişini takiben gelişen olaylar aterosklerozun gelişini hızlandırmaktadır. İntimaya yerleşen lipoprotein

moleküllerinin ilk oksidasyonu da yine endotel hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Ox-LDL' nin oluşması bir dizi zincirleme olayı tetikleyen ilk temel basamaktır (26).

Normal bir endotel yüzeyi heparan sülfatla kaplı olması ve salgıladığı prostasikline (PGI<sub>2</sub>) bağlı olarak anti-trombojenik bir yüzey oluşturur. PGI<sub>2</sub> kuvvetli bir vazodilatatör ve trombosit agregasyon inhibitörüdür. Endotel hücreleri ayrıca plazminojen de dahil olmak üzere fibrin yıkıcı ürünler salgırlar. Bununla beraber, prokoagulan etkileri de olan ve Von Willebrand faktörü (VWF) gibi pıhtılaşma faktörleri de salgılayan endotel'in bu özelliğinin sadece yaralanma durumunda açığa çıktığı düşünülmektedir (3).

Endotel hücrelerinin bir başka önemli özelliği de tek katlı olmaları ve iyileşirken bu özelliklerini korumak zorunda olmalarıdır. Diğer bir deyişle, hasar gören bölgelerde kümeleşerek kolay iyileşme sağlayamazlar, sadece bölgeyi çevreleyen hücreler rejenerasyondan sorumludur (4).

Yukarıda da sözü edildiği gibi, endotel hücreleri ayrıca aterogenezde rol oynayan çok sayıda maddenin ve bağ dokusu elemanlarının sentezinden sorumludur. Bunların arasında daha önce de adı geçen PGI<sub>2</sub> dışında, nitrik oksit (NO), endotelin, anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) gibi vazoaktif aminler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri ve tümör nekrotizan faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-1(IL-1) gibi endotel proliferasyonunu inhibe eden maddeler bulunmaktadır.

#### **2.2.2.2. Düz Kas Hücreleri**

Normal arter duvarının media tabakasında yer alan düz kas hücrelerinin esas görevi arter tonusunu sağlamaktır. Aterosklerotik plağın gelişimi sırasında mediadan intimaya geçen bu hücreler, lezyonun fibroproliferatif sürecinde görev alır. Bu yüzden, düz kas hücrelerinin intimada birikmesi, ilerlemiş lezyonun göstergesi kabul edilir (3).

Düz kas hücre kültüründe iki ayrı fenotip tanımlanmıştır. Birinci grup yoğun miyofibriller içeren kontraktıl fenotiptir. Bunlar media tabakasında yerleşiktir, endotelin, katekolamin, anjiotensin II gibi vazokonstriktörler ve PGE, PGI<sub>2</sub>, NO, nöropeptitler, lökotrienler gibi vazodilatatörlere yanıt verirler. Bununla beraber, örneğin PDGF gibi mitojenlere kayıtsızdır (3).

Kontraktıl fenotip uyarıldığında, kontraktıl elemanların azalması, granüllü endoplazmik retikulum ve golgi cisimciklerinde gelişme ile sentetik fenotip oluşur. Bu fenotip aterosklerotik lezyonlarda bulunan gruptur ve kontraktıl fenotipin aksine vazoaktif maddelere yanıtız kalırken, PDGF gibi mitojenler tarafından uyarılarak lezyonun proliferatif

aşamasında aktif rol alırlar. Bazı proteinlerin salgılanmasından ve bağ dokusu elemanlarının sentezinden sorumludurlar (27).

Düz kas hücreleri ayrıca, makrofajlar gibi lipoproteinleri fagosite edip, kolesterol esterleri şeklinde depolayarak "köpük hücrelerini" (foam cells) oluştururlar (3).

### **2.2.2.3. Makrofajlar**

Makrofajlar, dolaşımdaki monositlerden türeyen fagositik hücrelerdir. Her inflamatuvar olayda olduğu gibi, aterosklerotik plakta da yoğunlukla bulunurlar. Monositi kandan intimaya çeken güç, okside LDL pariküllerinin uyarıcılığı ile oluşan bazı kemotaktik maddelerdir. Bunlar arasında en iyi bilineni makrofaj kemotaktik proteini-1 (MCP-1)' dir. MCP-1, endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve makrofaj tarafından salgılanır. Dokuya geçen monosit, monosit koloni uyarıcı faktör (MCSF)'ün etkisi ile makrofaja dönüşür. MCSF'de, yine okside LDL'nin uyarıcılığı altında endotel hücrelerince salınır. Makrofajlar bir kez lezyona yerleştikten sonra, kendileri de pek çok biyolojik madde salgılayarak, yeni makrofajların gelmesini, düz kas hücreleri, fibroblast ve monositlerin çoğalmasını ve bağ dokusu sentezini uyarırlar (28).

Makrofajlar aynı zamanda köpük hücre oluşumunda asıl rol oynayan hücrelerdir. Daha önce endotel tarafından başlatılan LDL partiküllerinin oksidasyonunu makrofajlar tamamlar. Bu oksidasyon sonucunda, lipoprotein partikülünün üzerindeki apo B proteini, "çöpçü" (scavenger) reseptörler tarafından tanınacak şekle dönüşürler. Düz kas hücreleri üzerinde de "çöpçü" reseptörler vardır, ama aterosklerotik plaktaki esas fagositik hücreler yine makrofajlardır. Makrofajlar, "çöpçü" reseptörler aracılığıyla okside LDL' yi fagosite edip parçalarlar. Oluşan kolesterol bileşikleri, kolesterol esterleri şeklinde depolanır. Ancak hücrenin kolesterol yüklenmesiyle, "çöpçü" reseptör sayısında azalma (down regülasyon) olmadığından, depolanma işi hücrenin ölümüne dek sürer. Böylelikle, lipid damlacıklarıyla dolan makrofajlar köpük hücrelerine dönüşür (3).

Aterosklerotik plaktaki makrofajın ömrü kesin olarak bilinmemektedir. Fakat bu hücreleri bekleyen olası iki senaryo vardır. Ya plak içinde ölür ve diğer makrofajlar tarafından fagosite edilir, ya da plak üzerindeki endotelin sıyrılmasıyla kana karışır ve dalak ile lenf düğümleri tarafından dolaşımdan temizlenirler (3).

#### **2.2.2.4. Trombositler**

Aterogenezin hemen her aşamasında lezyon üzerinde trombosit kümeleri veya mural trombüsler görülebilir. Çekirdeksiz hücreler olduklarından protein üretememelerine karşın, içerdikleri granüllerde çok sayıda değişik mitojenler, sitokinler ve vazoaaktif maddeler taşırlar. Endotel hasarında olduğu gibi herhangi bir biçimde tetiklenen trombosit aktivasyonu ve agregasyonu, sonuçta degranülasyona ve bu maddelerin salıverilmesine neden olur. Büyük olasılıkla bu mekanizma aterogenezde rol oynamaktadır. Yüksek katekolamin düzeyi, stres ve sigaranın trombosit agregasyonunu arttırarak, bu mekanizmayı hızlandırdığı düşünülmektedir (29,30,31). Yine de, trombositlerin asıl etkisi, aterosklerozun bu erken evrelerinde değil, ilerlemiş lezyonun tehlikeli bir komplikasyonu olan trombüs oluşumundadır (31).

#### **2.2.2.5. T-Lenfositleri**

Aterosklerotik lezyonlarda hem CD 4+ hem de CD 8+ hücrelerin bulunması, aterosklerozun patogenezinde bağışıklık sistemine, hatta belki de otoimmüniteye ilişkin bileşenlerin de rol oynayabileceği fikrini doğurmaktadır. Makrofajların bağışıklık sisteminde T-lenfositlere antijen sunan birincil hücreler olduklarının bilinmesi ve aterosklerotik plakta T-lenfositlerle yoğun etkileşimlerinin gösterilmiş olması da bu kanıyı desteklemektedir. Yine de bugüne kadar olası antijenlerin gösterilmesi mümkün olmamıştır. Ancak yapılan bazı çalışmalar, okside LDL'nin temel antijenik yapılarından biri olabileceğine ilişkin kanıtlar ortaya koymuştur (32).

### **2.2.3. Ateroskleroz Patogenezinde Rol Alan Maddeler**

#### **2.2.3.1. Adezyon Molekülleri**

Endotel hücrelerinin fonksiyonlarındaki herhangi bir patoloji aynı zamanda onların yüzeylerinde daha çok adezyon moleküllerinin belirmesine neden olur (up-regülasyon). "vasküler hücre adezyon molekülü-1" (VCAM-1) ve hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi moleküller lökositlerin endotel hücresine daha kolay tutunmasına neden olurlar. İnsanda henüz kanıtlanamasa bile inflamasyon hücrelerinin (özellikle monosit ve T-lenfositlerin) endotele tutunup, daha sonra da endotel bariyerini aşması ateroskleroza başlatan olaylardan biri olarak kabul edilmektedir. Nitekim, yapılan bazı deneylerde yüksek kolesterol içeren diyet ile beslenen tavşanların, lezyon oluşacak arter kesimlerinde, endotel yüzeyinde VCAM-1 düzeyinde artma olduğu gösterilmiştir (33).

Glikoprotein yapısında olan integrinler hücrelerin birbirlerine ya da çevrelerindeki yapılara tutunmalarını sağlarlar. Ayrıca, hücre zarındaki konumları nedeniyle, hücre dışı uyarıların hücre içi olayları başlatmasına aracılık ederler. Plak komplikasyonu sonucunda aktive olan trombositlerin endotel hücrelerine ve endotel altı yapılara tutunmasında rol oynayan GP-IIb'nin reseptörleri integrin yapısındadır (34).

Selektinler, diğer adezyon moleküllerinin aksine, proteinler yerine, karbohidrat ve glikopeptidlere bağlanırlar. Endotel hücresinde bulunan E-selektin, lökositlerin bu hücrelere tutunmasını ve oradan da subendotelyuma geçişini sağlar (34).

### **2.2.3.2. Sitokinler**

Gerek aterosklerozun başlamasında rol alan ve yukarıda sözü edilen adezyon moleküllerinin endotel yüzeyindeki miktarlarının artmasında, gerekse aterosklerozun komplike olmasında sitokinlerin önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. İnterlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi sitokinler, endotel hücresinde VCAM-1 geninin transkripsiyonuna neden olarak aterosklerotik plağın oluşumuna yol açarlar. Aterosklerozda bulunduğu gösterilen bir başka sitokin olan MCP-1, daha çok sayıdaki monositin plağın bulunduğu bölgeye çeker (33). Lezyonda bulunan T-lenfositlerinin salgıladığı interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )'nin ise, düz kas hücrelerinin apoptozisine neden olarak plağın komplike olmasında rol oynadığına inanılmaktadır (35,36). IL-1 ve TNF- $\alpha$  makrofajları aktive ederek metalloproteinaz salgılamalarını uyarırlar ki bu maddelerin akut koroner sendromların oluşumundaki yeri bilinmemektedir (25,26).

Sitokinlerin bir başka önemi de, akut koroner sendromların prognozunu belirlemede giderek önem kazanan, akut faz reaktanlarının yapımını uyarmalarıdır (37).

### **2.2.3.3. Büyüme Faktörleri**

#### **2.2.3.3.1. Platelet Derived Growth Factor (PDGF)**

PDGF; Trombositlerin granülleri içerisinde depolanan çok güçlü bir mitojendir. Proliferasyon yeteneği olan bütün hücrelerde proliferasyonu uyarıcı güce sahiptir. Mitojenik etki gösterdiği hücreler üzerine aynı zamanda kemotaktik etki de gösterir. Düz kas hücre reseptörlerine bağlanan PDGF, hücre siklusunu uyararak DNA yapımına neden olur. Bunun sonucu olarak hücreler bölünüp çoğalır. Bu etkilerinin yanında PDGF ayrıca düz kas hücrelerinin pinositoz yapmasını, protein ve RNA sentezini uyarır. Ayrıca hücre yüzeyindeki



LDL reseptör sayısı artar. Bir başka deyişle bu mitojen ile karşılaşan düz kas hücreleri, hem proliferer olur hem de bağ dokusu sentezini artırırlar (3).

#### **2.2.3.3.2. Fibroblast Growth Factor – $\beta$ (FGF- $\beta$ )**

Endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve makrofajlar oksidatif strese maruz kaldıkları zaman içerdikleri FGF- $\beta$ ' yı salgırlar. Bu hücrelerde FGF- $\beta$ ' nin salgılanmasına neden olacak düzeyde bir hücre hasarı oluştuğunda, açığa çıkan FGF- $\beta$  gerek düz kas hücrelerinin, gerekse endotel hücrelerinin proliferer olmasını uyarır (3).

#### **2.2.3.3.3. Transforming Growth Factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

Endotel hücreleri ve makrofajlardan salgılanır. Düşük dozlarda düz kas hücrelerinin sekresyon ve proliferasyonunu uyarır. Yüksek dozlarda ise güçlü bir hücre proliferasyonu inhibitörüdür. Ayrıca, TGF- $\beta$ ; kollajen, proteoglikan ve elastik lif proteinleri gibi bağ dokusu yapılarının sentezini uyarır, bugüne kadar tanımlanmış en güçlü ajandır (3).

#### **2.2.3.3.4. Heparin-Binding Epidermal Growth Factor (HB-GF)**

Düz kas hücreleri ve aktive olmuş makrofajlardan salgılanır. Düz kas hücreleri için en az PDGF kadar etkili bir mitojendir. Aterosklerozdaki rolü halen araştırılmaktadır (3).

### **2.2.4. Aterogenezde Temel Basamaklar**

#### **2.2.4.1. Endotel Disfonksiyonu**

Normal endotelin aterogenezini engelleyen özellikleri vardır. Dolayısıyla aterosklerozun patogenezindeki ilk temel basamak endotel fonksiyonunda bozulma ile başlamaktadır (3).

Koroner arter hastalığı açısından aile anemnezi pozitif olan kişilerin, koroner arterleri normal veya çok az hasarlı olsa bile, koroner kan akımı regülasyonunda bozukluk olduğu gösterilmiştir. Bu da mikrodolaşım düzeyinde koroner endotel disfonksiyonunun belirtisidir (38,39). Endotel disfonksiyonu ayrıca tip II diyabeti olan hastaların birinci derece

akrabalarında insüline bağımlı diyabeti olan hastalarda da gösterilmiştir Endotel disfonksiyonu, okside LDL partiküllerinin endotele zarar vermesiyle oluşur (40-42).

Normal endotelin fonksiyonlarındaki bozulma sonucunda (43-49):

- 1-Endotele bağımlı vazodilastasyon bozulur.
- 2-NO yapım ve salgılanmasının azalması sonucunda trombosit agregasyonu kolaylaşır.
- 3-Endotelin düzeyi artar, vazokonstriksiyon gelişir.
- 4-Endotel hücrelerinde asimetrik dimetil arginin yıkımının azalması nedeniyle düzeyi artar ve bu da NO sentezini inhibe eder.
- 5-Yüksek kolesterol düzeyi, endotelden serbest oksijen radikallerinin salgılanmasına neden olur ki bunlar da NO'e bağlanarak aktivitesini bozarlar.

#### **2.2.4.2. LDL'nin Oksidasyonu**

Kronik hiperlipidemide dolaşımdaki düşük molekül ağırlıklı lipoproteinler subendotelyal matrikse girerek oksitlenir (50). Bu oksitlenmede, lipoprotein yapısındaki apo E proteini çok az değişikliğe uğradığından, oluşan lipoprotein partikülleride çok az değiştirilmiş LDL'ye mmLDL (minimally modified LDL) adı verilir. Okside LDL' nin aterogenezdeki etkileri şu şekilde sıralanabilir:

- 1-"Çöpçü" reseptörlerce tanınarak makrofajlar ve düz kas hücrelerince fagosite edilir (51,52).
- 2-Endotel hücreleri ve düz kas hücrelerine sitotoksik etki gösterir.
- 3-Dolaşımdaki monositler için kemotaktiktir.
- 4-Endotel adezyon moleküllerinin (ICAM-1, VCAM-1) Üretimini uyararak monosit ve T-lenfositlerinin damar duvarına yapışmasını kolaylaştırır.
- 5-Plak içindeki makrofajların motilitesini inhibe ederek, lezyondaki makrofaj sayısının artmasına yardımcı olur.
- 6-Bazı büyüme faktörleri ve sitokinlerin salgılanmasını uyarır.
- 7-İmmünojeniktir, antikor oluşumunu tetikler.

LDL'nin aterogenezdeki etkisini kısaca böyle özetledikten sonra ileriki sayfalarda LDL'nin oksidasyon mekanizması üzerinde daha detaylı olarak durulacaktır.

#### **2.2.4.3. Köpük Hücre Oluşumu**

LDL molekülünün ilk modifikasyonu endotel hücresinde olur. mmLDL daha sonra makrofajlardan salgılanan lipooksijenaz, reaktif oksijen türevleri ve malondialdehitin etkisiyle

tekrar okside edilir (53). Malondialdehit, Apo B proteininin lizin halkasını değiştirerek lipoprotein molekülünü, makrofajlar üzerindeki çöpçü reseptörlerce daha kolay tanınabilecek yönde şekillendirir (51,52). Böylelikle makrofajlar, okside LDL partiküllerini fagosite edip parçalar ve kolesterol esterleri biçiminde depo eder. Hücrenin kolesterol yüklenmesi, "öpü" reseptör sayısında bir down regülyasyona neden olmadığından, bu depolanma devam eder. Sonuçta köpük hücreleri oluşur. Makrofaj köpük hücreleri, TNF- $\alpha$  ve metalloproteinazlar gibi inflamatuvar sitokinler ve prokoagülan faktörler salgılar (54).

Düz kas hücrelerinin üzerinde de çöpçü reseptörler vardır. Bu hücreler de okside LDL'yi fagosite ederek köpük hücreleri oluştururlar (3). Erken evredeki lezyonlarda lipid çoğunlukla hücre içindedir. Ancak hücre dışı aralıkta da elektron mikroskopuyla görülebilecek kadar az miktarda lipid damlacıkları bulunur (3).

#### **2.2.4.4. Lipid Çekirdeği'nin (Lipid Core) Oluşumu**

Lezyon ilerledikçe hücre dışında da lipid birikmeye başlar. Ekstrasellüler lipidin olası iki kaynağı vardır: Dolaşımdaki LDL'nin doğrudan doğruya intima tabakasındaki proteoglikanlara bağlanması, ya da köpük hücrelerinin ölmesi sonucu depolanmış olan kolesterol esterlerinin açığa çıkması. Hücre dışı lipidin çoğunluğunun bu ikinci yoldan kaynaklandığı kabul edilmektedir (3).

Köpük hücre oluşumunda rol alan iki hücre tipinin, yani makrofaj ve düz kas hücrelerinin yaşam süresi bilinmemektedir. Ancak ileri lezyonlarda düz kas hücre proliferasyonunun oldukça sınırlı olduğu gösterilmiştir ki, bu da bu hücrelerin uzun ömürlü olduklarını düşündürmektedir (3).

Buna karşılık makrofajların aterosklerotik plaklarda çoğaldıkları ve dolaşımdaki monositlerin de sürekli olarak plak içine girdikleri bilinmektedir. Bu yüzden plaktaki makrofaj sayısının kontrolsüz olarak artmasını engelleyen faktörün hücre ölümü olduğu fikri mantıklı görünmektedir. Nitekim ilerlemiş aterosklerozda hücre ölümünün yaygın bir özellik olduğu gösterilmiştir (55).

Makrofajların ölümünde, LDL oksidasyonu sonucunda oluşan peroksitlerin de etkisi olmakla beraber, asıl mekanizma apoptozisdir (55). Apoptoziste, MCSF-1 gibi büyüme faktörlerindeki azalmanın yanısıra, TNF- $\alpha$ 'nın da rolü vardır (55).

Aktif plakta lipid çekirdek çevresinde metalloproteinaz üreten makrofaj kümeleri vardır. Metalloproteinazlar bağ dokusunun yıkımından sorumludur (55).

Sonuçta oluşan lipid çekirdek, intima tabakasının bağ dokusu yapısı içinde kolesterol ve hücre yıkım ürünleriyle dolu boşluklardır. Bu aşamada lipid çekirdeğinin üzerinde henüz fibrotik bir tabaka yoktur (55).

#### **2.2.4.5. Fibröz Başlık (Fibrous Cap) Oluşumu**

Olgunlaşmış aterom plağında lipid çekirdeğinin üstü fibröz bir başlıkla örtülüdür. Fibröz başlık çoğunlukla düz kas hücreleri ve onların ürettiği bağ dokusundan oluşur. Lezyonun yaşı ilerledikçe düz kas hücrelerinin sayısı da artar. Düz kas hücrelerinin medyadan göçü ve proliferasyonu, PDGF, FGF gibi büyüme faktörlerinin uyarısıyla gerçekleşir. Bu faktörler, aterogenezde rol alan hemen her hücre tarafından üretilirler (56). Aynı faktörler, bu hücrelerin bağ dokusu proteinlerini sentezlemesini de uyarırlar. TNF- $\alpha$ 'da güçlü bir bağ dokusu sentezi uyarıcısı olmasına rağmen, bugüne dek bulunan en güçlü düz kas hücresi proliferasyonu inhibitörüdür. TNF- $\alpha$  aktiflenmiş makrofaj ve trombositlerden salgılanır. Stimülasyon ve inhibitör bu maddeler arasındaki etkileşim, düz kas hücrelerinin proliferatif cevabını belirler (56).

Bugün artık fibröz başlığın dinamik bir yapı olduğu bilinmektedir. Bir yandan düz kas hücreleri tarafından kollajen yapımı sürerken, diğer yandan proteazlar tarafından sürekli bağ dokusu yıkımı olmaktadır. Bu yapım ve yıkım işlemleri arasında çok sayıda sitokin tarafından kontrol edilen bir denge vardır (53).

Lipid çekirdek ve etrafındaki fibröz başlıktan oluşan ilerlemiş lezyona "fibroaterom" adı verilir. Lipid çekirdek ve fibröz tabakanın lezyondaki miktarı, plağın zedelenebilirliğini, bir başka deyişle, komplikasyon gelişimine ne kadar açık olduğunu belirleyen esas etkidir (57). Şöyle ki, fibröz başlık ne kadar kalınsa plak o kadar stabil, fibröz başlık ne kadar inceyse yırtılmaya o kadar yatkın ve dolayısıyla plak da komplikasyona o kadar açıktır (58).

Fibröz başlığın yapımında düz kas hücrelerinin rolü düşünüldüğünde, plağın stabilizasyonunda da önemli görev üstlendikleri anlaşılır (3).

#### **2.2.4.6. İmmün Mekanizmalar**

Plaklarda T-lenfositlerin bulunduğu gösterilmiştir. Bu hücrelerin görevi olasılıkla interferon- $\gamma$  salgılayarak düz kas hücre proliferasyonunu düzenlemektir (3).

B-lenfositler ise plakların yapısında bulunmamalarına rağmen, çevre adventisyada bol miktarda bulunurlar ve okside LDL'ye karşı antikor üretirler. Bu antikorların düzeyi, plazmada ölçülerek aterosklerotik olayın aktivite ve yaygınlığı belirlenebilir (32).

#### **2.2.4.7. Plak Vaskülarizasyonu**

Normal medya damarsız bir yapıdır. Ancak intimal kalınlaşma olduğunda, adventisya tabakasında lezyonun tabanına doğru yönelen yeni damarlanmalar olur. Bu damarlarda yoğun biçimde adezyon molekülü sunumu olduğu gösterilmiştir. Büyük olasılıkla monositlerin lezyona girdikleri bir başka yol da yeni gelişen bu damarlardır (59).

#### **2.2.5. Ateroskleroz Patogenezini Açıklamaya Yönelik Hipotezler**

##### **2.2.5.1. Hasara yanıt hipotezi**

Aterosklerotik süreci hangi olayın ya da olaylar dizisinin başlattığı bilinmemektedir. Bu süreci açıklamaya yönelik geliştirilen hipotezler içinde en yaygın kabul gören; hasara yanıt (response to injury) hipotezidir. Ross tarafından ortaya atılan bu varsayımda, olayları endotel disfonksiyonu başlatmaktadır (25). Metabolik, mekanik, toksik, immünolojik olaylar ile infeksiyonlar endotel disfonksiyonuna neden olurlar. Bilinen risk faktörlerinin hemen hepsi (sigara, hipertansiyon, diyabet, hiperkolesterolemi, okside LDL kolesterol) endotel de işlevsel bozukluğa yol açabilirler. Disfonksiyonel tek hücre sırasından oluşan bu tabakanın, kan ile damar duvarı arasında bariyer olma özelliğini, seçici geçirgenliğini ve antitrombotik yapısını bozar. Bunun sonucunda gelişen inflamatuvar ve proliferatif olaylar dizisi, aterosklerotik plağın oluşmasına neden olur (25).

Disfonksiyon endotelin yukarıda sıralanan işlevlerinde dengesizliğe neden olur. Gevşeme ile kasılma, anti-trombojenite ile pro-trombojenite ve anti-proliferasyon ile proliferasyon arasındaki denge bozulur. Aktive olmuş endotel hücrelerinden, adezyon molekülleri (VCAM-I), sitokinler (IL-1, TNF- $\alpha$ ), kemokinler (MCP-I, IL-8), ve büyüme faktörleri (PDGF, FGF- $\beta$ ) salgılanır (25). Salgılanan çekici maddeler ile lezyonlu alana göç eden monositler, inflamatuvar sitokinler salgırlar. IL-1 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler, endotele daha çok lökosit ve LDL bağlanmasına neden olmanın yanında, protrombojenik özellik de verirler (60).

Endotele tutunduktan sonra, subendotelyal alana geçen monositler burada makrofajlara dönüşürler. Okside LDL' yi fagosite ederek köpük hücrelerine dönüşen makrofaj, büyüme

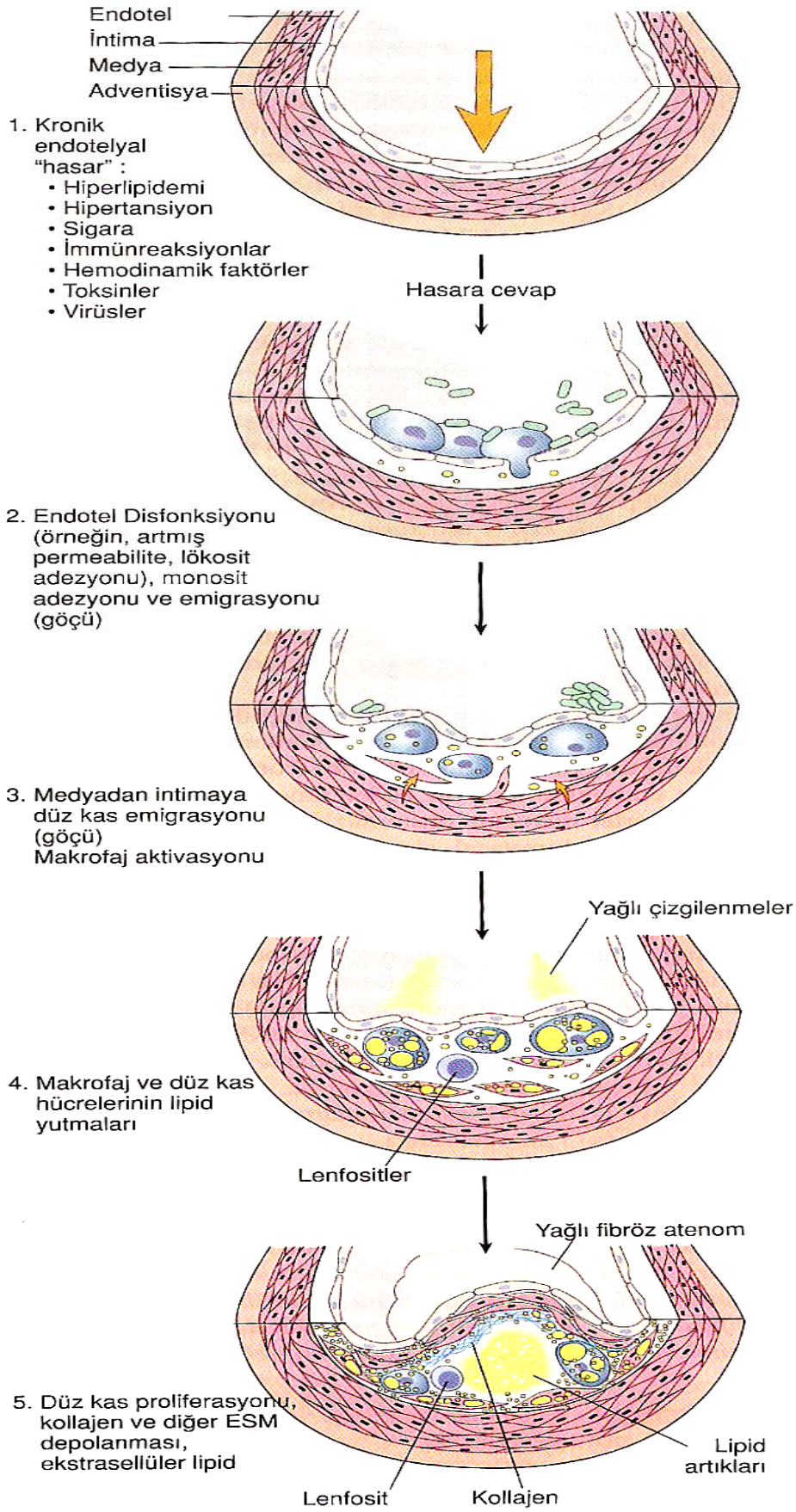
faktörleri, sitokinler, hidrolitik enzimler ve prokoagülan maddeler salgılar. Bunlar, endotelde daha fazla hasar oluşturarak yerel vazokonstriksiyon meydana getirirler. Bunun sonucunda bu bölgenin trombositlerle bağlantı kurmasına, düz kas hücrelerinin aktivasyonuna ve hücre dışı matriks yapımına neden olurlar (25).

Patogenez anlaşılabilceği gibi aterosklerozun bu saygı uyandıran önemi, nedeninin keşfedilmesi için muazzam çabalar sarf edilmesine neden olmuş dikkat çeken bu teori, "hasara-karşı-cevap" hipotezi olarak adlandırılmıştır (Şekil 2). Bunu kısaca özetleyecek olursak;

- a) Endotel geçirgenliğinde artış veya diğcr endotel fonksiyon bozukluğu bulguları ile sonuçlanan genellikle hafif, fokal kronik endotel hasar alanları oluşması.
- b) Esas olarak yüksek kolesterol içcrikli LDL veya modifiye LDL ve lipoproteinlerin damar duvarı içine doğru sızmasının artması.
- c) Bu hasarlanma odaklarında endotel hücrelerinin, monosit/makrofajlar, T-lenfositler ve intima ya da medyanın düz kas hücrelerini içeren bir dizi hücresel etkileşimlerin olması.
- d) Ekstrasellüler matriks oluşumu ile birlikte intimadaki düz kas hücrelerinin proliferasyonu.

#### **2.2.5.2. Monoklonal hipotez**

Düz kas hücre proliferasyonu ve bunu endotel zedelenmesinin takibidir. Düz kas çoğalmasının ön planda olması bazı plakların tek bir ana hücrenin soyundan oluşuyor gibi gözüktüğünü gösteren çalışmaları desteklemektedir. Başka bir deyişle çoğu tümörlerdeki gibi plaklarda monoklonaldır. Virüs ve karsinogenler gibi mutagen etkenler plak oluşumuna yol açan hücre çoğalmasına neden olabilir. Ancak karşıt görüşlere göre plaklar oligoklonaldır. Normal çoğalma kontrolünde baskılayıcı rolleri olan maddelerin yaşla ilişkili kaybına yol açan uyarılara yanıt olarak proliferen olan birkaç klonluk düz kas hücrelerinden oluşur (62).



Şekil 2. "Hasara tepki" hipotezine göre aterosklerozun oluşumu (61).

## 2.2.6. Aterosklerozda lipidler ve lipoproteinler

### 2.2.6.1. Modifiye LDL

LDL reseptörlerine ilişkin çalışma ve buluşlarıyla 1986 da Nobel ödülü alan Micheal S. Brawn ve Joseph L. Goldstein, lipoproteinleri, modern bir kentin toplu taşıma sistemine benzetirler. Gerçekten, lipoproteinlerin oluşturduğu taşıma sistemi ile modern bir kentin metro sistemi arasında şaşırtıcı derecede benzerlikler vardır.

Lipoprotein taşıma sistemi, yolcuları olan lipidleri (kolesterol esterleri ve trigliseridler), akşam sabah demeden organizmanın gereksinimleri doğrultusunda, günboyu taşır dururlar. Taşıma sistemi bu işlevi yerine getirirken, gerçek metro sisteminde de gözlemlendiği üzere, belli saatlerde (lipid absorpsiyonunun arttığı, yemek sonrasında rastlayan saatlerde olduğu gibi) yolcu trafiğinin yoğunlaşıp sıklaştığı görülür. Yine, metro örneğinde olduğu gibi, taşıma sisteminin vagonlarını oluşturan lipoproteinlerinden birine binen bir lipidin o vagona son durağa kadar yolculuk etmesi gerekmez, ara duraklarda inebilir. Vagonu terkeden lipid, metro sisteminin tümüyle dışına çıkıp 'kendi işine' gidebileceği gibi, hemen başka bir vagona atlayıp (aktarma yaparak) yolculuğunu sürdürmesi de olanaklıdır. Bu arada, metro taşımacılığında da görülebildiği gibi, sözü edilen taşımacılık sisteminde de, bazı hatlarda, geçici veya kalıcı trafik sıkışıklıkları yaşanabilir. Bunların bazıları metrodaki proje hatası türünden genetik kökenli olmakla birlikte, daha çok, yolcu trafiğinin artışına bağlıdır. Bazen de, genetik yatkınlığı olan bireylerde, diyet veya endokrin dengesizliklerin taşıma sistemini bunaltması sonucunda ortaya çıkan çok etmenli (multifaktöriyel) bir hiperlipidemi söz konusudur.

Bildiğimiz gibi vücuttaki kolesterol ya diyet yolu ile alınır ya da vücutta endojen olarak karaciğer, beyin, adrenal, barsak, deri gibi organlarda üretilir. Arter duvarındaki lipoproteinler, endotel yüzeyinde bulunan lipoprotein lipaz tarafından etkilenir. Lipoprotein lipaz gibi apolipoprotein E de hücre dışı lipidlere bağlanabilir ve bunların reseptör aracılı alımını destekler (63).

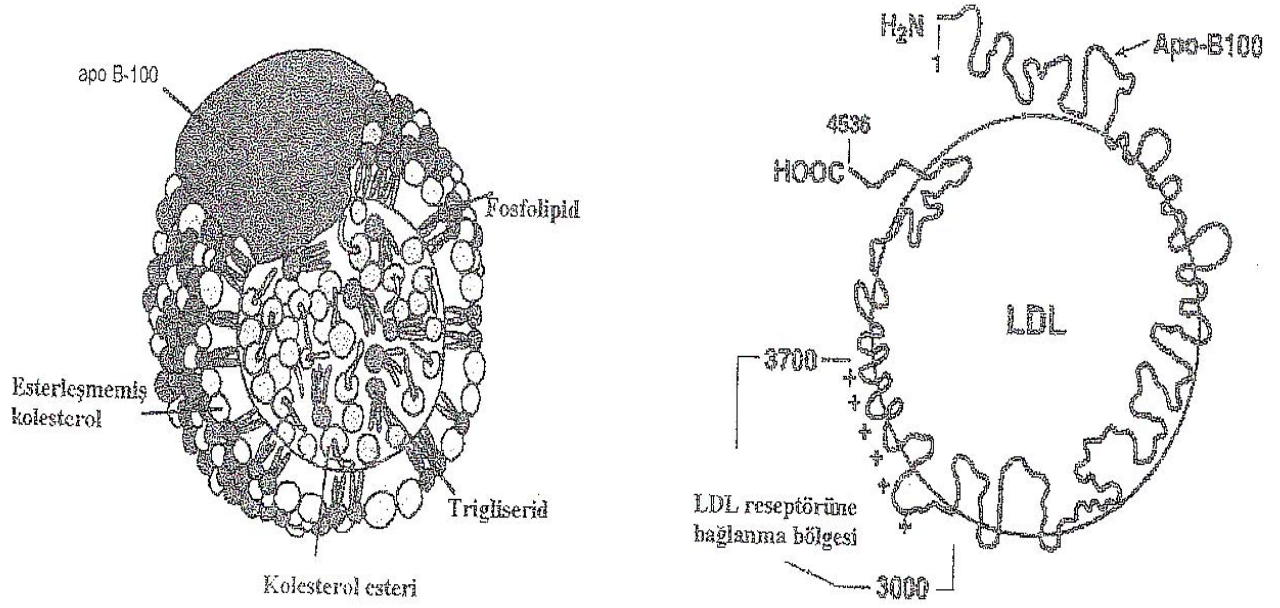
Kan kolesterol düzeyi hücre yüzeyindeki doğal LDL reseptörleri ile kontrol edilir. Bu reseptörler hepatositler dahil tüm vücut hücrelerinin yüzeyinde bulunur ve kandan kolesterolden zengin lipoproteinlerin alımını düzenleyici görev üstlenmiştir. LDL reseptörü lipoproteini bağlayarak hücre içine alır, protein ve lipid hidrolizi için lizozomlara iletir, tekrar lipoprotein bağlayabilecekleri hücre yüzeyine geri döner. Lipoprotein yüzeyinde reseptör ile etkileşmeyi sağlayan iki protein "apolipoprotein B 100" ve "apolipoprotein E" dir (63).



Yüksek LDL-kolesterol düzeyi aterogenezin temelini oluşturur Bu nedenle yüksek trigliserid düzeyi, küçük LDL partikülü ve düşük HDL-kolesterol düzeyi aterojenik dislipidemi kriterlerini oluşturur (63). Serum LDL-kolesterol düzeyi yani sıra partikül sayısı da önemlidir. LDL-Apo B düzeyi tam olarak partikül sayısını yansıtır. Küçük LDL partikülleri daha aterojeniktir (64,65). Endotel hücre membranında kronik LDL-kolesterol yüksekliğine bağlı kolesterol/fosfolipid oranının artması ile membran vizkositesi artar. Özellikle endotel hücrelerinin kan akımı değişikliklerine maruz kaldığı dallanma bölgelerinde ciddi hasar yapar (65). Lipoprotein oksidatif modifikasyonunda lipoprotein içeriğini oluşturan apoprotein, kolesterol, kolesterol esteri ve trigliserid bileşenlerin her biri okside olabilir (66,67).

#### **2.2.6.2. Oksidan stres ve LDL oksidasyonu**

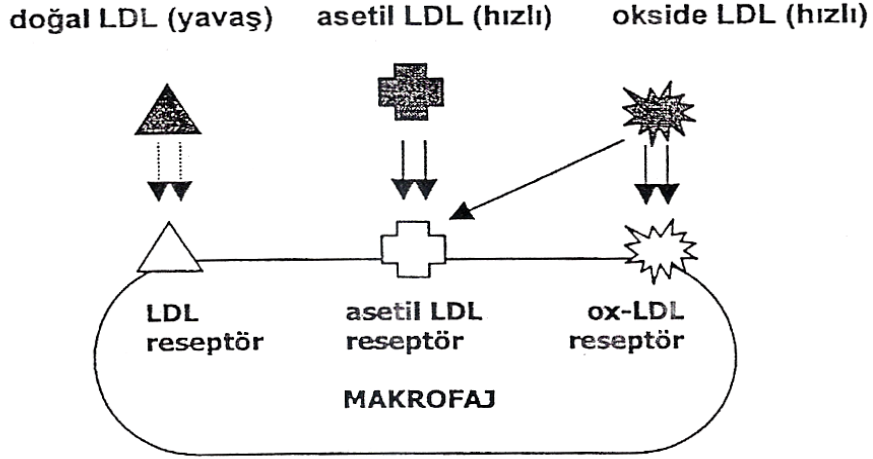
İnsan LDL-kolesterolü 1019-1063 gr/ml dansite aralığında ultrasantrifüjle izole edilen lipoprotein populasyonu olarak tanımlanır. Her LDL partikülü yaklaşık 1600 kolesterol ester molekülü ve 120-170 trigliserid molekülünden oluşan santral lipofilik çekirdek içerir. Bu çekirdek lesitin, az miktarda sfingomyelin ve lizolesitin içeren yaklaşık 700 fosfolipid molekülü ve 600 serbest kolesterol molekülünden oluşan tek tabaka ile çevrilidir (Şekil:3). En dışta 4536 amino asit birimi içeren Apo B100'den oluşan tabaka bulunur. LDL-kolesterolün farklı sınıflarına bağlı total yağ asidi sayısı yaklaşık 2700 olup yarısı poliansatüre yağ asidi (PUFA); özellikle linoleik asittir. PUFA yapısındaki farklılıklar, farklı LDL örneklerinin oksidasyona karşı farklı davranmasının temelini oluşturur. LDL'deki PUFA  $\alpha$ - tokoferol gibi antioksidanlar ile serbest radikal hasarına karşı korunur (68).



**Şekil 3: LDL'nin yapısı**

Son yıllarda aterosklerozun öncü lezyonu erken yağlı çizginin etiyojisi ve bu tip lezyonların şef hücresi makrofajların ateroskleroz için ana risk faktörü olan plazma LDL-kolesterolünden hangi mekanizmalarla kolesterol biriktirdiğinin anlaşılmasına odaklanılmıştır (69). LDL modifikasyonu makrofajlara alım ve hücresele LDL birikimi için gereklidir. Oksidasyon, kendi kendine agrege olma, proteoglikan ve matris proteinleri gibi makromoleküllerle kompleks oluşumu, Fc reseptör yolu ile immun kompleks oluşumu gibi çeşitli modifikasyonlar LDL'yi daha hızlı makrofajlara alınabilen formlara dönüştürür(69-72).

LDL oksidasyonu aterogenezde erken basamaktır. Doğal LDL'nin makrofajlara alımında rol oynayan klasik LDL reseptör yolunda hücre içine alınan kolesterol miktarı sınırlıdır. Makrofaj hücre kültürü ortamına LDL eklendiğinde makrofajların kolesterol ester birikimi oluşturacak kadar çok miktarda LDL'yi alamadıkları görülmüş. Aşırı miktarda kolesterol biriktirebilmesi için modifiye olması gerektiği anlaşılmış, LDL'nin kimyasal türevi asetillenmiş LDL'nin makrofajlara çöpçü reseptörlerle aşırı şekilde alındığı gösterilmiştir (Şekil 4). mmLDL'nin de aynı reseptörler tarafından tanındığı gösterilmiştir (68). Homozigot famiyal hiperkolesterolemili olguların makrofajlarında LDL reseptör eksikliği bulunmasına rağmen aterosklerotik plakla birlikte kolesterol ester biriktiğinin izlenmesi ile makrofaj yüzeyinde yer alan, kimyasal asetilasyon ile modifiye olan, LDL'yi bağlama yeteneğinde yakalayıcı reseptörler tanımlanmıştır.



**Şekil 4:** LDL ve LDL reseptör tipleri

Düşük dansiteli lipoprotein oksidasyonu; *In vitro* kültür hücreleri (endotel hücre, düz kas, makrofaj) veya bakır gibi ağır metal iyonları ile inkübasyonla gerçekleştirilebilir. Ayrıca LDL soya lipoksigenazı ile de okside edilebilir. Henüz *in vivo* fizyolojik mekanizmalar tam açıklanamamıştır (72-74). Endotel hücresi veya makrofajlarla indüklenen oksidasyonun hücre içinde oluşarak LDL'ye aktarılan lipoperoksitlere bağlı olduğu ve 15-lipoksigenaz başta olmak üzere hücresel lipoksigenazlar, lipoperoksit oluşumunda önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir (69). Lezyonlarda belli konsantrasyonlarda bulunmaları nedeni ile *in vivo* oksidasyonda etkin olan hücrelerin endotel hücre, makrofaj ve düz kas hücresi olduğu kabul edilir. LDL'nin hücre aracılı oksidasyonu NADPH oksidaz, lipoksigenaz, myeloperoksidaz gibi hücresel prooksidan sistemler ve glutasyon, SOD gibi hücresel antioksidanlar arasındaki denge ile lipoprotein oksidatif durumuna bağlıdır. Aterogenezin erken evrelerinde makrofaj aracılı, geç evrelerinde düz kas hücreleri ile LDL oksidasyonu baskındır (75).

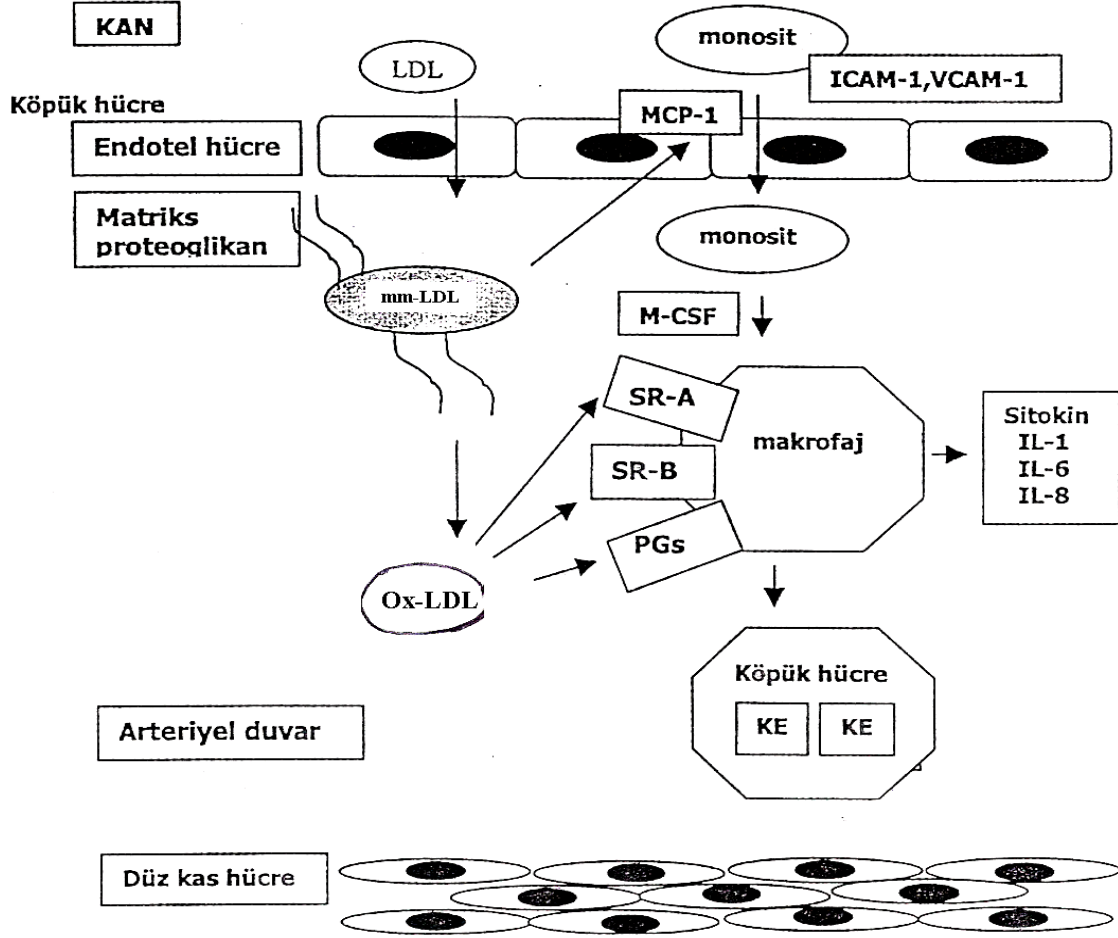
LDL partikül grubu heterojendir, dansite ve yük farklılıklarına göre ayrılır. Doğal LDL plazma LDL'nin %90-98'ini temsil eder. mmLDL ise %10'dur. LDL'nin çoğunluğu küçük, yoğun LDL'de bulunur, bazı bireylerde bu oran %20'ye çıkar. Total LDL konsantrasyonunun aksine yoğun LDL oranı ateroskleroz gelişiminde güçlü tanısal değere sahiptir. Bu partiküllerde oksidan/antioksidan dengesi oksidasyon yönüne kayar, peroksit konsantrasyonu artar, antioksidan içerik azalır. mmLDL'nin bileşimi genellikle yoğun LDL'e benzer. Total LDL fraksiyonundan ayrılan başlıca özelliği elektroforez tekniklerini kullanmaya olanak sağlayan artmış elektronegativite özelliğidir. Değişik protein yükü siyalik asit içeriğindeki değişiklik ile birliktedir ve arteriyel duvarda LDL oksidasyonu ve hasarla ilişkilendirilebilen inflamasyon-oksidasyon olayları ile bağlantılı olabilir. LDL oluşumunda

oksidatif sürecin rolü lizin, tirozin, sistein gibi oksidasyona duyarlı amino asitlerin azalan düzeyleri ile kanıtlanır. Diğer amino asitlerin yüksek düzeyleri ve LDL'nin paradoks özellikleri LDL ile ilişkili diğer protein-peptidlere bağlı olabilir. Bu LDL protein modifikasyonu oksidatif ve nonoksidatif özelliklere sahiptir (76).

Endotel altı bölgeye doğru geçişini takiben LDL, başlangıçta ılımlı olan oksidatif sürece girer, öncelikle mmLDL oluşur. Ox-LDL'den farkı ılımlı lipid peroksidasyonu gerçekleşmiş olmasına rağmen LDL reseptörü tarafından tanınabilmesidir mmLDL monositlerin endotel hücreye adezyonunu uyarır. Lokal vasküler hücrelerden MCP-1 ve MCSF salınımı yaparak monosit bağlanması ve makrofajlara farklılaşmasını uyarır. Makrofajlar mmLDL'nin oksidasyonunu hızlandırır ve artık normal LDL reseptörleri ile tanınamayan Ox-LDL formu oluşur. Ox-LDL artık doğal LDL reseptörü tarafından tanınmaz (Tablo 1), bunun yerine hücre içi kolesterol içeriği ile düzenlenmeyen yakalayıcı reseptör sistemi ile alınır. Makrofajlar Ox-LDL'den büyük miktarda kolesterol esterleri biriktirdikçe köpük hücreye dönüşür (Şekil 5). Ox-LDL heterojen bir üründür. Okside yağ asitleri ve yıkım ürünleri, okside sterol ve fosfolipidler ile bunların apo B ile konjuge olmuş hallerini içerir. mmLDL yağlı çizgi oluşumu ile ilgili iken, Ox-LDL lezyonun ilerlemesinde etkili gibi görünmektedir (71,74,77ege).

**Tablo 1:** Doğal ve Ox-LDL özellikleri

	Doğal LDL	Ox-LDL
<b>Apoprotein yapısı</b>	sağlam	Proteolize, fragmente, çapraz bağlı
<b>Antijenite</b>	yok	var
<b>PUFA ve antioksidan</b>	yüksek	düşük
<b>Lipid peroksit/Yıkım ürünü</b>	yok	var
<b>Okside kolesterol içeriği</b>	düşük	yüksek
<b>Anormal lipid yapısı</b>	yok	klorlu/nitratlı yapı bulunabilir
<b>Lizofosfatidilkolin</b>	çok az	yüksek



**Şekil 5:** Oksidasyon evreleri ve yakalayıcı reseptörler ile etkileşim (78)

LDL oksidasyonu başlıca arteriyel intimada gerçekleşir (79). LDL' nin oksidasyonu serbest radikal aracılığı ile oluşan bir prostestir ve poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) peroksidatif modifikasyonunu içerir (80). LDL oksidasyonu, reaktif oksijen türlerinin PUFA'nın yüzeyindeki fosfolipidlerde bulunan çifte bağlardan hidrojen atomu koparmasıyla başlar. Ardından moleküler düzenleme ile konjuge dien olarak adlandırılan, konjuge çifte bağlar oluşur. Öncelikle, oksidasyon hızı oksidasyonun gerileme fazını oluşturan endojen antioksidanlar ile baskılanır (81,82). Gerileme fazını hızlı ilerleme fazı takip eder ki bu fazda bir başka poliansatüre yağ asitinden hidrojen koparılmasını gerektirir, sonuçta lipid peroksidleri oluşur. İlerleme fazını, dekompozisyon fazı takip eder. Burada çifte bağlar koparılarak hidroksinonenal, heksanal ve malondialdehit gibi aldehider oluşur.

Okside LDL' nin dikkati çeken bazı özellikleri şöyledir: serbest yağ asitlerindeki indirgenme, lipid peroksidlerinde artış, oksisterol miktarının artması, apolipoprotein B-100 negatif yükünde artış, apolipoprotein B-100 parçalanmasında artış, lizolesitin miktarında artış, LDL reseptörünce uptake' in azalması ve çöpçü reseptör mekanizmasıyla uptake' te artış (83).

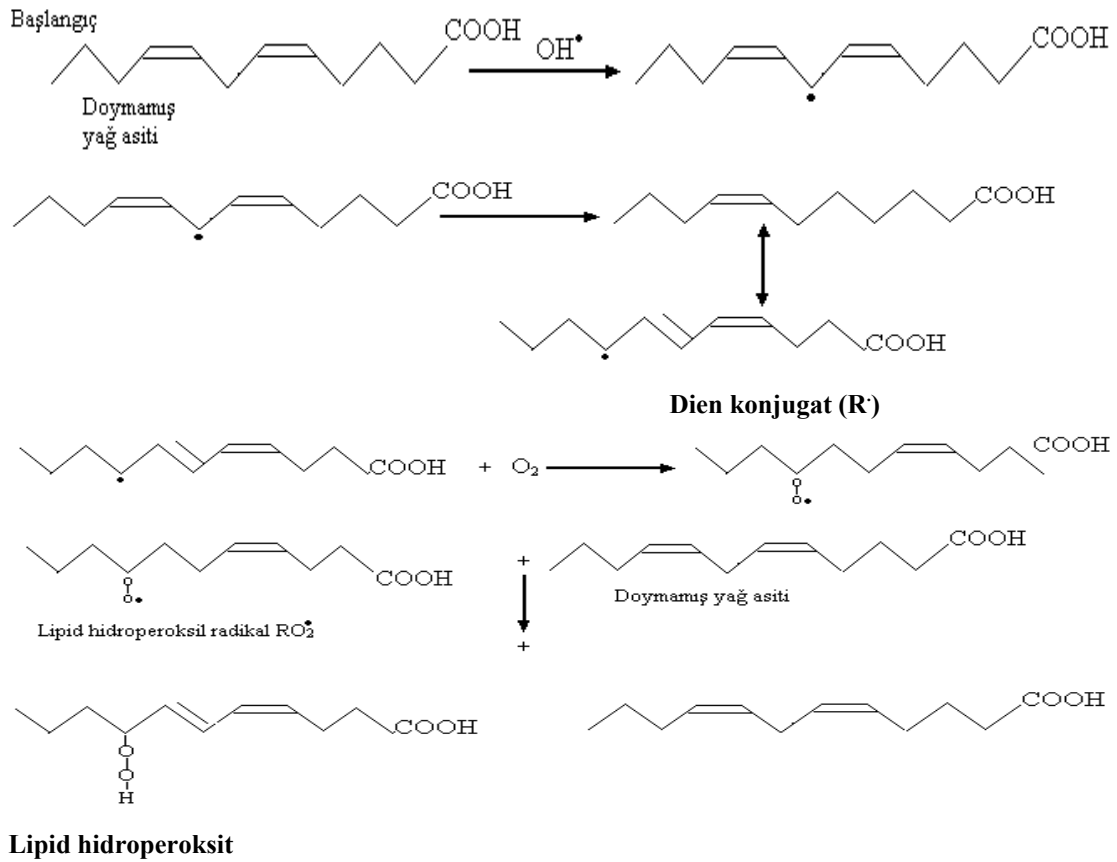
Endotel altı bölgede makrofajlara maruz kalan LDL'nin oksidasyona uğrayarak arter duvarında bir takım toksik etkiler oluşturduğu; böylece arteriyel hücreler, inflamatuvar araçların katıldığı aterosklerotik süreci başlattığı benimsenmiştir. Arter duvarında LDL oksidasyonu ve trombosit aktivasyonu birbirinin etkilerini tetikleyen iki mekanizma olarak bu süreçte anahtar rol oynadığı belirtilmektedir.

Düşük dansiteli lipoproteinin oksidasyonu temelinde serbest radikal ile ilişkili bir süreç ile başlayan LDL'deki PUFA'ların peroksidasyonu ile devam eden bir dizi reaksiyonlar zinciridir. PUFA'lar 3-9 C (karbon) uzunluğunda, diğer lipidlerle veya apo B ile konjuge olabilen aldehit/keton içeren daha küçük birimlere ayrılması gerçekleşir (75). Bu lipid peroksidasyonunu herhangi bir serbest radikal başlatabilir. Oksidatif stres altında makrofajlar LDL oksidasyonuna yol açan reaktif oksijen ürünleri oluşturur. Süperoksit anyon gibi reaktif oksijen ürünleri ortama salınarak LDL'de lipid peroksidasyonunu başlatır (69,73,78,). Serbest radikal doymamış bir yağ asitinin cis çifte bağındaki reaktif bir metilen grubundan bir hidrojen atomu çekme yeteneğinde olup karbon atomu üzerinde ortaklanmamış elektron bulunduran lipid radikali oluşumu ile lipid peroksidasyonu başlar.

Oksijen ile birleşerek lipid peroksi radikali, bunlar da diğer yağ asidi yan zincirleri ile tepkimeye girerek lipid hidroperoksitleri oluşturur. Lipid peroksidasyonunun ana ürünleri olan lipid hidroperoksitler oldukça stabil moleküllerdir. Fakat bakır iyonları gibi çift değerlikli metal iyonlar veya hem-protein kompleksleri tarafından katalizlenen yıkımları sonucu alkoksil ve peroksil radikalleri oluşur. Bu durum, zincirleme reaksiyonlara neden olarak ortamda fazla miktarda lipoperoksitlerin oluşmasına neden olur. Artmış sayıda lipoperoksitler yağ asidi çifte bağlarının yeniden düzenlenimi ile karakteristik 234 nm'de absorpsiyon gösteren konjuge dienlerin oluşumuna neden olan zincir reaksiyonu oluşturur (68,69,78,84).

Oksidasyonun başlangıç evresi sırasında oksidasyon hızı LDL partikülündeki endojen antioksidanların varlığı ile baskılanır ve gecikme fazı ile sonuçlanır (lag faz). Bu evrede LDL'de oksidatif reaksiyonlar yavaştır, ortalama 34-114 dakika sürer ve antioksidanlar tükenir. İlk tükenen  $\alpha$ - tokoferol, en son tükenen ise  $\beta$ -karotendir. Antioksidanların tükendiği anda hızlı ilerleme fazı gelişir. Bu evrede başka bir PUFA'dan PUFA peroksidiradikal (LOO') ile başka bir hidrojen atomu çıkarılması ve sonuçta lipid peroksit oluşumu gerçekleşir. Hızlı ilerleme fazı serbest radikal oluşturan karbon ve oksijen sayısını arttırarak LDL'nin sterol, yağ asidi, fosfolipid, Apo B gibi tüm bileşenlerinde değişikliğe neden olur. İlerleme fazını dallanma veya yıkım fazı izler, aldehit oluşumu ile sonuçlanır. Temel aldehit ürünler alkanal (MDA), alkenal (4-hidroksinoneal, hekzonal) ve alkanlar (pentan, etan) dir. Oksidatif

modifikasyon sırasında LDL'de fosfolipaz A<sub>2</sub> aktivitesi ile lesitinden lizolesitin oluşumu da artar. Lizolesitin okside yağ asitlerinin salınımını artırır. Sfingomyelinaz ve fosfolipazA<sub>2</sub> LDL'deki doğal fosfolipidleri daha aktif moleküllere kümelenmesine neden olur (85). Yağ asidi parçalanması sonucu oluşan ve son derece reaktif ürünler olan aldehitler, ketonlar ve oksisterol türevleri gibi oksitlenmiş ürünler daha sonra LDL'nin protein içeriği apo B-100 veya fosfolipidlerle kompleks oluşturabilirler. Aldehitler apo B100 üzerindeki Schiff bazı oluşumu ile pozitif yüklenen amino grupları ile çapraz yapar. Bu da LDL partikülünün negatif yükünde artışa neden olur. Bu ürünler agaroz jel elektroforez ile kolaylıkla saptanabilir veya karakteristik floresan spektrum gösterirler. Apo B100 peptid bağları direkt oksidatif yıkıma da uğrayabilir. Apo B'nin lizin birimlerinin modifikasyonu LDL'nin reseptörüne bağlanma yeteneğini inhibe eder. Apo B'nin lizin birimlerinin %16'sı reaktif ürünler tarafından maskelendiğinde LDL partikülü artık yakalayıcı reseptör tarafından alınmaya başlar (68,69,73,75,77,86). Böylece lipid peroksidasyonu ile başlayan olaylar zinciri, LDL partikül yapısında yaptığı değişiklikler ile aterosklerotik lezyon oluşumunda önemli basamak oluşturur (Şekil 6).



Şekil 6: PUFA peroksidasyonu

Arter duvarı hücreleri; lipoprotein lipaz, kolesterol esteraz, fosfolipaz A<sub>2</sub>, fosfolipaz C, fosfolipaz D ve lipoksigenaz içerir ve LDL oksidasyonu için çeşitli mekanizmalar sunarlar (Tablo 2) (75,78,87):

- a) İndirgeyici metaller veya hücre dışı peroksidaz varlığında süperoksit iyon gibi reaktif oksijen ürünleri oluşabilir; örneğin; NADPH oksidaz, ksantin oksidaz gibi oksijenazların aktivasyonu ile güçlü oksidan OH<sup>·</sup> radikali gibi radikaller oluşabilir.
- b) NO sentaz enziminin aktivasyonunu takiben üretilen NO, OH<sup>·</sup> radikali veya peroksinitrit gibi radikallerin oluşumunda öncüdür. NO ve süperoksit radikallerinin reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitrit, LDL'yi *in vitro* okside edebilme yeteneğindedir.
- c) Hücresel 15-lipoksigenaz aktivasyonunun okside ettiği yağ asitleri daha sonra fosfolipaz A<sub>2</sub> etkisi ile salınır. Hücre dışı okside yağ asidi geçiş metal iyonları varlığında LDL'yi bağlayabilir ve lipid peroksidasyonunu uyarır.
- d) Myeloperoksidaz ile hidrojen peroksit ve klordan sentezlenen reaktif hipokloröz asit LDL oksidasyonunu geçiş metal iyonları olmadan uyarabilme yeteneğindedir.
- e) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kadar süperoksitler için de kaynak olan, mikrozomlardaki lipidleri okside edebilen sitokrom P-450 enzimlerinin aktivasyonu gerçekleşebilir.
- f) Aşırı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında, myoglobın ve hemoglobın gibi hem proteinleri ile LDL oksidasyonu serbest hem salınması, ferril hemoprotein oksidasyonunun gerçekleşmesi ve protein merkezli radikallerin oluşumunu içeren mekanizma gerektirir.
- g) Metal iyonlarının varlığında süperoksit anyon oluşturan otooksidasyon LDL oksidasyonunu kolaylaştırabilir.
- h) Düşük dansiteli lipoprotein'nin içerdiği kolesterol esterlerinin arteriyel hücrelerde bulunan kolesterol esteraz ile hidrolizi sonucu serbest kolesterol ve yağ asidi miktarları artar; trigliseridlerin hidrolizi digliserid, monogliserid ve gliserol miktarında artışa yol açar.
- i) Fosfolipaz A<sub>2</sub> lizolesitin miktarını arttırırken, fosfolipaz C inozitol fosfat ve diaçilgliserol oluşumuna yol açar. Lipoksigenazların etkisi ile de hidroliz sonucu açığa çıkan yağ asitlerinin oksidasyonu gerçekleşir.



**Tablo 2:** Farklı uyaranlarla LDL modifikasyonunda oluşan değişiklikler (88)

	Fosfolipaz A <sub>2</sub>	Cu/Fe	Makrofaj	Asetil LDL
<b>LDL Yapısı</b>	Fosfolipidler	okside yağ asiti	okside yağ asiti	asetilasyon
Büyüklik	N	N	N	N
Negatif yük	↑	↑	↑	↑
Heparin bağlama	↓	↓	↓	↓
LDL reseptöre bağlanma	↑	↓	↓	↓
Yakalayıcı res'e bağlanma	↑	↑	↑	↑
Oksidasyona yatkınlık	N	↑	↑	↓

*In vitro* koşullarda, oksidasyonu başlatmada kullanılan hücre tipi, ortamdaki metal iyon konsantrasyonu, ortamın kendisi, inkübasyon şartları ve LDL'nin hazırlanma şekli ile farklı genetik yatkınlığa bağlı olarak çeşitlilik gösterir. LDL'yi okside etmedeki koşullar sıkı kontrol edilse de ürün deneyler arası değişkenlik gösterebilir. PUFA'dan zengin yapılar doymuş veya tek C'lu doymamış yağ asidi içeren zengin yapılara göre daha hızlı okside olur (69,75). Yüksek kan kolesterol düzeylerinin artmış oksidasyon olasılığı ile birlikteliği bilinir ve gecikme fazının kısalması, daha yüksek oksidasyon ürünü düzeyi ve artmış makrofaj alımı normokolesterolemiye göre hiperkolesterolemiye daha fazladır. Hiperkolesterolemiye LDL'deki protein/ $\alpha$ -tokoferol oranı etkilenmez ve bu durumda bakırla indüklenen LDL oksidasyonuna yatkınlık azalabilir (89).

Düşük dansiteli lipoprotein oksidasyonunun başlıca arter duvarında gerçekleştiği kabul edilir. Plazmada yüksek antioksidan düzeyi nedeni ile oksidasyonun fazla olmadığı, plazmada oksidasyon gerçekleşse bile karaciğer sinüzoidal hücrelerinde yakalayıcı reseptörler ile ortamdaki hızla uzaklaştırıldığı ve plazma yarı ömrünün birkaç dakika ile sınırlı olduğu düşünülse de Ox-LDL epitoplarına karşı antikorlar ile yapılan çalışmalar plazmada da bulunabileceğini ve ayrıca plazma Ox-LDL'nin arteriyel duvar için kaynak olup olamayacağı sorusunu akla getirmektedir (90,91).

Wattanabe türü hiperlipidemik (WHHL) tavşan ve domuzlarda koroner aterosklerotik lezyonlarda biriken Ox-LDL miktarının lezyonların ilerlemesi ile uyumlu olması ve hayvanların serumunda Ox-LDL'ye karşı otoantikor saptanması; Ox-LDL belirleyicisi lizin

aldehitlerin monoklonal antikorlar ile insan ve tavşan aortunda makrofajdan zengin lezyonlarda saptanması; hücre kültür makrofajlarının Ox-LDL'yi lipid yüklü köpük hücre oluşturmak üzere alması; ateroskleroz için yüksek risk taşıyan hiperkolesterolemik, hipertansif, diabetik ve böbrek yetmezlikli olgulardan elde edilen LDL'nin lipid peroksidasyonuna artmış yatkınlığı; *in vitro* oksidatif modifikasyonu önleyebilen doğal antioksidanların alımı ile aterosklerotik hiperlipidemik tavşanlarda lezyon miktarının azalması gibi çeşitli çalışmalar LDL'nin bazı aterojenik koşullarda *in vivo* okside olduğunu gösterir (78). Buna dair yapılan çalışmaları şöyle özetleyebiliriz (68,78,92);

- a) Epidemiyolojik çalışmalar: Besinlerle alınan antioksidan miktarı veya plazma antioksidan düzeyleri ile KAH gelişim riski arasında ters ilişki vardır. Bundan başka tekli doymamış yağ asidi tüketiminin fazla olduğu yerlerde KAH daha az görülmektedir.
- b) İmmunohistokimyasal çalışmalar: Ox-LDL'nin epitoplarına karşı oluşan antikorlarla yapılan çalışmalarda, hayvan ve insanlarda aterosklerotik lezyonlarda daha koyu boyanma olduğu, normalde bu durumun olmadığı bulunmuştur.
- c) Aterosklerotik lezyonlardan elde edilen LDL'nin birçok fizikokimyasal, immunolojik ve biyolojik özellikleri *in vitro* koşullarda okside edilen LDL'ye benzerlik gösterir.
- d) E vitamini ve  $\beta$ -karoten gibi lipofilik antioksidanların *in vitro* LDL'yi oksidasyona karşı koruduğu gösterilmiştir.
- e) Okside-LDL immunojeniktir, insan ve hayvan serumlarında otoantikorlar gösterilmiştir. mmLDL antikor oluşumunu uyarır, LDL-immun kompleks agregatları Fc reseptör aracılığı ile makrofajlara alınıp kolesterol birikimine neden olur.
- f) Plazmada düşük miktarlarda Ox-LDL partikülü saptanmıştır.

Aterosklerotik lezyonun ilerlemesinde Ox-LDL'nin biyolojik etkileri şöyle sıralanabilir(69,72,74,75,77,78,89):

- 1) Okside-LDL, mmLDL gibi MCP-I salınımına yol açarak monositler için kemotaktik etki gösterir. Aynı zamanda T-lenfositler için de kemotaktikdir.
- 2) Doku makrofaj hareketini önleyerek arteriyel duvardan çıkışını engeller. Böylece kolesterol ester zenginliğine yol açacak şekilde makrofajlarda kolesterol birikimi olur.
- 3) Diğer hücrelere sitotoksiktir. Bu hücrelerin kan elemanları ile teması büyüme faktörleri salınımına, bu da düz kas hücre göçü ve çoğalmasına neden olarak yağlı çizgilerin kompleks lezyona dönüşümünü sağlar.
- 4) Makrofaj ve düz kas hücreler için mitojenik etki gösterir.

- 5) Makrofajlardan arteriyel duvarda düz kas hücre çoğalması ve lökosit-endotel adezyonunu uyardığı bilinen IL-1 gibi sitokinlerin salınımını uyarır. Sitokinlerin üretimi aterosklerozda inflamasyonun başlangıç ve şiddetlenmesinde temel öneme sahiptir.
- 6) Komşu hücrelerin gen ifadesinin değişmesine katılır.
- 7) Endotel hücreden MCP-1 ve MCSF salınımını uyararak monositlerin subendotelyal aralığa geçişini sağlar. Farklılaşan monositler kendilerinin de lezyona ilerlemesini şiddetlendiren MCP-1 üretir. Monositlerin MCSF etkisi altında makrofajlara farklılaşmasını uyarır.
- 8) Okside-LDL *in vitro* endotel bağımlı damar gevşemesini önler, bu, olasılıkla yüksek lizolesitin içeriğine bağlıdır (93). Lizolesitin, Ox-LDL'den endotele geçerek NO salınımını inhibe eder.
- 9) Yüksek dansiteli lipoprotein lizolesitini bağlayarak ve damar gevşemesinin güçlü inhibitörleri olan pozisyon 7'deki okside kolesterol derivelerinin Ox-LDL'den uzaklaştırılmasında rol alarak, Ox-LDL'nin inhibitör etkisini baskılar.
- 10) Nitrik oksit aracılı vazodilatasyonu önler (94), koroner arter vazomotor özelliklerini ters çevirir.
- 11) Doku faktörü ve PAF sentezini uyarır, pıhtılaşma sistemini ters etkiler.
- 12) Hücre içi adhezyon molekülü ve VCAM-1'i uyarır, bu inflamatuvar süreç antioksidanlarla önlenabilir.
- 13) Nikrik oksit sentaz aktivitesini inhibe eder, trombosit aktivasyonunu uyarır. NO sentaz aktivitesini substrat uygunluğunu bozarak veya protein düzeylerini düşürerek düzenler(95).
- 14) Endotelyal hücrelerde tip 1 membran protein Fas aracılı apoptosisi uyarır (96).
- 15) *in vitro* çalışmalara göre Ox-LDL'nin vasküler endotel hücre, düz kas hücre, makrofaj ve renal tubuler epitel hücrelerde hemoksigenaz-1, Isı şok protein 70 (HSP 70), makrofaj stres protein 23 (MSP 23), oksijenle regüle protein (ORP150) gibi stres proteinlerinin ekspresyonunu tetikler. Bu proteinlerin fonksiyonu tam belirlenemese de, mmLDL ile uyarılan hemoksigenaz-1'in arteriyel duvar hücrelerinde inflamatuvar yanıtın uyarılmasına karşı antioksidan biliverdin, bilirubin üretimi yolu ile ateromatöz plak gelişiminde anahtar basamak olan monosit kemotaksisini önleyerek koruma sağlayabilmesi önemlidir(97).
- 16) Tümör nekrotizan factor- $\alpha$ , IL-1, MCSF gibi inflamasyon belirteçleri endotel ve düz kas hücrelere LDL'nin yapışmasını, reseptör gen transkripsiyonunu artırır. Yakalayıcı

reseptöre bağlandıktan sonra modifiye LDL ürokinaz indüksiyonu, IL-1 gibi inflamatuvar sitokinlerin uyarılmasına neden olarak inflamatuvar sürece katkıda bulunur (25).

Düşük dansiteli lipoprotein oksidasyonunu etkileyen faktörler (69):

A. İntrensek faktörler:

1. Substratın niteliği oksidasyona duyarlılığı saptar. Ana substratlar PUFA ve kolesteroldür. LDL'de başlıca linoleik asit olmak üzere bol PUFA bulunur. LDL'nin içerdiği yağ asitlerinin bileşeni önemlidir. Oleik asit içeriğinin artırılması oksidasyona duyarlılığı azaltır.
2. Düşük dansiteli lipoproteinde bulunan  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, ubikuinol-10, likopen, probukol gibi antioksidanlar lipid peroksidasyonunun hızlı fazı başlamadan önce tüketilir. Miktarlarının fazla olması oksidasyona direnci artırıp lag fazın uzamasını sağlar.
3. Düşük dansiteli lipoprotein partikül büyüklüğü: Küçük, yoğun LDL tipleri oksidasyona daha duyarlıdır. Obesite, trigliserid yüksekliği ve düşük HDL-kolesterolün küçük ve yoğun LDL ile birlikteliği sıklıkla görülür.
4. Fosfolipaz A<sub>2</sub> aktivitesi önemlidir.

B. Ekstrensek faktörler:

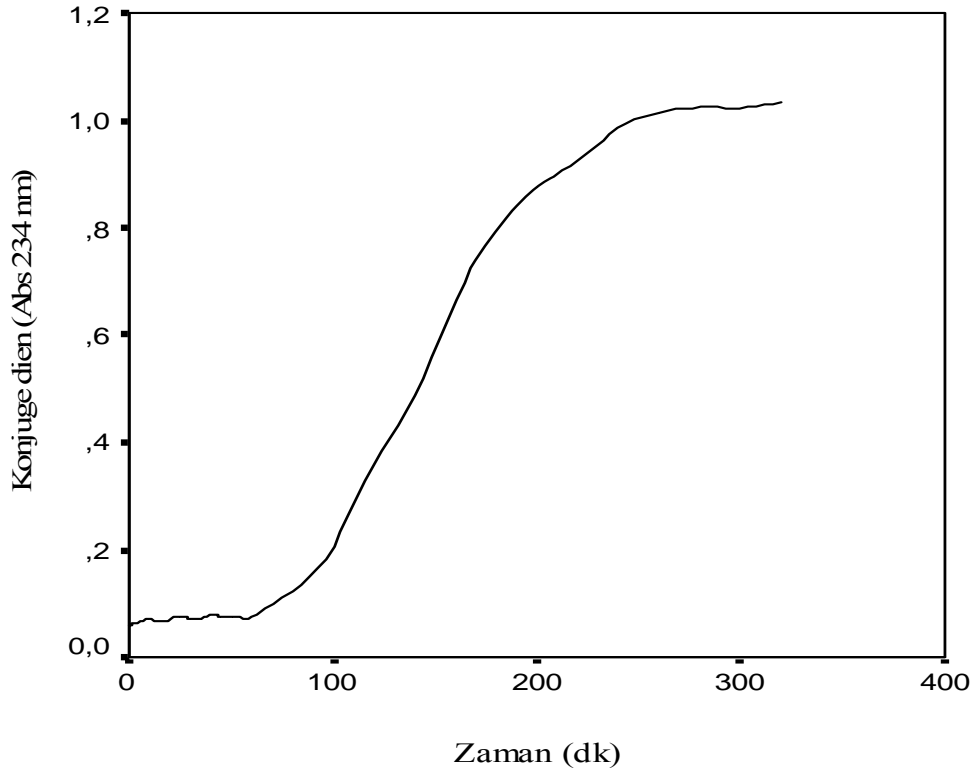
1. Hücresel prooksidan aktivitesinde, örneğin, hücrelerin süperoksit anyonu salgılama yeteneği ve makrofajların 15-lipoksigenaz içeriğindeki farklılıklar oksidasyonu etkiler. In-vitro düşük serbest metal konsantrasyonunda metallerin makrofajlarca uzaklaştırılması ile antioksidan, aksi takdirde prooksidan aktivite baskın hale geçer (98).
2. Plazma ve hücre dışı sıvıda selenyum, demir, bakır gibi metaller ile bu metalleri bağlayan proteinlerin konsantrasyonu yanısıra ürik asit, askorbik asit gibi antioksidanların düzeyi önemlidir.
3. Lipid peroksidasyonunu azaltma özelliği nedeni ile HDL konsantrasyonu önemlidir.
4. Lipoprotein (a)'ı bağlayan glikoprotein ve matriks proteinlerindeki değişiklikler ile LDL ve matriks proteinlerinin non-enzimatik glikozilasyonu LDL'nin intimada bulunma süresini, dolayısı ile oksidasyonu etkiler.
5. Diyetle bulunan antioksidanlar da LDL'nin oksidasyona direncini artırır (68, 74, 99).

Okside-LDL belirleme yöntemleri :

- a. Direkt: Araşidonik asitin serbest radikalle katalizlenen peroksidasyonunu gerektiren mekanizma ile oluşan F<sub>2</sub> izoprostanlar, Ox-LDL'ye karşı antikor, antioksidan durum, volatil hidrokarbonlar, oksisterol veya yağ asidi içeriğinin ölçümü ile yapılır (68).

b. İndirekt: LDL izole edilerek *in vitro* oksidatif stres oluşturulur. Gecikme fazı (lag faz) ve oksidasyon hızı ölçülür (şekil 7). Konjuge dien oluşumu, lipid peroksit oluşumu, aldehit oluşumu (örneğin MDA'nın florometrik ölçümü), doğal LDL'ye oran ile artmış negatif yüke bağlı gelişen elektroforetik mobilite, apo B-100 lizin birimlerinin reaktif aldehitlerle reaksiyonu sonucu oluşan fleurosans izlenebilir (77).

En uygunu kan ve idrarda F2 izoprostan ölçümü, en yaygın kullanılan ise konjuge dien oluşumu ile oksidatif yatkınlığın saptanmasıdır (99).



Şekil 7: Bakır indükleyici LDL oksidasyonu

## 2.2.7. Koroner Arter Hastalığı Teşhis Yöntemleri

**2.2.7.1. Elektrokardiogram (ECG veya EKG) :** Kalbin kasılma ve dinlenme durumundaki elektrikselsel aktivitesinin grafik kayıdır. Anormal kalp atışları, hasarlı bölgeler, yetersiz kan akışı ve kalp büyümesi, kayıtlardan anlaşılabilir (100).

**2.2.7.2. Stres testi (egzersiz ECG) :** Egzersiz esnasında meydana gelen değişimlerin daha yakın izlenmesidir. Yine de tek başına koroner arter hasarını göstermek için yeterli değildir (100).

**2.2.7.3. Nükleer scanning:** Kalbin pompalama gücünü ve hasarlı bölgeleri görüntülemek için kullanılır. Genellikle radyoaktif materyal kullanılır, tarayıcı kamera ile kalp kası tarafından alınan (sağlıklı bölge) ve alınamayan (hasarlı bölge) bölgeler görüntülenir (100).

**2.2.7.4. Koroner anjiografi (veya arteriografi) :** Koroner anatomiye gösteren en önemli tanı metodudur. Katater kol veya femoral arter yoluyla kalp arterlerine kadar ilerletilir. Kalp pompalama yaparken, kalp ve damarları görsel olarak değerlendirilir. Ateroskleroza bağlı darlık ve diğer koroner arterleri ilgilendiren anomaliler ile sol ventrikül fonksiyonları değerlendirilir (100).

## 2.3. PARAOKSONAZ /ARİLESTERAZ (PON 1)

### 2.3.1. Tarihçe

Paraoksonaz, ilk olarak 1953 yılında Aldridge W.N. (101) tarafından *p*-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütirat'ı hidroliz eden A-esteraz olarak teşhis edilmiştir. 1965 yılında, Ooms A.J. ve Boter HL tarafından (102), paratiyon ve paraokson hidrolizindeki stereospesifliği ile tanımlanmıştır. 1973 'te bir grup Alman araştırmacı, ilk olarak insan serum paraoksonazını genetik olarak saptamıştır (103). Paraokson, metil paraokson ve klormetil paraoksone yüksek derecede seçicilik gösterdiği için, paraoksonaz olarak adlandırılmıştır. 1985'lere kadar paraoksonazın nörotoksik olan organofosfatlar üzerine etkisi incelenmiş, saflaştırılması yapılmış ve detoksifikasyondaki rolü araştırılmıştır (104). 1985 yılında Mackness M.I. ve arkadaşları (105), ilk olarak HDL-ayırımı için santrifüj rotorunu geliştirirken, HDL-kolesterol ayırımı esnasında lipoprotein fraksiyonunda arilesteraz aktivitesine rastlamışlardır (105). Farklı popülasyonlarda (fransız, sudanlı vs) polimorfizm analizleri yapılmış ve allelik formları belirlenmiştir. 1987 yılında miyokart infarktüsü (MI) ile paraoksonaz arasındaki ilişki araştırılmış ve MI teşhisinde kullanılacak bir enzim olmadığı anlaşılmıştır (106). 1988 yılında Mackness ve arkadaşları (107), PON1' in HDL üzerinde apo A-I'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini ve 1991 yılında LDL üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır. Sonraki yıllarda, farklı kardiyovasküler hastalıklarda enzim aktiviteleri incelenmiş, lipoproteinlerle ve lipid peroksidasyonu ile ilişkisi araştırılmış ve enzimin aminoasit dizisi belirlenmiştir.

### 2.3.2. Genetik ve polimorfizm

Paraoksonaz ve arilesteraz her ne kadar iki ayrı enzim olarak algılanırsada, yapılan çalışmalar ve araştırmalar göstermiştir; İnsan serumunda tek gen ürünü enzim hem arilesteraz hem de paraoksonaz aktivitesine sahip olduğu işlenmiştir. Hatta bu enzimin laktonaz aktivitesine de sahip olduğunu gösteren yayınlarda mevcuttur (108). İnsanda 7. kromozomun uzun kolunda q-21.3 ve q-22.1 arasında tanımlanabilen paraoksonaz gen ailesinin PON1, PON2 ve PON3 şeklinde 3 üyesi bulunur. Gelişimsel açıdan bakıldığında, gen duplikasyonu sonucu oluşarak yapısal benzerlik gösteren genlerdir. PON1, PON2 ve PON3 genlerinin memeliler arasında; nükleotid seviyesinde benzerlikleri %81-90 iken aminoasit seviyesindeki benzerlikleri %79-90 dır. PON1'de 106. kodonda (lizin) bulunurken, PON2 ve PON3'te lizin bulunmamaktadır. Yıllarca PON1 ile yapılan çalışmalarda, insan serum kapasitesi, ksenobiotikleri hidrolize etmesi ve aterosklerosis arasındaki ilişki

araştırılmıştır. PON2 ve PON3, hakkında yapılan araştırmaların azlığı nedeniyle PON1 kadar iyi anlaşılammışlardır. PON1 ve PON3 genlerinin ürünü plazma da yer alırken, PON2'nin hücre içi yerleşimli olduğu söylenmektedir (109,110). Son yıllarda yapılan bazı araştırmalarda PON2 ve PON3 gen ailesinin PON1'in HTLase aktivitesine katkıda bulunduğunu ve PON2 ve PON3' ün KAH da en az PON1 kadar kıymetli olduğunu rapor etmişlerdir (111). Fakat bizler PON1 den bahsederken aslında PON1'in paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesinden bahsedeceğiz. PON1 de 2 aminoasit polimorfizmi vardır. Bunlardan biri 55. pozisyonda metionin ile lösin (M/L) aminoasitlerinin yer değişmesiyle, diğeri 192. pozisyondaki arginin ve glutamin aminoasitlerinin yer değiştirmesinden [R/Q(bazı kaynaklarda Q yerine A genotip, R yerine B genotip kullanılmaktadır)] meydana gelir. PON1 promotor bölgesinde bu polimorfizmlerden başka bilinen beş tane daha polimorfizm bulunur. Populasyonlardaki polimorfik dağılım bireyler arasında farklılığa neden olur. Polimorfizm arilesteraz aktivitesini etkilemez, arilesteraz aktivitesi PON1 aktivitesindeki değişikliklerden bağımsız, esas olarak protein konsantrasyonunun göstergesi olarak kabul edilebilir. Yani Paraoksonaz; aktivite polimorfizmi göstermeyen arilesteraz aktivitesine de sahiptir (112). PON1'in 55. pozisyonda lösin (L genotip) yerine metionin (M genotip) gelmesinin aktivite üzerine etkisinin çok az olduğu belirtilmiştir (113). Ancak 192. pozisyondaki arjinin yerine glutamin gelmesi aktiviteyi en az 8 kat azaltmaktadır. Paraoksonaz enzim aktivitesindeki polimorfizm, PON1<sub>192</sub>R izoformu, paraoksonu PON1<sub>192</sub>Q formundan daha hızlı hidroliz ederken, PON1Q192 izoformu diazokson, somon'u daha hızlı hidroliz eder (114).

Paraoksonaz allozimlerin kantitatif ve kalitatif olarak farklı olduklarının keşfi ile fenotipleme metodları geliştirilmiştir. 1984'te La Du BN ve ark. dual substrat metodu diye adlandırdıkları bu metoda göre (115); İki izoenzimin tuz ve pH'ya farklı yanıtlarına göre iki fenotip tanımlamıştır. Tuza yanıt veren B allozim paraoksona karşı daha yüksek enzim aktivitesine sahiptir. Paraoksonaz aktivitesi 1M (Molarite) NaCl ile stimüle edildiğinde aktivesi artarken, arilesteraz aktivitesinde ise düşme olduğu tespit edilmiştir. Bu analizde trimodal dağılım izlenir. Geniş-düşük aktivite piki "düşük aktiviteli homozigotları-AA", küçük yüksek aktivite piki "heterozigotları-AB", en küçük aktivite piki ise "yüksek aktiviteli homozigotları-BB" temsil eder. En yaygın homozigot-AA (QQ), ikincisi heterozigot-AB (QR), en az olanı homozigot-BB(RR)'dir. Paraoksonaz polimorfik dağılımı büyük interetnik değişkenlik gösterir. Karakaya ve ark. (116), bu tipte trimodal dağılımı Türk populasyonunda göstermiştir. Ancak bu trimodal dağılımı ilk olarak Mallinckrodt ve ark, tarafından sergilenmiştir (117).



Paraoksonaz için ilgili insan geni ayrıca HUMPONA olarak isimlendirilmektedir. Düşük paraoksonaz aktivitesi hiperkolestrol ve diyabetlilerin de içinde bulunduğu KAH hastalarında görülür. Çünkü bu gruplarda lipid peroksidasyon ürünleri, aterosklerozis'in gelişimini hızlandırır ve insan şilomikronlarında lipid oksidasyon ürünlerini artırır. Ayrıca PON1 aktivitesinin diyet alımıyla yakından ilişkili olduğu söylenmektedir. Diyetle bulunan meyve, çay ve tereyağının PON1 aktivitesi artırdığını ve diyet içeriğindeki karbonhidrat, protein, MUFA, PUFA, E Vitamini, flavonoidler ve Qercetin ile korele olduğunu rapor eden çalışmalar mevcuttur (118) Yüksek seviyedeki PON1'den saflaştırılmış PON1<sub>192</sub>RR ve PON1<sub>55</sub>LL'nin paraokson hidrolitik aktivitesi en yüksekken, PON1<sub>192</sub>QQ ve PON1<sub>55</sub>MM de bu aktivite en düşüktür. R allelin kodladığı proteinin paraokson hidroliz aktivitesi Q allele göre sekiz kat yüksektir. Aktivitenin ara basamağı homozigotlardır (119). Substrat spesifitesinin benzer basamakları metil paraokson, klortion-okson gibi diğer oksonlarda ve armin'de gözlenebilir. Diğer yandan paraoksonaz alloenzimlerin oksidasyondan LDL'yi koruma kapasitesi paraokson hidrolitik aktivitesi ile tamamen terstir. Böylece, PON1<sub>55</sub>MM / PON1<sub>192</sub>QQ alloenzim bulunan bireylerin HDL ve PON1 ile ilişkili olarak en büyük koruma kapasitesine sahip olmalarının yanında, bu alloenzimler diazoxon ve somon ve sarin gibi sinir gazlarını hidroliz etmede de aktif rol üstlenirler (120,121).

Türk popülasyonunda oldukça düşük oranda görülen RR alleli; doğu popülasyonlarından düşük Avrupa ırkına yakın değerler göstermiştir (122). Düşük aktivite görülen Q alleli Avrupa, Kanada ve Amerika'da yüksek, Avustralya, Aborjin, Zambiya ve Zimbabve'de düşüktür. Avrupa popülasyonlarında izlenen %50 civarında düşük aktivite izoformu ve bimodalite Avrupa'dan uzaklaştıkça azalır. Afrika ve doğu ülkelerinde dağılım unimodaldır, bu ırklarda düşük aktiviteli genotip sıklığı az görülür.

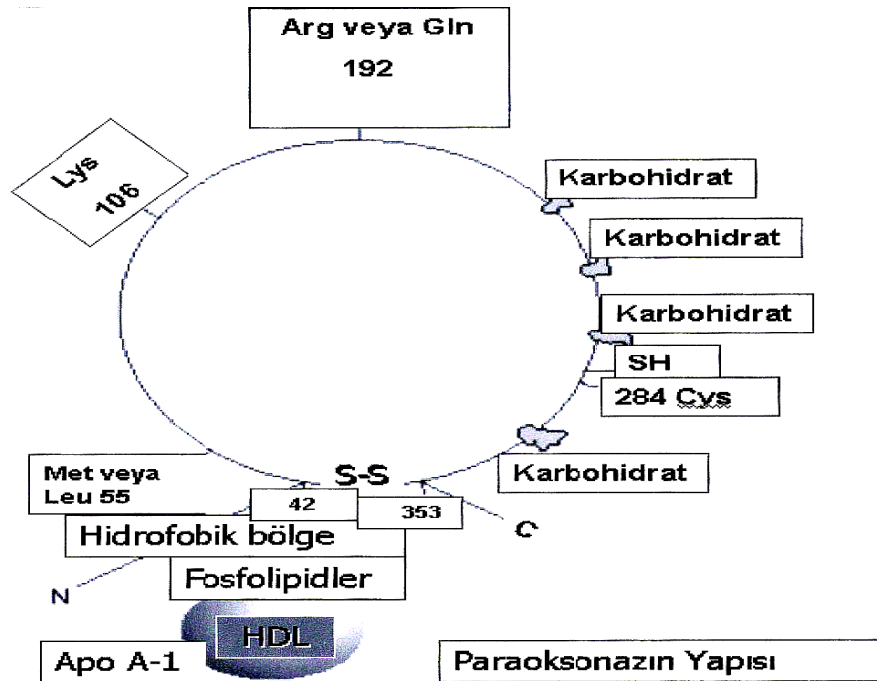
### **2.3.3. Yapı ve etki**

Paraoksonaz (EC 3.1.8.1.) 43-45 kDa ağırlığında, 354 amino asit içeren ve glikoprotein yapısında olan, kalsiyum bağımlı bir esterazdır. Her molekül toplam ağırlığın % 15.8'ini oluşturan üç karbohidrat zinciri içerir. İzoelektrik noktası 5.1'dir. İnsan serum paraoksonazı; HDL'nin içerdiği apo A-1 ile yakın ilişkileri olan, lipid peroksidasyon ürünlerinin birikmesini azaltan diğer bir deyişle LDL'deki okside olmuş lipidleri hidroliz eden, antioksidan etki gösterdiği çeşitli kaynaklarda belirtilen, enzim aktivitesi kalsiyuma bağımlı karaciğerden sentezlenen esterazdır. Organofosfatların hidrolizini katalizler. Karaciğer, böbrek, barsak ve serumda HDL'ye bağlı, yaygın olarak bulunur (18,123). PON1, paraokson gibi fosfonik ve fosfinik asit esterleri üzerine etki eder. Şelatör maddeler tarafından inhibe olur, aktivite için divalan katyonlara ihtiyaç duyar (124).

İnsan serum paraoksonazı yaşa bağlı olarak azalma gösterir (125). Serum düzeyleri birçok nedene bağlı olarak değişebilir ve enzimatik aktivite bireyler arasında 10-40 kat değişkenlik gösterir (126). Serum enzim aktivitesi yenidoğan ve prematür infantlarda erişkin düzeylerinkinden daha düşüktür. Erişkin düzeylerine doğumdan bir yıl sonra ulaşılır. Fetüs'ün karaciğer ve dalağında enzim aktivitesi gösterilmiştir (127,128). Ayrıca akciğer, beyin, pankreas ve plasentada bulunduğu yolunda kanıtlar vardır. Hayvanlarda birçok dokuda özellikle karaciğer, böbrek, ince barsak ve plazmada bulunur. Serum PON1 düzeyleri diyet, akut faz reaktantları, gebelik ve apo A-1 metabolizmasını etkileyen bozukluklardan etkilenir(129).

Paraoksonaz'ın protein kısmında 354 amino asit içinde substrat tanınması ve bağlanması için gerekli olan serbest sisteinlerin yalnız üç tane sistein rezidüsü vardır. Yapısında bulunan üç sistein amino asidinden 284'teki serbest iken, diğer ikisi (Cys 42-352) arasında tek disülfid bağı bulunur. Sisteinler esteraz aktif merkezinin anahtar bileşeni olmasını sağlamıştır. Dolayısıyla enzim aktivitesi sülfhidril bileşikleri ile inhibe olur ve bu inhibisyon sistein ile geri döner. Bu da PON1'in antioksidan kapasitesinin serbest tiyol gruplarıyla orantılı olduğunu göstermektedir (130).

Aşağıdaki şekilde Paraoksonazın HDL ile etkileşim bölgelerini göstermektedir. Pozisyon 55 ve 192' de iki polimorfik bölge belirtilmiştir. Rezidü 42 ve 353 arasında sisteinlerin oluşturduğu disülfid bağı ve 284 pozisyonunda sistein vardır. Potansiyel karbohidrat zincirleri ve amino terminal ucunda hidrofobik baş gösterilmiştir (131).

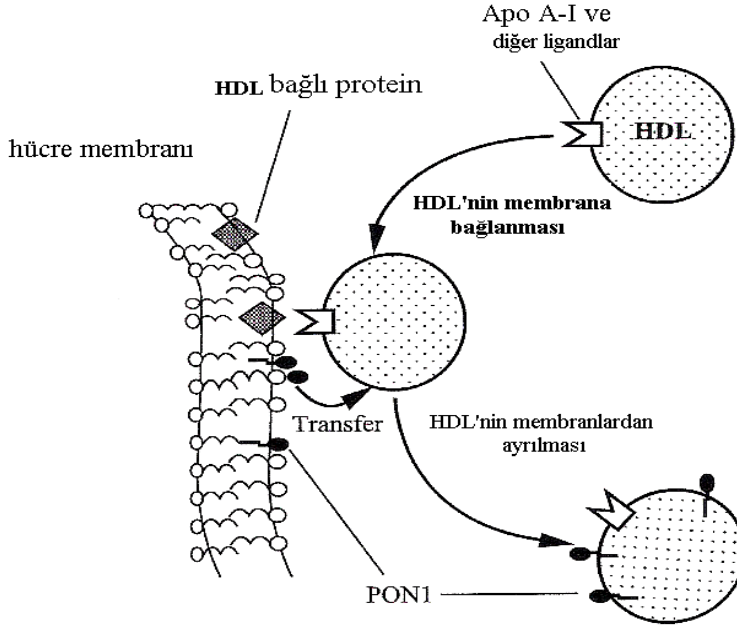


Şekil 8: Paraoksonazın HDL ile etkileşimi

Enzim aktivitesini ölçmede, serum yada EDTA'sız plazma gereklidir. Çünkü yapısında kalsiyumun direk olarak katalitik reaksiyonda yer aldığı veya aktif alanın uygun konformasyonunu sağlayarak korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir. E52 ve D53 aminoasitlerinin kalsiyumu ( $Ca^{+2}$ ) bağladığı, histidin ve triptofan başta olmak üzere en az yirmi aminoasit ile disülfid bağının arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesi için temel olduğu ortaya konmuştur. Paraoksonaz/arilesteraz enzim aktivitelerinin  $Ca^{+2}$ 'a bağımlı olma özelliğiyle  $Co^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  kullanan diğer A esteraz tipi enzimlerden ayrılır. Tavşan ve insan cDNA klonlarının nükleotid dizilimleri arasında %86, aminoasit dizilimleri arasında %85 benzerlik gösterilmiştir. İnsan ve tavşan serum paraoksonazı amino terminalinde hidrofobik sonlanma nedeniyle diğer lipoproteinlere ve lipid içeren partiküllere sıkı bağlanır. Bu hidrofobik bölge ile HDL'deki fosfolipidlere bağlandığı ortaya konmuştur.

Apolipoprotein A-1'in, paraoksonazın fosfolipidlere bağlanması ve stabilizasyonunda rol oynadığı düşünülmüştür. Özellikle HDL<sub>3</sub> faksiyonunun fazla olduğu bireylerde ve Apo J içeriğinin yüksek olduğu HDL<sub>3</sub>'lerde paraoksonaz aktivitesinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir (132,133). Dolaşımdaki PON1 ve HDL arasındaki ilişki, PON1 ekspresyonu ve biyolojik rolü, HDL ile ilişkili diğer proteinlerce etkilenebileceğini göstermiştir. Örneğin, PON1 ancak HDL tarafından sunulduktan sonra, endojen substratı ile etkileşebilir ve biyolojik özelliklerini sergileyebilir. Bu nedenle, PON1 ve HDL arasındaki ilişkinin anlaşılması, katalitik komponentlerinin belirlenmesi açısından önemlidir (şekil 10). Diğer apoproteinler PON1 ve HDL ilişkisine katılabilir. PON1 ve Apo A-1 arasında ilişki noniyonik deterjanlar varlığında PON1 ve apoproteinler saflaştırılamamaktadır. Bu bulgulara ilaveten, enzimi Apo A-1'den ayırmak için noniyonik deterjanlar kullanmak gerekmektedir (18).

Aldridge organofosfat bileşenleri ile esterazların etkileşimine dayanan esteraz sınıflamasının bir metodunu ortaya koymuştur. B esterazlara organofosfatları inhibe ederken, A esterazlar ise organofosfatları hidrolize eder. A esterazlar arildialkilfosfataz (paraoksonaz) ve diisopropilflourofosfataz (DFPaze)'ları içerir. Organofosfatları hidrolize eden A esterazlar, karbamatlar ve aromatik karboksilik esterlerdir. B esterazlar ise karboksiesteraz ve kolinesterazları içerir. Organofosfatlar tarafından asetilkolinesterazın inhibisyonu, insektisitler olarak büyük ölçüde kullanılır ve sinir gazları olarak pazarlanır. A esterazlar organofosfatları kısmi olarak zararsız maddelere hidrolize eder ve onların zararlı etkilerine karşı korur (134).

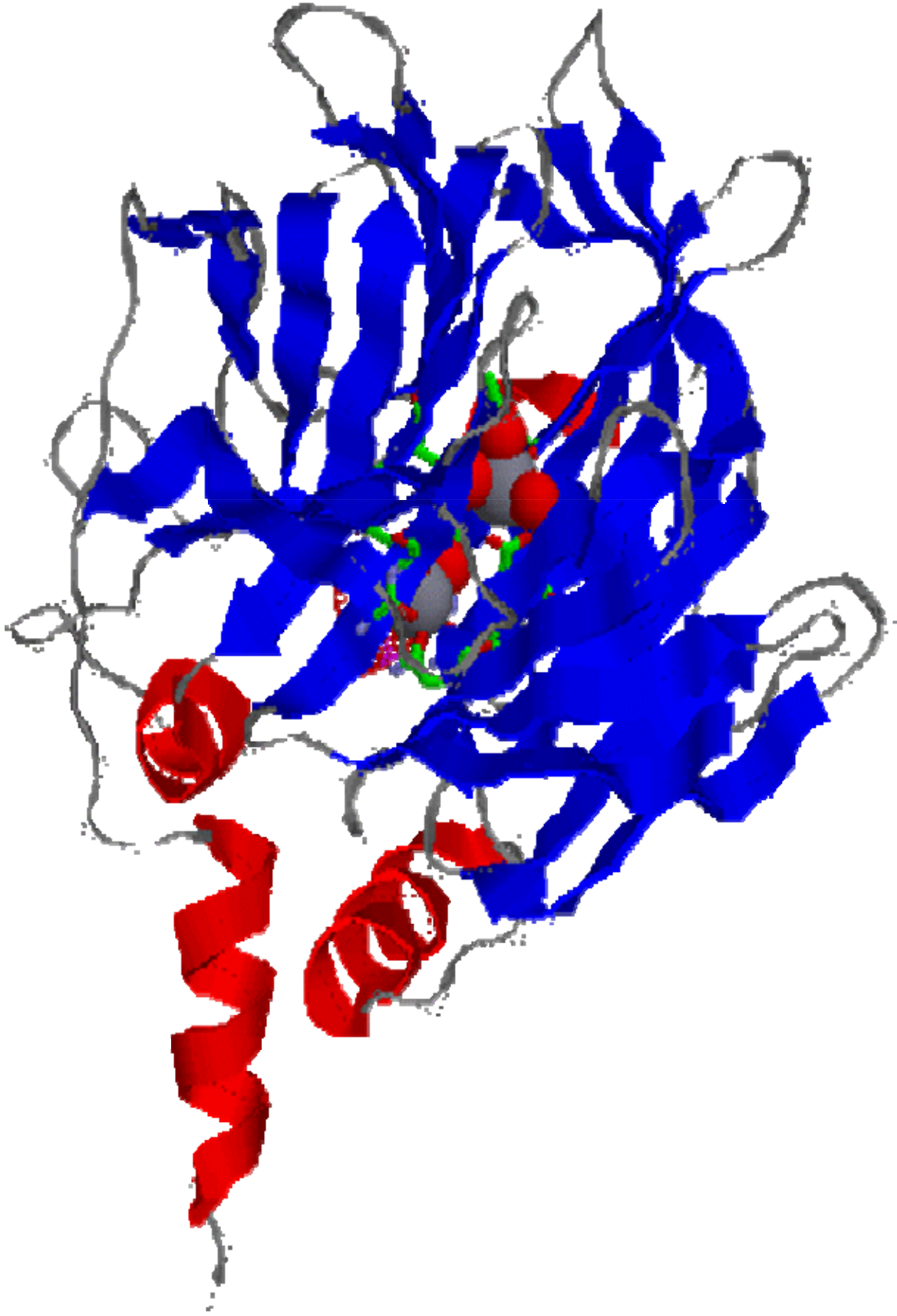


**Şekil 9:** *PON1* Enziminin hücrelerden HDL'ye transferi (135)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizi ile pozisyon 192'de polimorfizm saptanmıştır (şekil:12) (136). Esteraz yapısının ilginç bir özelliği, proteinin amino terminalinde hidrofobik amino asit rezdülerinin olmasıdır (137). Baş bölümün bağ oluşumundaki rolü buna bağlanmaktadır. Belkide Oluşmuş bir mutasyon baş sekansını değiştirmiş ve bu hidrofobik bölgenin yer değiştirmesini engellemiştir. Bu yapının varlığı proteinin diğer proteinlere bağlanma eğilimini arttırmış ve agregasyonunu sağlamıştır.

#### 2.3.4. PON1'in Diğer İsimleri

Organofosfat hidrolaz; paraoksonaz; A-esteraz; organofosfat esteraz; esteraz B1; esteraz E4; paraokson esteraz; pirimifos-metilokson esteraz; OPA anhidraz; organofosforöz hidrolaz; fosfotriesteraz; paraokson hidrolaz; organofosforöz asid anhidraz.



Şekil 10: *PON1* enziminin üç boyutlu yapısı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	Ala	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Thr	Leu	Val	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	15
16	Tyr	Lys	Asn	His	Arg	Ser	Ser	Tyr	Gln	Thr	Arg	Leu	Asn	Ala	Phe	30
31	Arg	Glu	Val	Thr	Pro	Val	Asp	Leu	Pro	Asn	Cys	Thr	Leu	Val	Lys	45
46	Gly	Ile	Glu	Ala	Gly	Ala	Glu	Asp	<b>Leu</b>	Glu	Ile	Leu	Pro	Asn	Gly	60
61	Leu	Thr	Phe	Phe	Ser	Thr	Phe	Leu	Lys	Tyr	Pro	Gly	Ile	Lys	Ser	75
76	Phe	Asp	Pro	Ser	Lys	Pro	Gly	Lys	Ile	Leu	Leu	Met	Asp	Leu	Asn	90
91	Glu	Lys	Glu	Pro	Ala	Val	Ser	Glu	Leu	Ala	Ile	Met	Gly	Asn	Thr	105
106	Leu	Asp	Met	Ser	Ser	Phe	Asn	Pro	His	Gly	Ile	Ser	Thr	Phe	Ile	120
121	Asp	Glu	Asp	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Leu	Val	Val	Ser	His	Pro	Asp	135
136	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Glu	Val	Phe	Lys	Phe	Gln	Glu	Glu	Glu	Arg	150
151	Ser	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Thr	Ile	Thr	His	Glu	Leu	Leu	Pro	Ser	165
166	Ile	Asn	Asp	Ile	Ala	Ala	Val	Gly	Pro	Glu	Ser	Phe	Tyr	Ala	Thr	180
181	Asn	Asp	His	Tyr	Phe	Ala	Asp	Pro	Tyr	Leu	<b>Arg</b>	Ser	Trp	Glu	Met	195
196	Tyr	Leu	Gly	Leu	Ser	Trp	Ser	Asn	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Asp	210
211	Lys	Val	Arg	Val	Val	Ala	Asp	Gly	Phe	Asp	Phe	Ala	Asn	Gly	Ile	225
226	Gly	Ile	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Tyr	Val	Tyr	Ile	Ala	Glu	Leu	Leu	240
241	Ala	His	Lys	Ile	His	Val	Tyr	Glu	Lys	His	Ala	Asn	Trp	Thr	Leu	255
256	Thr	Pro	Leu	Lys	Val	Leu	Ser	Phe	Asp	Thr	Leu	Val	Asp	Asn	Ile	270
271	Ser	Val	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Asp	Leu	Trp	Val	Gly	Cys	His	Pro	285
286	Asn	Gly	Met	Arg	Ile	Phe	Phe	Tyr	Asp	Ser	Glu	Asn	Pro	Pro	Gly	300
301	Ser	Glu	Val	Leu	Arg	Ile	Gln	Ser	Ile	Leu	Ser	Glu	Asp	Pro	Lys	315
316	Val	Thr	Val	Val	Tyr	Ala	Glu	Asn	Gly	Thr	Val	Leu	Gln	Gly	Thr	330
331	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Tyr	Lys	Gly	Lys	Leu	Leu	Ile	Gly	Thr	Val	345
346	Phe	His	Arg	Ala	Leu	Cys	Cys	Tyr	Leu							

**Şekil 11:** *PON1*'in aminoasit dizilimi. 55 ve 192 pozisyonlarında polimorfizimden sorumlu aminoasitler belirtilmiştir.

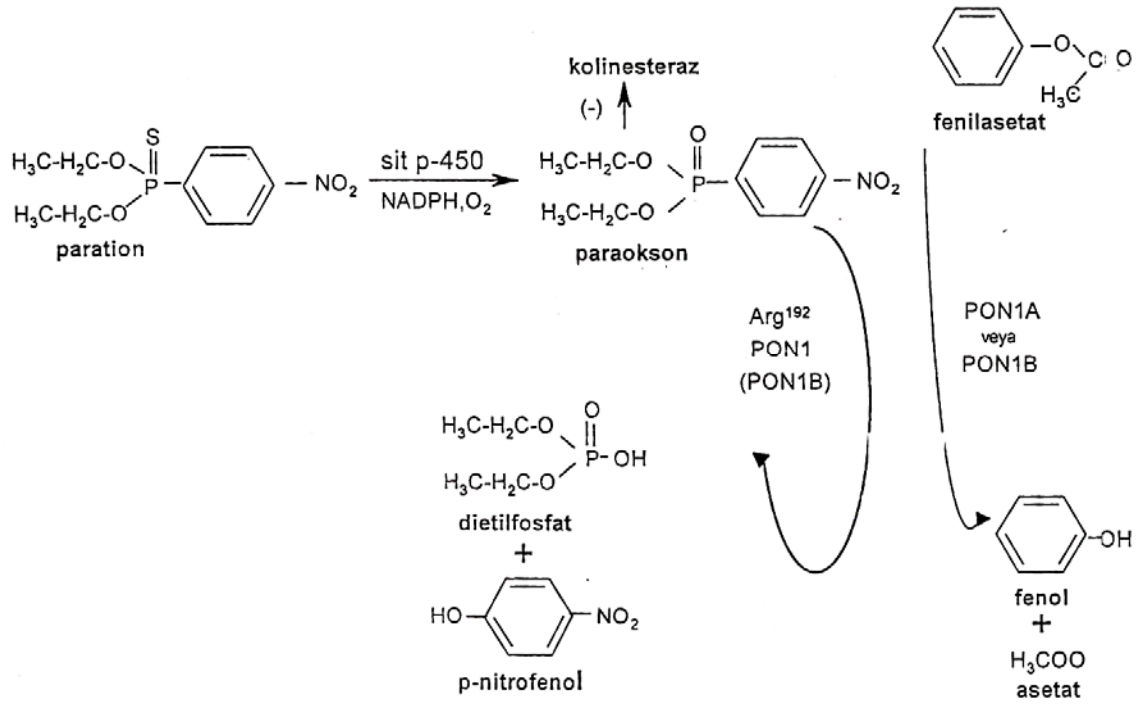
### 2.3.5. PON1 ve Organofosfatlar Arasındaki İlişki

Paroksonaz için doğal ve fizyolojik substrat keşfedilememiştir. Bu nedenle katalitik aktivite daha önceden var olan bir enzimin evrim sürecindeki değişimi ile oluşmuştur. Organofosfatlı insektisitlerin çok yaygın olarak kullanılıyor olması, bu modifikasyonda rol oynamış olabilir

Paraoksonaz'ın endojen serum ve doku substratlarına karşı spesifitesi karakterize edilmiştir. Sentetik substratlar bu enzim aktivitesini görüntülemek için kullanılır. Kısmen saflaştırılmış PON1 enjekte edilen ratlar veya saflaştırılmış PON1 enjekte edilmiş fareler (138,139) belirli organofosfat bileşiklerine karşı rezistanslarını arttırmışlardır. Bu nedendirki; PON1'in en iyi bilinen koruyucu fonksiyonu organofosfat sinir ajanları, aromatik karboksilik asit esterleri ve insektisitleri hidrolize etme yeteneğidir (Şekil 11). Paraoksan; asetilkolini yıkan kolinesterazların güçlü bir inhibitörüdür; Ardışık nöron overstimülasyonu ile sinaptik aralıkta asetilkolin birikimine neden olur (140).

Saf insan serum PON1 enziminin bazı organofosfat bileşiklerini hidroliz ettiği gösterilmesine rağmen, insan organofosfat metabolizması ile ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır. Farklı populasyonlarda izlenen aktivite değişkenliği organofosfat hidroliz hızlarında farklılık ile birlikte olabilmekte ve bu insanlarda seçici toksisiteyi etkileyebilmektedir. Organofosfatlara karşı koruma sadece enzimin kan ve doku düzeylerine değil, partiküler izoenzimlere de bağlıdır. PON1<sub>192R</sub> izoformu, paraoksonu PON1<sub>192Q</sub> formundan daha hızlı hidroliz ederken, PON1<sub>192Q</sub> izoformunun diazokson, somon ve sarin'i *in vitro* koşullarda daha hızlı hidroliz ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle PON1'in koruyucu rolü değerlendirilirken düzeyi, yanı sıra tipi de dikkate alınmalıdır (141,142,143).

Körfez savaşı sendromu olarak bilinen hastalık, Irak'a gönderilen Amerikan askerlerinde gözlenmiştir. Bazı askerlerde buna bağlı yorgunluk, kas güçsüzlüğü ve nörolojik hasarlar görülürken, bir diğer askerde sendrom belirtilerine rastlanmamıştır (144). PON1 enziminin, Irak tarafından kimyasal silah olarak kullanılmış olan sarin, diazokson gibi organofosfor bileşikleri detoksifiye ettiğinin anlaşılmasından sonra körfez savaşına katılmış olan askerlerde PON1 aktiviteleri araştırılmış ve körfez savaşı sendromu olan hastalarda PON1 aktivitesi oldukça düşük bulunmuştur (144).

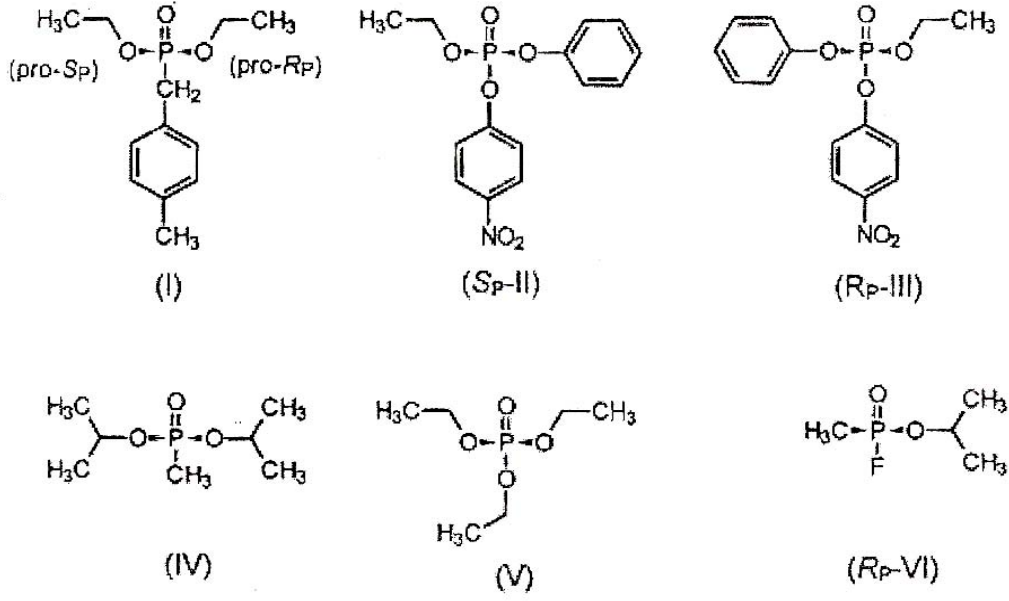


**Şekil 12:** PON1 ve hidroliz aktivitesi

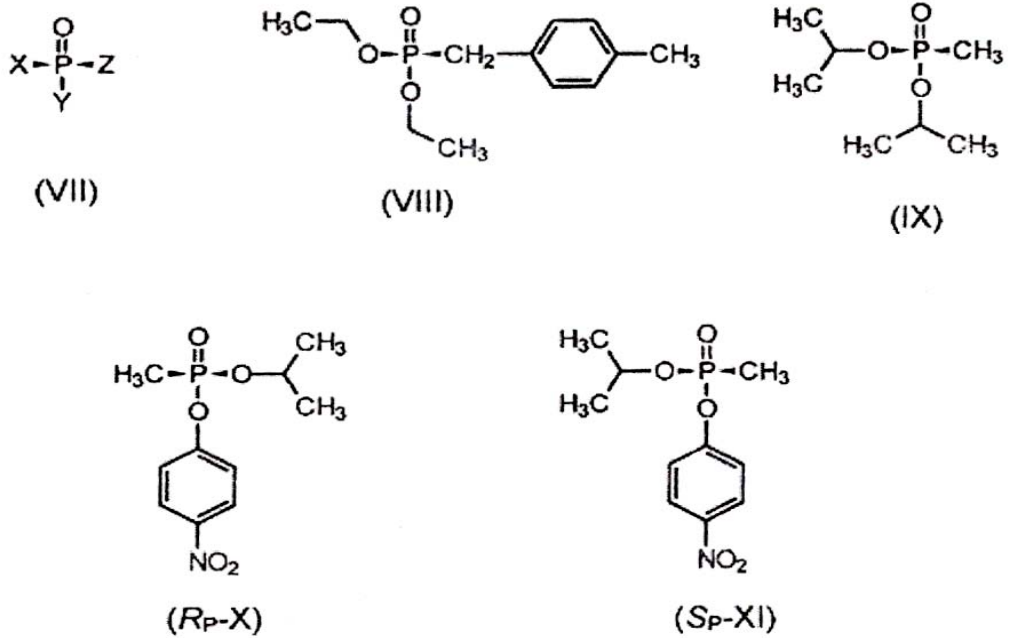
Birçok sayıdaki organofosfat bileşikleri Karaciğerde önce mikrozomal enzimler tarafından metabolize edilirler. Şekil 13 de görüldüğü gibi daha sonra bu bileşikler serum A-esterazlar (PON1 v.s) tarafından hidroliz edilirler. organofosforları hidroliz etmesi aynı zamanda karaciğerde de olduğu düşünülür. Böylece hepatik yıkımdan kaçan okson, paration, somon, sarin v.b organofosfatlar kendi etki alanına girmeden önce (bu alanlarda asetilkolinesteraz'ı inhibe ederek nörotoksik etki gösterebilir) kanda serum PON1 enzimi ile hidroliz olur. Memelilere kıyasla kuşlarda serum PON1'in tam yokluğuna bağlı olarak organofosfat zehirlenmesine yatkınlık daha yüksektir (Bizim yayınlanmamış 43 bildircin ile olan bir çalışmamızda serum paraoksonazı ve arilesterazında herhangi bir aktiviteye rastlamadık). Benzer durum sürüngen ve balıkların zehirlenmeye yatkınlığını açıklar.



### 2.3.6. Paraoksonazın Substratları ve İnhibitörleri



Şekil 13: II ve III Paraoksonaz için substratır. I, IV ve V inhibitördür. VI ile gösterilen bileşik kimyasal silah ajanı sarindir. I: paraoksonun pro-Sp ve pro-Rp izomeri, II: etil fenil p-nitrofenil fosfat, III: Rp-izomeri, IV: diizopropil metil fosfonat, V: trietil fosfat (145).



Şekil 14: Organofosfat bileşikler: VIII ve IX inhibitördür, X ve XI substratlardır. VII: Organofosfonat kompleksi, VIII: dietil 4-metilbenzilfosfonat, IX: diisopropil metil fosfonat, X: p-nitrophenyl methyl phosphonate, XI: Sp-enantiomer (145).

### 2.3.7. PON1 ve Ateroskleroz Arasındaki İlişki

Paraoksonazın farelerde ateroskleroza karşı koruyuculuğu gösterilmiştir. Bu çalışmayı PON1' in okside olmuş lipidlerin metabolizmasındaki rolü (123) ve PON1<sub>192R</sub> izoformunun koroner arter hastalığında risk faktörü olarak belirlenmesi (146) yönündeki çalışmalar desteklemiştir.

Son yıllarda yapılmış olan çalışmalar, HDL' ye bağlı bir enzim olan PON1'in okside olmuş lipidlerin metabolizmasında ve aterosklerozdan korunmada önemli fizyolojik rolü olduğu yönündedir (68,123). Nitekim, yakın zamana ait çoğu çalışmalar, 1950'li yıllardan itibaren organofosfatlı insektisitlerin detoksikasyonu ile ilgilidir (103).

Paraoksonaz ve Apo A-1 arasındaki yakın ilişki, bu iki proteinin doğrudan bağlandığını düşündürür. İnsan ve tavşan serumlarından saflaştırılan PON1'in sekans analizleri PON1'in farklı bir özelliğini göstermiştir. Her iki türde de dolaşımda bulunan formu N-terminal hidrofobik sinyal sekansına sahiptir (136,137,139). Bu bulgular, PON1'in hidrofobik N-terminalinde sekansının HDL ile etkileşimini kolaylaştırdığı fikrini ortaya koymuştur. Bu sinyal peptid yapısında, büyük ve polar rezidüleri mevcutken, daha küçük rezidüleri de vardır ve sinyal peptidazlarla parçalanmalarına engel olur (137,138). Histidin ve glutamin rezidülerinin, pozisyon 20 ve pozisyon 21 'de sırasıyla alanin ile yer değiştirilmesi, *in vitro* normal ve salgılanan PON1, ekspresyonuna yol açar. Eksprese edilen protein, N-terminal hidrofobik sinyal sekansı bölünerek PON1' in lipoproteinlerle etkileşmesi için gerekli olup olmadığı araştırılmış ve PON1 ile HDL birleşmesi için N-terminal hidrofobik sinyal peptidinin yapıda gerekli olduğu saptanmıştır. Yine N-terminal hidrofobik peptid doğrudan fosfolipidlere, apolipoprotein noksanlığında bağlanır. PON1 ve HDL, HDL üzerindeki fosfolipidlere bağlanarak dolaşımda bulunabilir (124).

Serum paraoksonaz aktivitesi miyokard enfaktüslü (147), ailesel hiperkolesterolemili (124), diyabetik (124) hastalarda sağlıklılara göre daha düşük bulunmuştur. Her ne kadar PON1' in bazı organofosfat zehirlenmesine karşı koruyucu olduğu söylenirse de, fizyolojik rolü bilinmemektedir. Bunun yanı sıra, PON1' in oksidatif hasara karşı koruyucu olduğu belirtilmektedir (20,148,149). PON1'in LDL oksidasyonuna karşı antioksidan HDL savunmasına katkıda bulunduğu belirtilmektedir. HDL-aracılıklı PON1 veya saflaştırılmış PON1'in LDL oksidasyonu prosesinde, başlangıç (konjüge dien oluşumu), yayılma (peroksit oluşumu) ve ayrışma (aldehit oluşumu) fazlarındaki etkisi araştırılmıştır. HDL'nin LDL oksidasyonu üzerine olan inhibitör etkisinin, metal iyon şelasyonu veya peroksidaz benzeri

aktiviteden kaynaklandığı söylenilmektedir. HDL-PON1, okside olmuş LDL'den ayrılan uzun zincirli okside olmuş fosfolipidleri hidroliz edebilir (147-149).

PON1'in HDL oksidasyonuna karşı koruyuculuğu şu şekilde özetlenebilir:

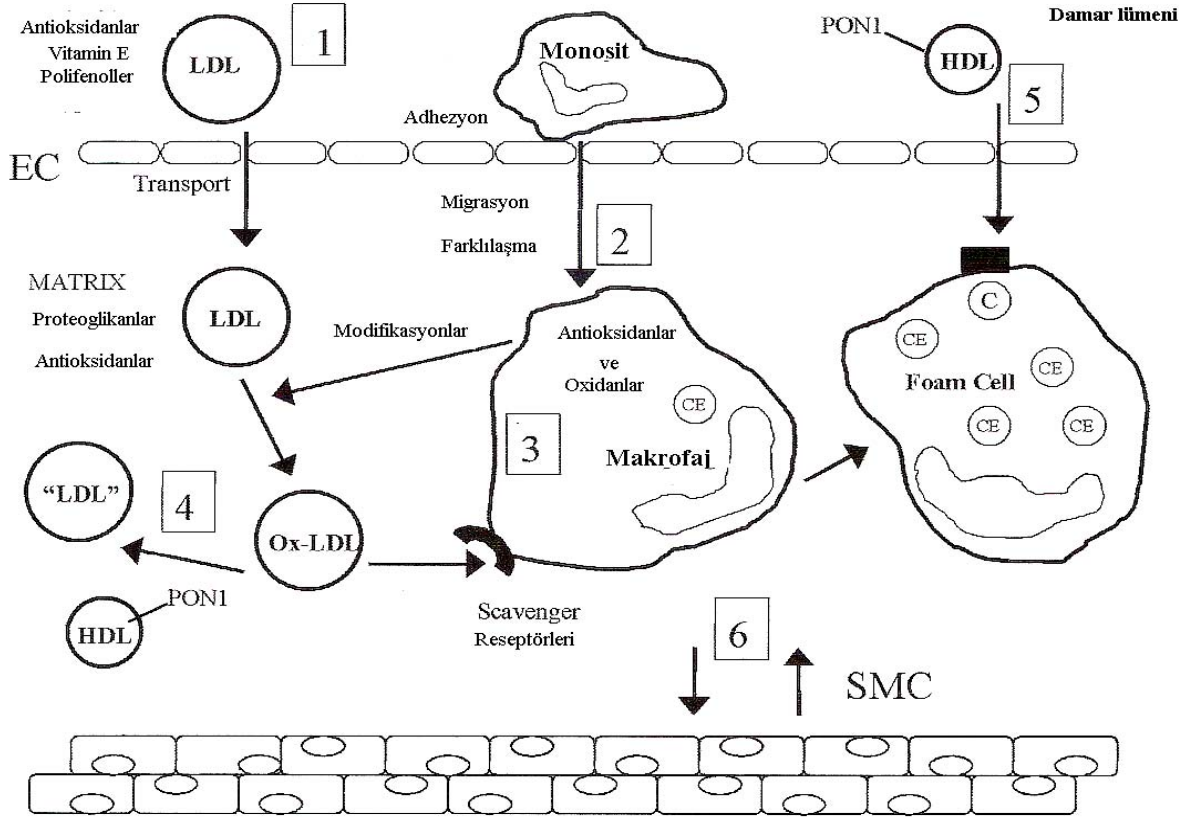
- İlk olarak serum HDL-PON1 aktivitesi ve HDL'nin okside olabilme özelliği PON1 Q' nun fenotipine sahip normal insan gönüllülerinde çalışılmış ve ters ilişki bulunmuştur. Bu gözlem, PON1 aktivitesi ve HDL oksidasyonu arasındaki belirgin ters ilişkiyi açıklayabilir. Bunun aksine, son epidemiyolojik kanıtlar PON1 panelinin koroner kalp hastalığında bir risk faktörü olabileceği yönündedir (95). PON1 R alloenzimi, PON1 Q alloenziminin aksine, LDL oksidasyonuna karşı daha zayıf bir inhibitör olarak belirtilmiştir. Bu fenomen aterojenite ile ilişkili olabilir.
- İkinci olarak, saflaştırılmış PON1'in HDL oksidasyonu üzerinde konsantrasyon-bağımlı inhibitör etkisi gözlenmiştir.
- Üçüncü olarak serumda PON1 miktarının artırılması HDL' nin oksidasyona karşı direncini arttırmıştır. İlave edilen PON1' in büyük kısmı HDL bağımlıdır.
- Dördüncü olarak, HDL'nin oksidasyona yatkınlığı, PON1 inhibitörleri ile ön muamele edildikten sonra artmıştır.
- Beşinci olarak PON1 inhibitörlerinin serum PON1 aktivitesini azalttığı ve HDL'nin oksidasyonunu arttırdığı gözlenmiştir.
- Altıncı olarak, PD-65950'nin (PON1 inh) konsantrasyona bağımlı olarak HDL-PON1 aktivitesini azalttığı ve HDL oksidasyonunu arttırdığı saptanmıştır.
- Son olarak, aterosklerotik apoprotein-E eksikliği oluşturulan farelerde, serum PON1 aktivitesi ve serum lipidlerinin oksidatif düzeyi arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Apo E eksik olan farelerde hızlı ateroskleroz oluşumu ve oksidatif stres artışı belirgindir (150).

Benzer şekilde, aterojenik diyet uygulanan farelerde diyet aracılıklı aortik yağ kalıntılarına yatkındır (151). Bu koşullar altında, farede serum PON1 düzeyleri baskılanmıştır ve LDL oksidasyonuna karşı savunma yeteneğini kaybetmiştir. Kısmen okside olmuş LDL'nin bu farelere enjeksiyonu serum PON1 aktivitesini belirgin şekilde düşürmüştür (152).

### **2.3.8. PON1' in Ox-LDL ile Etkileşimi**

Yüksek dansiteli lipoprotein bağımlı PON1, LDL'yi oksidasyona karşı korur ve aynı zamanda PON1 makrofajlarda oksidatif stres'den korur (153). PON1 inhibitörleri HDL ile birlikte eklendiğinde, LDL oksidasyonunun artırması hem PON1 inaktivasyonuna hem de HDL lipitlerinin total lipit peroksit oluşumuna katılmasına bağlıdır (11).

*İn vivo* serum PON1 HDL'ye bağlı olduğu için başlıca görevi HDL'yi oksidatif stresin zararlı etkilerinden korumaktır. Bu nedenle, bir çok çalışma HDL bağımlı PON1'in yalnız LDL oksidasyonunu değil, aynı zamanda HDL oksidasyonunu da (geçiş metal iyonları ve serbest radikalleri aracılığıyla oksidasyon indüklendiğinde) engellemektedir (Şekil 16). Bu etki PON1'in lipoprotein-kaynaklı peroksitlerini hidroliz edebilme özelliğine bağlıdır (123). Benzer ester bağı lipoprotein kaynaklı fosfolipid peroksitlerinde ve kolesteril ester peroksitlerinde bulunabilir. Okside olmuş lipoproteinlerde benzer bir kimyasal yapı HDL-bağımlı PON1 için fizyopatolojik substrat olabilir. Okside olmuş HDL'de bulunan peroksitlerin PON1 aracılığıyla hidrolizi, PON1'in daha önce oluşturulmuş olan okside lipoproteinler üzerine ve buna bağlı olarak aterojenik etkileri geri çeviren mekanizmalarda rol oynadığını düşündürür. Okside olmuş HDL' ler üzerine PON1 etki ettikten sonra, yağ asiti hidroperoksitlerinin birikimi azalmıştır. Nitekim bu ürünler hızla metabolize edilirken, PON1 esteraz aktivitesi azalmamıştır (123).



**Şekil 15:** *Oxidatif stress altında plazma LDL ve monositlerin arterial duvarda birikmesi ve monositlerin makrofajlara farklılaşması. LDL'nin ekstraselüler matrix proteoglikanlara bağlanıp daha sonra makrofajlardaki scavenger reseptörleri tarafından içeri alınıp Foam cell denilen köpük hücre oluşturması ve PON1'in etkisi (CE: Kolesterol esterleri, C: Kolesterol, SMC:Düz kas hücreleri).*

Paraoksonaz ve arilesteraz yalnızca lipoprotein kaynaklı peroksitleri (kolesterol linoleat hidroperoksitleri) hidroliz etmekle kalmaz, bunun yanısıra hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) de hidroliz eder. PON1 spesifik lipid peroksitleri hidroliz eder veya peroksitler için hedef görevi görür.  $H_2O_2$ , arteriyel duvar hücreleri tarafından aterogenez esnasında üretilen başlıca reaktif oksijen türüdür (ROS) ve oksidatif stres altında LDL oksidasyonuna neden olan daha potent ROS'a dönüşür (124). HDL kaynaklı PON1'in  $H_2O_2$  (peroksitlerle beraber) hidroliz etmesi, aterosklerozda rol alan potent oksidanların eliminasyonunda önemlidir. Bu etki PON1'in peroksidaz benzeri aktivitesiyle ve HDL'nin antiaterojenik özelliklerine iştirak etmesiyle açıklanabilir (131).

Yüksek dansiteli lipoprotein kardiyo-protetif etkisi, aterojenik LDL oksidasyonunun inhibisyonu veya azaltılması ile yorumlanmaktadır (11,105,123). Bu inhibisyonu özellikle MCP-1'in endotel hücrelerinden stimüle ederek yaptığı ileri

sürülmektedir (154). PON1, doymamış yağ asitlerinin hidroperoksi türevlerini elimine ederek, kısmen okside olmuş fosfolipidleri metabolize eder. (123). Bu nedenle, PON1 ile KAH arasındaki korelasyon, biyoaktif lipid moleküllerinin metabolizması ve okside olmuş LDL'ye bağlı hasara karşı koruyucu olması ile ilişkilidir (104). LDL, poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan aldehit yapıdaki bileşikler, apolipoprotein B üzerindeki lizin rezidülerini modifiye edebilir. Buna bağlı olarak okside olmuş LDL, B/E reseptörüne tanınmaz, makrofaj yakalayıcı reseptör tarafından kontrolsüz uptake uğrar. Sonuç olarak, aterosklerotik lezyonların ilk basamakları olan köpük hücreleri ve yağ kalıntıları oluşur (124).

### 2.3.9.Çeşitli Hastalıklarda PON1

Hipergliseminin oksidatif stres ve ateroskleroza zemin hazırladığı düşünülürse, DM'li olgularda serum PON1'in rolü ortaya çıkar. PON1<sub>192RR</sub> ve PON1<sub>55LL</sub> genotipleri IDDM'li (independent Diabetes mellitus) olgularda daha sık izlenmiştir. Ancak yapılan bir çalışmada DM, hiperkolestrolemi, böbrek yetmezliği gibi KAH ile ilişkisi olduğu bilinen hastalıklarda düşük serum PON1 aktivitesinin genotipten bağımsız olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Diyabetik retinopati ve hipertansiyon gelişen olgularda izlenen düşük serum PON1 aktivitesi, lipid peroksidasyonuna artmış yatkınlıktan kaynaklanmaktadır (155).

Lipid peroksidasyonu ve oksidatif hasar etkisi ile gelişen nöronal dejenerasyon izlenen Alzheimer hastalığının ateroskleroz ile ilişkisi bilindiğinden PON1 polimorfizmi ile ilişkisi incelenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamamıştır (156). Hepatit C enfeksiyonlu hasta grubunda yapılan bir çalışmada paraoksonaz aktivitesi düşük bulunmuş ve bunlarda PON1<sub>192RR</sub> polimorfizminin daha yüksek olduğu tespit edilmiş (157). Düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlara yüksek miktarda C ve E vitamini verilmesiyle PON1'in polimorfizm de ve doğum ağırlığında değişiklikler saptanmıştır.(158).

Tavşan inflamasyon modelinde serum amiloid A ve seruloplazmin içeren akut faz HDL artışı ile apo AI, PON1, PAF' ta belirgin azalma gösterilmiş ve HDL'nin antiinflamatuvar/antioksidan durumdan proinflamatuvar/prooksidan duruma dönüşümü sorumlu tutulmuştur.

Ateroskleroz riski bulunan üremik renal transplantlı olgularda düşük PON1/HDL ve PON1/apoAI oranları izlenerek bu olgularda HDL'nin antioksidan kapasitesinin azaldığı düşünülmüştür. Sporadik idiyopatik Parkinson olgularında PON1 ile metabolize olan çevresel nörotoksinlerin yaşla birlikte nörodejenerasyondan sorumlu tutulabileceği ve B allelin Parkinson hastalığına genetik yatkınlık oluşturabileceği ileri sürülmüştür.(159).

Hiperhomosisteinemi olan çocuklarda paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktiviteleri düşük bulunmuş ve bunlarda metilasyon reaksiyonlarındaki bozukluğa bağlı olarak nörotransmitterlerin yapısının bozulabileceği bildirilmiştir (160). Lipid oksidasyonuna predispozan bir hastalık olduğu öne sürülen hipertroidili hastalarda paraoksonaz aktivitesi düşük bulunmuştur (161).

Antikardiolipin antikoru pozitif bulunan bir grup hastada mmLDL'ye karşı otoantikoru arttığı, PON1 aktivitesinin belirgin olarak düştüğü ve arteriyel tromboz geliştirme riski yüksek olan R genotipinin de artma eğiliminde olduğu izlenmiştir (162). Sistemik amiloidozda düşük PON1 aktivitesi bildirilmiştir.

Plazma lipoprotein düzeylerinin normalden farklı olduğu balık gözü sendromunda HDL kolesterol'ün plazma konsantrasyonunun %90 oranında, PON1 aktivitesinin ise %89 düzeyinde azaldığı gösterilmiştir. Diğer yandan bir başka lipoprotein metabolizma hastalığı olan Tangier hastalığında ise PON1 enzim aktivitesi tayin edilememiştir (163,164). Pilon stenozlu infantlar yüksek PON1 aktivitesine sahiptirler. Pilon stenozu operasyonla düzeltildikten bir hafta sonra enteral beslenmenin başladığı zamana kadar yükseklik devam eder (165). Van Lenten ve arkadaşları enflamasyonlu tavsan modellerinde akut faz olarak HDL, amiloid A ve seruloplazminin arttığını diğer taraftan apo A1 ve PON1'in ise dramatik olarak azaldığını göstermişlerdir (166).

Bazı deneysel çalışmalarda serum PON1 aktivitesinde değişikliklere rastlanmıştır; yapılan bir çalışmada inflamatuvar cevabın bir parçası olarak düşünölmekte ve ilginç olarak PON1 aktivitesinin kronik olarak azalmasının, sadece ateroskleroza artırmakla kalmayıp, aynı zamanda akut inflamatuvar şartlara göre daha fazla vücutta kuvvetten düşmeye neden olduğu görölmüştür (167).

Sigara gibi çevresel faktörlerin PON1 aktivitesini ve konsantrasyonunu baskılayarak enzimin etkinliğini değiştirebilir. PON1'in paraoksanase aktivitesinin hormon replasman tedavileri ile arttığı gösterilmiştir (129).

Paraoksonaz enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunduğu prostat kanserli bir çalışmada PON1 geninin 102. kodon'unda yeni bir polimorfizm bulunduğunu ve bu polimorfizm 102'de İzolösinin Valin ile yer değiştirmesiyle meydana geldiğini, bu polimorfizm'in prostat kanserinin nedenlerinden biri olabileceğini ileri sürölmektedir (168).

### 2.3.10. Bakteriyel endotoksinlerin toksisitesine karşı koruma

Paraoksonazın buraya kadar ortaya konan fonksiyonlarının doğal fonksiyonları olmadığı düşünülür. Çünkü organofosfat bileşikleri doğada bulunmayan sentetik maddelerdir ve PON1'in bu maddeleri hidroliz etmesi tamamen tesadüfidir. Ox-LDL üzerine etkisinin organik fosfatlarla fosfolipidlerdeki bağların yapısal benzerliğinden kaynaklandığı düşünülürse PON1 enziminin gerçek substratının farklı olması gerektiği ortaya çıkar. İnsan serumunda HDL'de bulunan bir proteinin bakteriyel lipopolisakkaridi inaktive ederek endotoksemik semptomları önlediği yirmi yıl önce gösterilmiş ancak lipopolisakkarid inaktivasyonunun immunolojik olmaktan çok enzimatik bir reaksiyon olduğu ve sorumlu enzimin PON1 olduğu yeni saptanmıştır (131). PON1, bakteriyel lipopolisakkaridi 'Lipid A' molekülündeki 4' fosfat üzerine fosfataz etkisi ile hidroliz eder. HDL'nin bir alt birimi olan tripanolitik faktör (TLF) "trypanosoma brucei brucei"e sitotoksiktir ve apo A-1, haptoglobülin ve PON1 ile ilişkili bir proteindir. Lizozomal pH'da PON1 peroksidaz aktivitesi gösterir. HDL'nin gram (-) bakteriyel enfeksiyon sırasında endotoksemi gelişimine karşı koruyucu olduğu bilinmektedir. Bazı bilinmeyen yollarla makrofaj hücre yüzeyindeki spesifik bağlayıcı protein (Cd14) ile lipoprotein polisakkaridin etkileşimini önler. Bu şekilde TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 gibi sitokin salınım kaskadının başlaması önlenir. PON1 tip ve düzeyinin bireylerin endotoksinlere karşı direnç ve duyarlılığında fark oluşturup oluşturmadığı sorusu henüz açıklığa kavuşturulamamıştır (140).



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Hasta seçimi

Çalışmaya Şubat 2004 - Nisan 2005 tarihleri arasında harran üniversitesi tıp fakültesi kardiyoloji kliniğinde anjiyografisi yapılan hastalar arasından istenen özelliklere uygun 147 hasta ve 160 kontrol olmak üzere 307 kişi alındı. Çalışma grubuna alınan kişilerden bilgilendirilmiş olur formu ve ayrıca üniversitemizden etik kurul kararı alınarak bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışma grubuna böbrek yetmezliği, kalp yetmezliği, malignite, anemi dislipidemi, hipertansiyon ve diabetes mellitus gibi sistemik hastalığı bulunan olgular alınmadı. Sağlıklı ve herhangi bir ilaç kullanmayan kişilerden kontrol grubu oluşturuldu. Kardiyoloji anabilim dalı arşivinden hasta dosyalarına ait bilgiler derlendi. Yaş, cins, boy, vücut kitle indeksi, koroner anjiyografi öyküsü, aile öyküsü, eşlik eden hastalıklar, kullanılan ilaçlar, sigara kullanımı, menapoz durumu değerlendirildi. Koroner anjiyografi öncesi tüm olgularda 8-10 cc heparinli tüpe kan alındı. Koroner anjiyografi standart judkins tekniği ile femoral arter yolu ile yapıldı. Koroner anjiyografileri sonucunda, damar lümeninde %50 veya daha fazla darlık bulunanlar koroner arter hastası olarak kabul edildiler. Damar lümenindeki darlık %50'nin altında olup ancak değerlendirilmesi yapılamayan kişiler çalışma dışı bırakılıp hiç darlık bulunmayan bireyler ise kontrol grubu olarak kabul edildi.

Hastalardan alınan kan örnekleri 3500 rpm' de 10 dakika santrifuj edilerek plazmaları ayrıldı. Daha sonra bu örnekler çalışma zamanına dek -80 °C de saklandı. Plazma paraoksonaz/arilesteraz aktivitesi, fenotipik dağılım, total peroksit, lipid hidroperoksit, HDL ve LDL ölçüldü. Ayrıca LDL seperasyonu yapılarak maksimum lipid oksitlenebilirlik kapasitesi, toplam oksitlenebilirlik kapasite ve lag faz araştırıldı.

#### 3.2. Kullanılan cihaz ve aletler

<u>Cihaz</u>	<u>Firma</u>
Otoanalizör	Abbott Aeroset
Santrifuj	Universal 30 RF
Vorteks	DCA-VF-2
otomatik pipetler	Gilson
Visible spektrofotometre	Jasco V-530 UV/VIS
Hassas terazi	Sartorius
Su banyosu	Nüve BM 402
Derin dondurucu (-80 °C)	Uğur
pH metre	Hanna

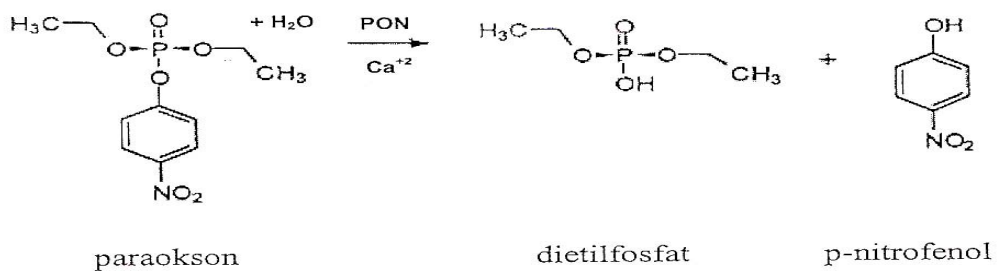
### 3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

<u>Madde</u>	<u>Firma</u>
Paraokson (O, O-dietil-o-p-nitrofenil fosfat)	Sigma
Fenilasetat	Sigma
Trizma HCl	Sigma
CaCl <sub>2</sub>	Sigma
NaCl	Sigma
Trizma base	Sigma
EDTA (Triplex III)	Merck
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Merck
NaOH	Merck
HCl	Merck
Glasiyel asetik asit	Merck
Ortofosforik asit	Merck
Triklorasetik asit	Fluka
Disodyum hidrojen fosfat	Fluka
Monosodyum hidrojen fosfat	Fluka
Tiyobarbitürük asit	Fluka
Trisodyum sitrat	Fluka

### 3.4. Paraoksonaz Aktivitesinin Ölçümü

Paraoksonaz aktivitesi, Furlong (139,140) ve Mackness' in (8) metodları kullanılarak ölçüldü. Paraoksonaz'ın katalizlediği reaksiyon aşağıda görüldüğü gibidir.

Aril dialkil fosfat + H<sub>2</sub>O → Dialkil fosfat + aril alkol



Paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümünde substrat olarak paraokson (0,0- diethy -0-p-nitropheny phosphate), arilesteraz ölçümünde ise substrat olarak fenil asetat kullanılmıştır. Paraoksonaz aktivite ölçümünde 5 mM CaCl<sub>2</sub> ve 7 mM paraokson ihtiva eden pH=8 olan 100 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı ve Reaktif 1 (R1) olarak kabul edildi. Numune hacminden 10µL reaktif 1'den 220µL alınarak abbott aeroset otoanalizör cihazına tatbik edilerek çalışıldı. Paraoksonaz'ın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenol'ün 412 nm deki dakikalık absorbans oluşumu kaydedildi. Molar absorpsiyon katsayısı 18290 (ε) alınarak (139,140) aktivite için 1 ünite, 1 mikromol p-nitrofenol/ml serum/dk olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$IU / lt (\mu\text{mol} / \text{dk}/L) = \frac{\Delta A/\text{dk} \times T.V (\text{ml}) \times 10^6}{\epsilon \times \text{Işık yolu} \times N.V (\text{ml})} = \frac{\Delta A/\text{dk} \times (T.V \times 10^6)}{\epsilon \times \text{Işık yolu} \times N.V}$$

A: Absorbans

ΔA/dk : Dakikalık absorbans artışı

T.V: Deney tüpündeki toplam sıvı miktarı

10<sup>6</sup>: Sonuçları µmol /dk/L = U/L'ye çevirme katsayısıdır.

ε : Ekstinsiyon katsayısı: Reaksiyon sonunda okunan maddenin molar absorbtivite katsayısı olup sabit bir değerdir.

ε = A/l x C'dir. A= çözeltilinin gerçek absorbansı, l= ışık yolu (cm), C= çözeltilinin konsantrasyonu (mol/L) dir.

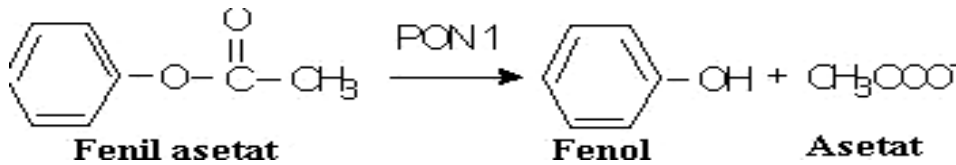
Işık yolu: Okuma küvetinin çapı (cm cinsinden)

N.V: Reaksiyona katılan numune hacmi.

### 3.5. Arilesteraz Aktivitesinin Ölçümü

Arilesteraz aktivitesi ölçümleri için ise 2 mM CaCl<sub>2</sub> ihtiva eden 100 mM Tris-HCl; pH=8 tamponu kullanılarak; substrat olarak paraokson yerine son konsantrasyonu 13 mM olacak şekilde fenilasetat ilave edilmistir ve arilesteraz'ın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan fenol 270 nm de Jasco V-530 UV/VIS spektrofotometresinde dakikalık fenol oluşum absorbansı ölçülmüştür. Molar absorpsiyon katsayısı 1310 (ε) alınarak (8,139,140) arilesteraz aktivitesi için 1 ünite, 1 mikromol fenol/ml serum/dk. olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada numune volümü 400 kat dilüe edilerek çalışılmıştır. Sonuçlar yine paraoksanazdaki enzim aktivitesi formülüne göre hesaplandı ve U/L olarak değerlendirildi.

Reaktif 1 tekrar hazırlanıp fenotipik ayırım için içerisinde 1M NaCl ilave edilerek paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi için tekrar çalışıldı. Sonuçlar yine yukarıdaki gibi hesaplandı.



### 3.6. LDL oksidasyon ve lag faz

Hazırlanan hasta serumlarından 1ml alınır ve üzerine 7 ml tri sodyum sitrat tamponu (50,000 Ü/L heparin içeren pH=5,05, 65 mM sodyum sitrat tamponu) eklenir. 15 dakika bekletildikten sonra 5000 rpm de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant dökülür ve geriye kalan pellet (Çökmüş lipoprotein), pH=8, 100mM fosfat tamponu ile protein başına 1mg/ml olacak şekilde dilüe edilir. Daha sonra son konsantrasyon 5µM CuSO<sub>4</sub> olacak şekilde oksitlenmeye bırakılır. Sıfır kör okunur ve ilk bir saatte 6 dakikada bir, daha sonra 4 saat boyunca 20 dk da bir total peroksitler ölçülür. Aradaki beklemler 40 °C'de subanyosu yapıldı. Sonuçlar µmol/mg LDL protein olarak değerlendirildi (99). MedCalc 7.2 software programı kullanılarak lipid oksidasyon grafiği değerlendirildi. Oksidasyonun başlangıç evresi sırasında endojen antioksidanların varlığı ile LDL oksidasyonunun baskılanıp ve gecikme fazı ile sonuçlanan alan lag faz olarak değerlendirildi (85). Bu evre ortalama 34-114 dk sürer. Antioksidanların tükenmesiyle lag fazını hızlı bir ilerleme fazı takip eder konjuge dienlerin oluşmaya başlamasıyla oksidasyon devam eder ve sonuçta bir plato çizerek en yüksek noktaya ulaşır ki; bu nokta maksimum oksitlenebilirlik kapasite olarak ele alındı. Sonuçta LDL'nin yıkımı ve dallanmasıyla aldehit oluşumu meydana gelir. Çalışmanın sonlandırıldığı

dakikadan itibaren elde edilen eğrinin altında kalan alanın tamamı ise toplam oksitlenebilirlik kapasite olarak değerlendirildi.

### 3.7. Rutin biyokimya tetkikleri

Yüksek dansiteli lipoprotein ve LDL-kolesterol ölçümleri Abbott marka ticari kit kullanılarak Japon malı toshiba firmasının abbott aeroset otoanalizör cihazında rutin biyokimya kitleri kullanılarak yapıldı.

### 3.8. Total peroksit ölçümü

Total peroksit Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir metod ile ölçüldü (169). Bu metoda göre örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-*o-dianisidine* kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xylenele orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Yötemin 1.reaktif pH'sı 1,75 ve 140 mM'lık NaCl içeren 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solüsyonu içine 1.35M Gliserol ve 150µM Xylenele orange içermektedir. 2. reaktif ise yine pH'sı 1,75 140 mM'lık NaCl içeren 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solüsyonu içine önce 10 mM *o*-Dianisidine dihidrochloride ve sonra 5 mM amonyom ferröz sülfat çözülerek reaktif hazırlanır. Daha sonra reaktif 1'den 225 µL numunelerden 35 µL ve reaktif 2'den 11 µL olacak şekilde 560 nm dalga boyunda otoanalizöre uyarlanarak ölçüm gerçekleştirilir.

### 3.9. Lipid hidroperoksit ölçümü

Lipid hidroperoksit ölçümü Khelifa Arab ve arkadaşları tarafından geliştirilen metod ile çalışıldı (170). Bu metod yine total peroksite benzer bir yöntem ile asidik ortamda lipid hidroperoksitlerin ferröz iyonlarını ferrik iyonla dönüştürülmesi ve ferrik iyonların Xylenele orange ile 560 nmde renk oluşturması esasına dayanır Ancak total peroksit ölçüm metoduyla aralarında kullanılan kimyasal maddelerden dolayı fark vardır.

### 3.10. İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel hesaplamalar Windows SPSS 11.0 ve MedCalc 7.2 software programı kullanılarak yapıldı. İki grup arasında farklılıklar independent t test ve parametreler arası ilişki pearson korelasyon analizi kullanılarak karşılaştırıldı. Kantitatif değerler ortalama  $\pm$  standart sapma ( $X \pm SS$ ) olarak belirtildi. Kontrol ve hasta grubundaki fenotipik dağılım ki-kare testleri ile belirlendi. One-way analysis of variance (ANOVA) testi fenotip grup ile damar tutulum sayısı grubundaki biyokimyasal parametrelerin analizinde kullanıldı. MedCalc programı kullanılarak grupların maksimum oksitlenebilirlik kapasite, Area Under Curve (AUC) hesaplanarak toplam lipid oksitlenebilirlik kapasiteleri ve lag fazlarının uzunluğu tespit edildi. Sonuçlar % 95 güven aralığında, anlamlılık  $P < 0,05$  düzeyinde değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Anjiyografi sonuçlarına göre bulgular

**Tablo 3:** Hasta ve kontrol gruplarında fiziksel değerlerin karşılaştırılması

	<b>Kontrol (n=160)</b>	<b>Hasta (n=147)</b>	<b>P</b>
	<b>Ortalama ± SS</b>	<b>Ortalama ± SS</b>	
Cinsiyet (E/K)	74/86	78/69	> 0.05
Yaş (yıl)	52 ± 14	57 ± 10	< 0.05
Uzunluk (cm)	167 ± 21	164 ± 24	> 0.05
Ağırlık (kg)	63.7 ± 11.4	61.4 ± 9.3	> 0.05
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.3 ± 4,4	23 ± 5,1	> 0.05

SS: Standart sapma

Koroner anjiyografi yapılan hasta ve kontrol gruplarının genel özellikleri tablo 3 de verilmiştir. Tablo 3 de görüldüğü gibi her iki grup arasında yaş dışındaki diğer parametrelerde istatistiksel olarak herhangi bir fark yoktu.

**Tablo 4:** Hasta ve kontrol gruplarının genel analiz sonuçları

<b>Parametreler</b>	<b>Kontrol (n=160)</b>	<b>Hasta (n=147)</b>	<b>p</b>
	<b>X±SS</b>	<b>X±SS</b>	
Paroksonaz (U/L)	258 ± 165	200 ± 146	< 0.001
Ariesteraz (kU/L)	169 ± 24	162 ± 23	< 0.001
Total peroksit (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv. / L)	14.90 ± 4,95	20.19 ± 6,05	< 0.01
HDL (mg/dl)	38.5 ± 8,3	34.12 ± 6,4	< 0.01
Paraoksonaz/HDL (IU/(mg/dl))	7.07 ± 5,2	5.9 ± 4,37	< 0.01
LDL (mg/dl)	111.71 ± 32	114 ± 31	> 0.05
Lipid hidroperoksit (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./ L)	4,52 ± 0,95	4.92 ± 0,85	< 0.01
Maksimum oksitlenebilirlik düzeyi (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./mg LDL protein)	63 ± 30,3	65.17 ± 31,9	> 0.05
Toplam oksitlenebilirlik düzeyi (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./mg LDL protein)	123 ± 54	162 ± 69	< 0.001
Lag faz (dk)	67 ± 15	58 ± 13	< 0.001

(x: ortalama, SS: Standart sapma p<0.05 anlamlılık ile independent t testine göre değerlendirildi.)

Yukarıda tablo 4 de görüldüğü gibi koroner anjiyografi yapılan olgularda anjiyografisi normal olan kontrol grubu ile anjiyografisinde 1 yada daha fazla damar tıkanıklığı saptanan hasta grupları arasında paraoksonaz, arilesteraz, HDL, Paraoksonaz/HDL, Total peroksit, lipid hidroperoksit, toplam oksitlenebilirlik düzeyi ve lag fazında (sırasıyla  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ) de anlamlı fark varken, LDL, ve Maksimum oksitlenebilirlik arasında (sırasıyla  $p>0.05$ ,  $p>0.05$ ) anlamlı bir fark bulunamamıştır.

**Tablo 5:** Hastalıklı damar sayısına göre analiz sonuçları

Parametreler	Bir damar (n=47) X ± SS	İki damar (n=43) X ± SS	Üç damar (n=57) X ± SS	p
Paroksonaz (U/L)	221 ± 151	212 ±139	172 ± 146	< 0.05 <sup>abc</sup>
Arilesteraz (kU/L)	162 ± 23	159 ±19	148 ± 22	< 0.05 <sup>abc</sup>
Total peroksit (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./L)	15.22 ± 1,22	15.55 ±1,48	16.72 ±1,62	< 0.05 <sup>a</sup>
HDL (mg/dl)	36 ± 7	34 ± 8	32 ± 9	> 0.05
Paraoksonaz/HDL (IU/(mg/dl))	6.73 ± 4,97	6.52 ± 4,85	6.22 ± 4,19	> 0.05
LDL (mg/dl)	112 ± 30,96	112 ± 28,62	114 ± 29,41	> 0.05
Lipid hidroperoksit (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./L)	4.61 ± 0,73	4.79 ± 0,82	4.88 ± 0,79	< 0.05 <sup>a</sup>
Maks. Oksitlenebilir LDL (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./mgLDLprotein)	64 ± 32,17	63 ± 29,59	65 ±36,23	> 0.05
Toplam Oksitlenebilir LDL (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./mg LDLprotein)	141 ± 53	161 ± 61	169 ± 59	< 0.05 <sup>ab</sup>
Lag Faz (dk)	56 ± 18	53 ± 11	51 ± 16	< 0.05 <sup>ab</sup>

(a: Bir damar ile iki damar arasındaki fark, b: Bir damar ile üç damar arasındaki fark, c: iki damar ile üç damar arasındaki fark, x: ortalama, SS: Standart sapma,  $p<0.05$  anlamlı kabul edilip ANOVA'ya göre değerlendirilmiştir)

Tablo 5'de görüldüğü gibi hastalıklı damar sayısına göre analiz sonuçları değerlendirildiğinde paraoksonaz ve arilesteraz her üç grup arasında da anlamlı fark olup hastalıklı damar sayısı artıkça paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktivitelerinde düşme



görülmektedir (a,b ve c için;  $p<0.05$ ). Total peroksit ve lipid hidroperoksit ise bir damar ile üç damar arasında fark varken (a için;  $p<0.05$ ), bir damar ile iki damar ve iki damar ile üç damar tutulumu arasında fark bulunamamıştır (b ve c için;  $p>0.05$ ). Toplam oksitlenebilirlik ve lag faz da ise bir damar ile iki damar ve tek damar ile üç damar arasında fark varken (a ve b için;  $p<0.05$ , ) iki damar ile üç damar tutulumu arasında fark olmayıp (c için;  $p>0.05$ ), maksimum oksitlenebilirlik arasında ise fark bulunamamıştır.

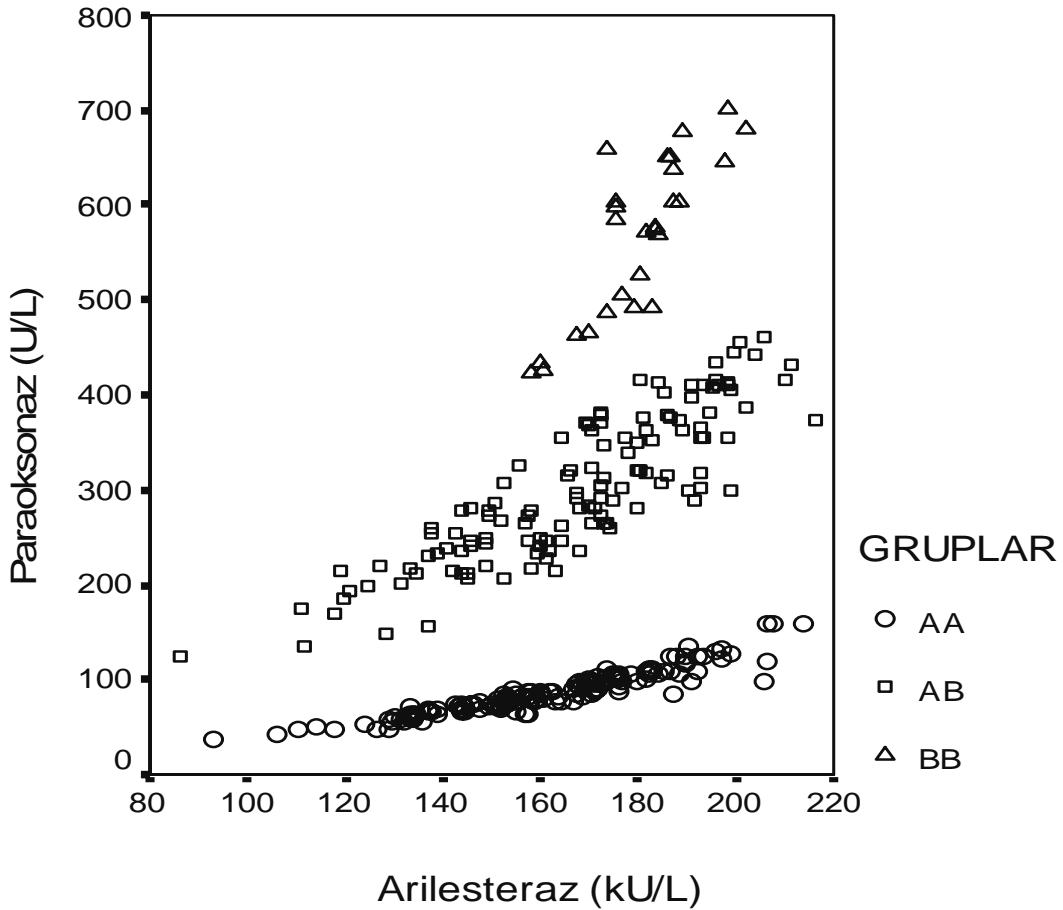
**Tablo 6 :** Hasta grubundaki biyokimyasal parametrelerin korelasyon analizleri

PARAMETRE	Lipid hidroperoksit	T.Peroksit	Toplam oksitlenebilirlik Düzeyi	Paraoksonaz	Arilesteraz	Damar sayısı	Lag Faz (dk)
Lipid Hidroperoksit		$r = 0,27$ $p < 0.05$					
T.Peroksit					$r = -0,33$ $p < 0.05$	$r = 0,22$ $p < 0.01$	
Toplam oksitlenebilirlik Düzeyi						$r = 0,27$ $p < 0.01$	
Paraoksonaz		$r = -0,27$ $p < 0.05$			$r = 0,57$ $p < 0.001$		
Arilesteraz						$r = -0,18$ $p < 0.05$	
Damarsayısı	$r = 0,24$ $p < 0.01$		$r = 0,25$ $p < 0.01$	$r = -0,17$ $p < 0.05$			$r = -0,23$ $p < 0.05$
Lag faz (dk)			$r = -0,26$ $p < 0.05$				

(Tablo da görüldüğü gibi Paraoksonaz, arilesteraz ve toplam oksitlenebilirlik düzeyi damar sayısı ile anlamlı korelasyon göstermektedir.)

#### 4.2. PON1 fenotipine göre bulgular

Paraoksonazın fenotipik ayırımı dual substrat metoduna göre yapılmıştır (115). Bu metoda göre paraoksonaz aktivitesi 1M (Molarite) NaCl ile stimüle edildiğinde aktivitesi artarken, arilesteraz aktivitesinde ise düşme olduğu tespit edilmiştir. Bu analizde trimodal dağılım izlenir. Geniş-düşük aktivite piki "düşük aktiviteli homozigotları (AA)", orta-yüksek aktivite piki "heterozigotları (AB)", küçük-yüksek aktivite piki ise "yüksek aktiviteli homozigotları (BB)" temsil eder. En yaygını homozigot-AA (QQ), ikincisi heterozigot-AB (QR), en az olanı homozigot-BB(RR)'dir (Şekil 16).



Şekil 16: Hasta grubundaki PON1 enziminin fenotipik dağılımı

**Tablo 7:** Kontrol ve hasta grubunun fenotipik dağılım

Fenotip	Kontrol	Hasta	<i>p</i>
AA	74 (%47)	65 (%44)	> 0.05
AB	68 (%42)	58 (%39)	> 0.05
BB	18 (%11)	24 (%17)	> 0.05
<b>Toplam</b>	160	147	

Bu çalışmamızdaki fenotipik dağılımın kontrol ve hasta grubunda nasıl bir seyir gösterdiği tablo 7 de görülmektedir. Hasta grubunda AA ve AB fenotip kontrol'e göre yüzde olarak düşük, BB ise yüksek olmasına rağmen yapılan ki kare analizleri sonucun da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ).

**Tablo 8:** Hastalıklı damar sayısına göre fenotipik dağılım

Fenotip	Hastalıklı damar sayısı			<i>p</i>
	Bir damar	İki damar	Üç damar	
AA	21 (%14)	23 (%16)	21 (%14)	$p>0.05$
AB	22 (%15)	9 (%0.6)	27 (%18)	$p>0.05$
BB	6 (%0.4)	8 (%0.5)	10 (%0.7)	$p>0.05$
<b>Toplam</b>	49	40	58	

Tablo 8'de hastalıklı damar sayısı ile fenotipik grup arasındaki dağılım görülmektedir. Yaptığımız ki kare analizleri sonucunda hastalıklı damar sayısı ile fenotipik grup arasında herhangi bir anlamlılık yoktu ( $p>0.05$ ).

**Tablo 9:** Hasta grubunun fenotipik dağılıma göre analiz sonuçları

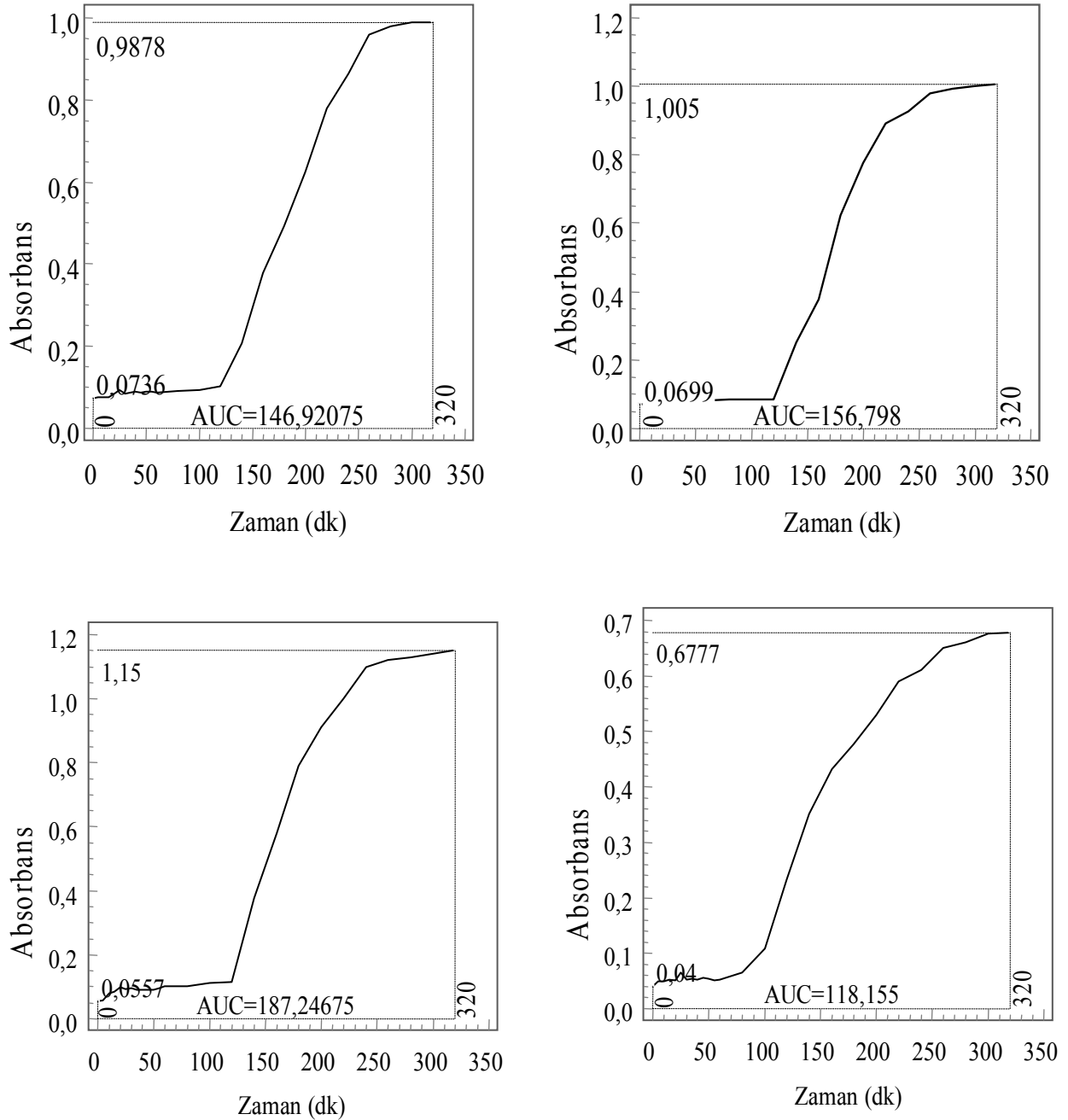
Parametre	AA (n=74) X ± SS	AB (n=60) X ± SS	BB (n=13) X ± SS	P
Paroksonaz (U/L)	84 ± 22	294 ± 81	536 ± 89	< 0.001 <sup>abc</sup>
Ariesteraz (kU/L)	158 ± 22	163 ± 26	178 ± 11	< 0.01 <sup>abc</sup>
Total peroksit (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./L)	14.7 ± 1,97	15.0 ± 1,85	15.2 ± 2,26	> 0.05
HDL (mg/dl)	34 ± 7,2	34 ± 5,7	33 ± 3,5	> 0.01
Paraoksonaz/HDL (IU/(mg/dl))	2.5 ± 0,90	8.7 ± 2,73	15.5 ± 3,28	> 0.05
LDL (mg/dl)	110 ± 33,49	112 ± 29,73	121 ± 29,50	> 0.05
Lipid hidroperoksit (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./L)	4.7 ± 0,82	4.8 ± 1,0	5.3 ± 0,97	> 0.05
Maks.Oksitlenebilirlik düzeyi (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./mg LDL protein)	60.7 ± 29,77	68.5 ± 42,70	51.6 ± 39,27	> 0.05
Top.Oksitlenebilirlik düzeyi (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./mg LDL protein)	137 ± 49	141 ± 57	144 ± 59	> 0.05
Lag faz (dk)	64 ± 11	63 ± 12	61 ± 15	> 0.05

(a:AA ile AB arasındaki fark, b:AA ile BB arasındaki fark, c: AB ile BB arasındaki fark, x:ortalama, SS:Standart sapma, p<0.05 anlamlı kabul edilip ANOVA'ya göre değerlendirilmiştir)

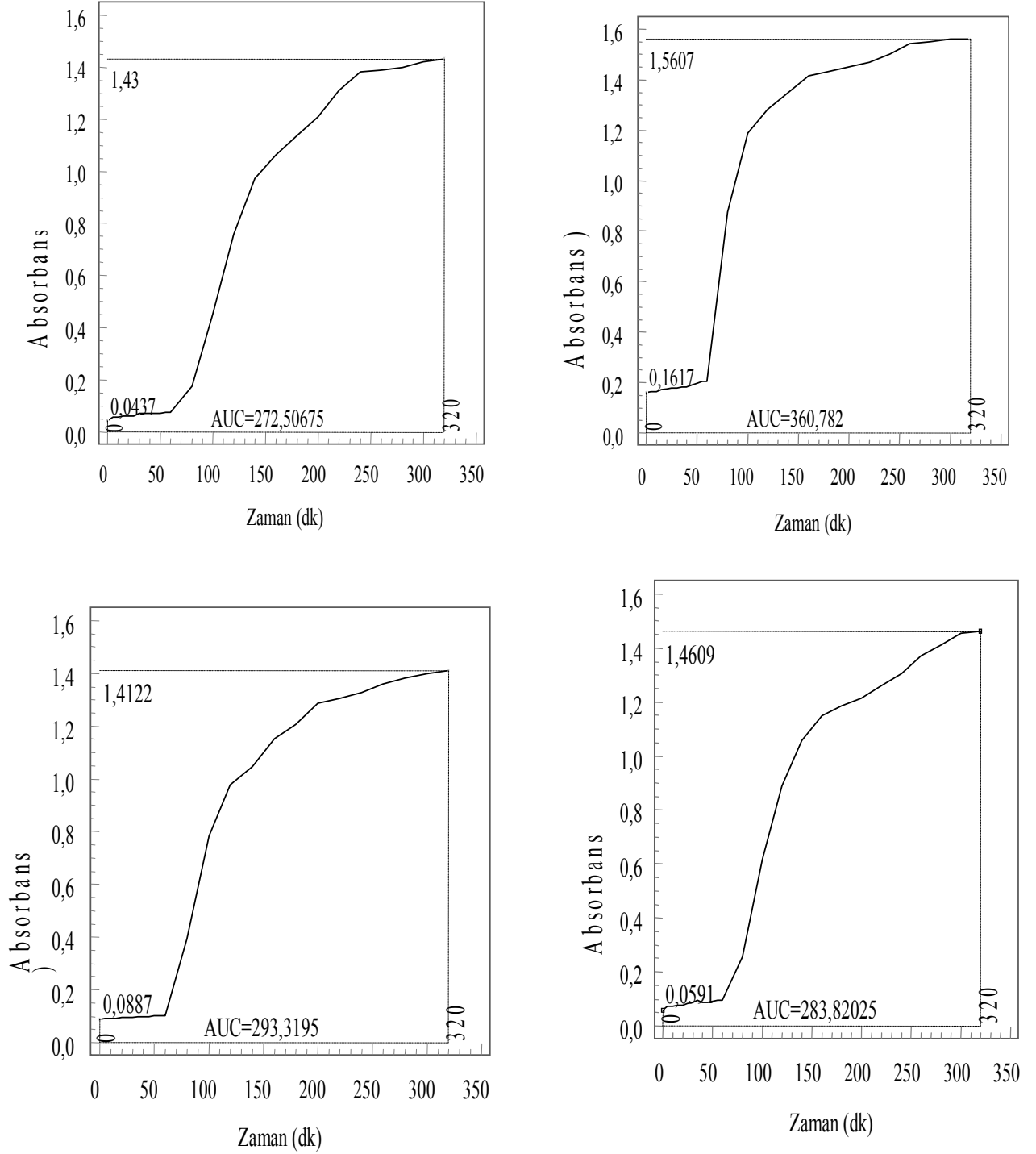
Tablo 9’da görüldüğü gibi BB (PON1<sub>192</sub>R) fenotipi en yüksek aktiviteye sahip olmasına rağmen genel popülasyonda en az bulunan gruptur. AA (PON1<sub>192</sub>Q) fenotipi ise düşük aktiviteye sahip olmasına rağmen genel popülasyonda en çok bulunan fenotiptir. Fenotip gruplamaya göre paraoksonaz (a, b ve c için; p<0.001) ve ariesteraz (a, b ve c için; p<0.01) tüm gruplar arasında anlamlı bir fark varken diğer parametreler arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır.

### 4.3. Lipid oksidasyonuna göre bulgular

Yaptığımız bu çalışmada lipid oksitlenebilirliği yönünden kontrol ve hasta grupları arasında anlamlı derecede bir fark bulduk ( $p<0.01$ ). Aşağıdaki şekillerde 4 hasta ve 4 kontrol gruplarına ait lipid oksidasyon grafikleri verilmiştir.



**Şekil 17:** Kontrol grubundaki 4 bireye ait toplam oksitlenebilirlik düzeyi. Grafiklerde görüldüğü gibi eğri altı alanın ( AUC) düşük olması bize toplam oksitlenebilirlik düzeyi hakkında bilgi vermekte olup, lag fazın uzunluğu da ( $\geq 60$ ) dikkat çekmektedir.



**Şekil 18:** Hasta grubundaki 4 bireye ait toplam oksitlenebilirlik düzeyi. Grafiklerde görüldüğü gibi eğri altı alanın ( AUC) yüksek olması bize toplam oksitlenebilirlik düzeyi hakkında bilgi vermekte olup lag fazın kısıtlılığı ( $\leq 60$ ) dikkat çekmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Koroner arter hastalığı bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde ölüm nedenlerinin başında yer almaktadır. Son yıllarda KAH mortalitesinde düşme olmasına karşın, bu hastalıktan ölenlerin mutlak sayısında bir azalma olmamıştır. Doğu Avrupa ülkelerinde mortalite yükselme eğiliminde olup, Avrupa ülkelerinde düşme eğilimindedir. Düşük sosyo-ekonomik düzeydeki gruplarda morbidite ve mortalite daha yüksek olmaktadır. Bunda rol oynayan başlıca etkenler, kötü beslenme alışkanlıkları, sigara kullanımı ve şişmanlığın yanı sıra iş koşullarının daha ağır, sosyal desteğin daha az oluşu gibi etkenlerdir. (4). Bu nedenle erken dönemde tanı konması ve çeşitli risk faktörlerine karşı korunma yöntemlerinin geliştirilmesi önem kazanmıştır.

Türk Kardiyoloji Derneği tarafından 1990 yılından bu yana yürütülen çalışmaların on yıllık izlenim verilerine göre, Türkiye 'de yaklaşık iki milyon kişide koroner arter hastalığı bulunduğu tahmin edilmektedir. Koroner kalp hastalığının ülkemizde yıllık mortalitesi erkekler de binde 5.1 kadınlarda ise binde 3.3' tür. Ülkemizdeki ölümlerin %45' i kalp damar hastalıklarından, %36' sı kalp hastalıklarından, %32' si koroner kalp hastalığından kaynaklanmaktadır (4).

Bu çalışmada PON1 fenotipinin, önemli bir risk faktörü olup olamayacağı ve diğer önemli bir risk faktörü olarak düşünülen lipid oksitlenebilirlik kapasitesi (LDL oksidasyonu) ile birlikte ele alınmıştır. Bu amaçla çalışmaya alınan koroner anjiyografi yapılmış hastalarda serum total peroksit, lipid hidroperoksit, maksimum oksitlenebilirlik kapasite, toplam oksitlenebilirlik kapasite, lag faz'ın yanısıra PON1 enzim aktivitesi ve PON1 fenotipi de belirlenmiştir.

Bizim çalışmamıza alınan bireylerin kontrol grubunda olanların yaş ortalaması 52.09 (43-79) yıl, hasta grubunda olanların yaş ortalaması ise 57.87 (45-79) yıl olarak bulunmuştur. Bu rakamlardan da anlaşıldığı gibi, hasta grubunda bulunan bireylerin yaş ortalaması daha yüksektir. Ancak bu parametrenin diğer biyokimyasal parametrelerin hiçbirisi ile herhangi bir korelasyonu olmadığı için bizim çalışmamızı etkileyen bir faktör olarak değerlendirilmemiştir. Kontrol ve hasta grupları cinsiyet yönünden incelendiği zaman istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile PON1'in LDL oksidasyonunu önlediği gösterilmiştir ve kardiyovasküler hastalıklar için koruyucu bir faktör olup olamayacağı tartışmaya açılmıştır. Enzimin iki farklı alleli olabileceği ve bu genetik polimorfizm nedeniyle



farklı kişilerde aktivitelerinin değişik olduğu ortaya konmuştur. Gln192 variantı "A tipi" ve Arg192 ise "B tipi" olarak adlandırılmıştır. Bu tiplerden hangisinin ateroskleroz veya KAH için daha koruyucu olduğu yolunda yapılan çalışmalarda ise çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bazılarında B allelin KAH için riski artırdığını (171), bazılarında ise allel ile risk arasında ilişki olmadığı öne sürülmüştür (172). Son yapılan bir çalışmada KAH sahip PON1<sub>192</sub>RR fenotipine sahip bireylerin diğer fenotiplere göre daha fazla MI ve Strok geçirdiğini ileri sürmektedir (173).

Bulgularımız koroner kalp hastalığı gelişiminde genetik faktörlerin rolünü ortaya koymaktadır. Fenotipik dağılımına bakıldığında; hastalarımızın %44'ü AA fenotipine sahip iken %39 AB ve %17 kadarı BB fenotipine sahiptir (Tablo 7). Kontrol grubunda ise %47'i AA fenotipi, %42'ü ise AB ve %11'de BB fenotipine sahipti. Yapılan ki-kare testi ile hastalardaki damar sayısı tıkanıklığı ile fenotipik dağılım arasında anlamlı fark yoktu ( $p>0.05$ ). Buda bize gösteriyorki; aterosklerotik kalp hastalığından korumada fenotipik dağılımın önemli olmadığı tespit edilmiştir. Ancak bizim bulgularımızdan farklı bulan çalışmalarda mevcuttur. Baum ve ark, yaptığı bir çalışma PON1<sub>192</sub>RR fenotipine sahip kişilerin daha çok kalp krizi ve beyin kanaması geçirdiğini ileri sürmüşler (173).Yapılan başka bir çalışmada PON1 aktivite fenotipinin vasküler hastalıklarda tanısal değerinin PON1<sub>192</sub> ve PON1<sub>55</sub> genotiplerinin saptanmasından daha fazla olduğu, sadece genotipleme yapılmasının PON1 ile KAH ilişkisini ortaya koymada yetersiz kalacağı belirtilmektedir (174).

Cascorbi ve ark, PON1 mutasyonlarının ve farklı fenotiplerin KAH için risk faktörü olmalarını araştırmış; sigara, diabet, hipertansiyon, hiperkolesterolemi risk faktörü olarak anlamlı bulunurken, PON1 polimorfizminin KAH için risk faktörü olmadığı sonucuna varmıştır (172). Bizim çalışmamızda da elde edilen verilere göre PON1 fenotipinin tek başına anlamlı bir risk faktörü olmadığını, ancak kişinin oksidasyona ya da ateroskleroza yatkınlığı açısından bilinmesi gerekli bir faktör olduğunu ortaya koymuştur.

R.Rontu ve ark, yaptığı bir çalışmada PON1<sub>55</sub>LL genotipine sahip KAH sahip bireylerin torasik aorta ve abdominal aortadan aldıkları aterosklerotik plakların alanı ve bu alanlardaki fibrotik lezyon ve yağlı çizgilenmenin PON1<sub>55</sub>MM genotipine sahip bireylere nazaran daha fazla olduğunu rapor etmiştir (175).

Paraoksonaz/arilesteraz'ın polimorfik dağılımı büyük değişkenlik göstermektedir. Karakaya ve ark. çalışması bizi destekler nitelikte olup trimodal dağılımı Türk populasyonunda göstermişlerdir. Türklerde R allel sıklığı doğu populasyonlarından düşük, Avrupa ırkına yakın değerler göstermektedir (116). Avrupa populasyonlarında bimodalite ve

%53 düşük aktivite izoformu izlenmekte, Avrupa'dan uzaklaştıkça bu oran azalmaktadır. Afrika ve Uzakdoğuda dağılım unimodaldır, bu ırklarda düşük aktiviteli genotip saptanmamıştır. Kafkas kökenli İngiliz ve Hintlilerde PON1 aktivite sıklık dağılımının düşük ve yüksek aktivite alellerdeki dağılımlarla kıyaslanabilir bimodalite gösterdiği bulunmuştur.

Sanghera ve ark. yaptığı çalışma Singapur'da iki farklı ırk olan Asya yerlileri ve Çinlileri karşılaştırmış, sadece Asya yerlilerinde PON1<sub>192R</sub> allel'in KAH ile ilişkisi nedeni ile R allelin sadece bazı populasyonlarda bağımsız risk faktörü olabileceğini ileri sürmüştür (83). Mackness ve ark. (176), İngiltere'de farklı iki bölgede PON1 polimorfizmi ile KAH risk ilişkisini araştırdığında PON1R allel sıklığı KAH ile ilişkili bulunmuştur. R alloenzim ile lipid peroksitlerin hidrolizi daha düşüktür, böylece LDL'nin oksidasyonunu geciktirmede daha az etkili olduğu ileri sürülmüştür.

Hippe ve ark, AMI'de ailesel predispozisyonun, diğer kardiyovasküler risk faktörlerinin AMI riski üzerine etkilerini düzenlemediğini belirtmekte, bununla birlikte aile öyküsü bulunan olguların hala risk taşıyan hedef grup olduğu fikrini savunmaktadır (177). James ve ark.'nın çalışması üç damar tutulumu olan olgularda PON1 aktivitesi ve konsantrasyonunun belirgin azaldığını, HDL ile PON1'deki azalmanın LDL hidroperoksitlerindeki artış ile beraber olduğunu izlemiştir (178).

Aslan ve ark. yaptığı bir çalışmada demir eksikliği olan hastalarda oksidatif stresin artarak PON1 enzim aktivitesini azalttığını bununla beraber LOOH seviyelerinin ise arttığını rapor etmiştir. Bu sonuçlara dayanarak demir eksikliği olan hastalarda Ox-LDL'nin artması ve buna bağlı olarak KAH riskinin normal topluma göre daha fazla olduğunu ileri sürmüştür (179). E-Thomas-Moya ve arkadaşlarının rat'larla yaptığı bir çalışmada %40 kadar kalori kısıtlamayla PON1 aktivitesinde çok ciddi bir düşme olduğunu ve bunun apo J ve apo A-1 ile güçlü bir korelasyon gösterdiğini özellikle bu sonuçların kadın farelerde daha iyi gözlemlendiğini bu nedenle PON1'in cinsiyetler arasında da önemli bir fark gösterdiğini rapor etmişlerdir (133).

T.M.van Himbergen ve ark, yaptığı bir çalışmada plazma okside linoleik yağ asitlerinin; PON1'in aktivitesinin önemli bir göstergesi olabileceğini ileri sürmüşler. Bu çalışmaya göre; plazmada milli molar düzeyde bulunan linoleik yağ asitlerinin binde bir oranında dahi yani mikro molar düzeyde oksidasyonu, PON1'in paraoksonaz aktivitesine yansiyabilmektedir. Çünkü plazmalarında okside linoleik yağ asidi biraz yükselmiş olan kişilerde paraoksonaz aktivitesini kontrol grubuna nazaran daha düşük bulmuşlar. Ancak fenotip arasında herhangi bir fark bulamamışlar (180).

Fuhrman ve ark, SDS-PAGE elektroforez ve Western blot ile yaptıkları bir çalışmada PON1 enziminin şilomikronlarda da olduğunu ve bunun HDL'den transfer edildiğini aynı zamanda bu şilomikronlardaki PON1 enziminin bakır ile indüklenmiş LDL oksidasyonunu azalttığını ileri sürmüştür (181).

Z.suchocka ve ark. yaptığı bir çalışmada insan serum paraoksonazın; PON3 diye adlandırdığı bir etkiye sahip olduğunu, paraokson'u hidroliz etkisi olmayıp çok az arilesteraz aktivitesine sahip olduğunu ve laktonasları ve özellikle statinleri (mevastatin, simvastatin, lovastatin, v.s) substrat olarak kullanıp, LDL'yi oksidasyondan korumada PON1'den daha güçlü olduğunu rapor etmişlerdir (108). Buna benzer X.Yang ve ark. yaptığı bir çalışmada PON1'in aynı zamanda HTLase aktivitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir (111). Buna benzer bir çalışmada M. Kerkeni ve ark, yaptığı bir çalışma olup bu çalışmaya göre; PON1 yalnızca paraoksonaz ve aril esteraz aktivitesine sahip olmayıp aynı zamanda koroner arter hastalığı için başka ve önemli bir risk faktörü olan homosisteinemi hastalarda homosisteinden oluşan homosistein tiolaktonu hidroliz ederek hücrelerdeki homosistein tiolaktonun neden olduğu protein modifikasyonundan hücreleri ve özellikle endotel hücrelerini koruduğunu rapor etmişler (182). Buda bize *in vivo* koşullarda PON1'in hala gerçek substratının bilinmediğini ortaya koymuştur.

PON1 allozimlerinin gerek kantitatif ve gerekse kalitatif olarak farklı olduklarının keşfi ile fenotipleme metodları geliştirilmiş ve bu fenotipleme bütün dünyada artık kabul edilebilir bir gerçek olmuştur. Ancak bunun tespitinde farklı yöntem ve metaryeler kullanılarak fenotipleme yapılmaktadır.

Paraoksonaz aktivitesi kontrol grubunda 258 U/L, arilesteraz aktivitesi 169.27 kU/L olarak bulduk. Paroksonaz ve arilesteraz aktiviteleri farklı araştırmacılar tarafından kontrol grubunda farklı farklı bulunmuştur. Mackness ve ark. (8) Paraoksonaz aktivitesini 119.4 U/L Ayub ve arkadaşları (171) 221.50 U/L, Schiavon ve arkadaşları 151 U/L, Karakaya ve ark.(116) 321.29 U/L olarak bulmuşlardır. Bulunan normal değerlerin farklı farklı oluşunun nedenleri; enzim aktivitesinin tayini için kullanılan metodun farklı olması, enzim aktivitesi hesaplanırken kullanılan ekstinksiyon katsayısının farklı olması, kontrol grubunun yaşlarının farklı olması, kontrol grubu seçimi için kullanılan kriterlerin farklı olması ve popülasyonların farklı olması gibi olabilir. Bizim çalışmamızdaki kontrol grubu ile hasta grubunun enzim aktiviteleri dikkate alındığında, hasta grubunun değerlerinin anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Ayub ve arkadaşları (171), myokard infarktüsünden sonra paraoksonaz aktivitesinin azaldığını bulmuşlardır. Bazı araştırmacılar, KAH da dahil olmak üzere ailesel hiperkolesterolemi ve insüline bağımlı diabetes mellitus gibi hastalıklarda

paraoksonaz/arilesteraz aktivitelerinin azaldığını göstermişlerdir. Balık gözü (Fish-eye) ve tangier hastalıklarında yapılan çalışmalarda, HDL konsantrasyonlarının ve buna bağlı olarak da paraoksonaz/arilesteraz aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, farelere aterosklerotik diyet verilerek oluşturulan aterosklerozda, paraoksonaz'ın hepatik sentezinin azalması sonucunda, paraoksonaz aktivitesinin azaldığı da gösterilmiştir. Bu araştırmacıların sonuçları, bizim sonuçlarımızla iyi bir uyum göstermektedir. Dolayısıyla paraoksonaz/arilesteraz aktivitelerinin hasta grubunda azalmasının bazı nedenlerini şu şekilde özetleyebiliriz.

1. PON1, HDL' ye bağlı bir enzimdir. HDL' nin hasta grubunda azaldığını bulduk. HDL azaldığı için, enzim miktarı dolayısıyla da enzim aktivitesi azalabilir.
2. HDL' nin lipid çevresi değişmiş olabilir. Böylece, HDL ve PON1' in etkileşimi bozulabilir ve bunun sonucunda PON1 aktivitesi azalmış olabilir.
3. PON1' in sentezi azalmış ve/veya katabolizması artmış olabilir.
4. Bu enzim lipid peroksitlerinin oluşumunu önlemektedir, bunu yaparken aktivitesi azalmış olabilir.
5. Okside olan fosfolipidler, enzimin karaciğerdeki sentez ve sekresyonunu inhibe etmiş olabilirler.

KAH olanlarda azalmış PON1 aktivitesinde olduğu gibi HDL konsantrasyonundada belirgin bir azalma saptanmıştır. Biz bu çalışmada PON1 aktivitesi ile HDL arasında korelasyon bulamadık. Bir grup araştırmacı da, PON1 aktivitesi ve HDL arasında zayıf bir korelasyon olduğunu göstermiştir (183). Bu araştırmacıların ve bizim sonuçlarımız iyi bir uyum içinde olup, PON1 aktivitesinin HDL konsantrasyonundan bağımsız bir şekilde azaldığını göstermektedir. Serum HDL düzeyinin KAH insidansı ile ters ilişkili olduğu ve orta yaş üzerinde KAH olgularında LDL'den daha fazla tanısal değere sahip olduğu bilinmektedir. Nguyen ve ark, yaptığı bir çalışmada HDL içindeki bazı fosfotidilkolin derivelerinin, oksitlenmiş zincirlerin yada açıl zincir taşıyan doymamış yağ asitlerin PON1 enzimin paraoksonaz aktivitesini azaltıp arilesteraz aktivitesini artırdıklarını ileri sürmektedir (154). 1990' larda arteriyel duvarda LDL'nin oksidatif modifikasyondan korunması ve Ox-LDL'nin zararlı etkilerine karşı koruma gibi farklı antiaterojenik özelliklere sahip olduğu izlenmiştir (107). İlk olarak demirle indüklenen oksidasyona karşı HDL'nin koruyucu etkisinin gösterilmesinden sonra, normolipidemik donörlerden elde edilen total HDL'nin makrofajlarca Ox-LDL yıkımını azalttığı gösterilmiştir. HDL'nin bakırla indüklenen LDL'de lipid peroksit oluşumunu %90 inhibe ettiği ve HDL'den saflaştırılan PON1 enziminin ise lipid peroksitler yanısıra TBARS oluşumunu da önlediği saptanmıştır (184). Heterozigot familial

hiperkolesterolemi ve IDDM'li olgular yanı sıra, Fish eye ve tangier hastalığı olgularında çok düşük, saptanamayacak düzeyde PON1 aktivitesi ile karşılaşılmışından sonra bu hastalıklarda ateroskleroz gelişimine yatkınlıkta artış izlenmesi, PON1 ile aterosklerozun ilişkisine ve olasılıkla HDL'nin antiaterojenik özelliklerinde PON1'in önemine dikkatleri çekmiştir. Bu çalışma da koroner anjiyografisi patolojik olan hasta grubunda PON1 aktiviteleri belirgin olarak düşük bulunmuştur. Aviram ve ark.'nın gösterdiği gibi PON1, lipid peroksidlerini yok etmede stokiyometrik olarak çalışmakta ve lipid peroksidleri azalırken PON1 aktivitesi de düşmektedir (147). PON1 aktivitelerinde izlenen azalma LDL oksidasyonunda artış ile birlikte. Bu sonuçlar artan oksidan stresi önlemek için PON1 enziminin peroksidatif etki gösterdiğini ve buna bağlı olarak normalden daha düşük olduğunu düşündürmektedir.

Koroner arter hastalığının oksidan stres artışı ve antioksidan enzim aktivitelerindeki bozulma ile birlikte olduğunu biliyoruz bu nedenledirki; aterosklerotik dokuda erken dönemde serbest oksijen radikallerinin arttığı bilinmektedir. Normal metabolik yolların işleyişlerinin doğal bir sonucu olarak ortaya çıkan serbest radikal molekülleri, belirli düzeyde kaldıkları sürece organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyöz ajanlara karşı savunma sistemini oluşturmaktadır. Belirli düzeyin üstünde oluşan serbest radikaller, antioksidanların yetersiz olması durumunda organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit ve enzimlerin yapı ve fonksiyonlarını bozmaktadırlar. Hücrenin korunma mekanizmaları, serbest radikal oluşumunu engelleyerek, oksidan maddeleri daha az toksik ürünlere çevirerek, reaktif parçaları yaşamsal önemi olan yapılardan uzaklaştırarak ve moleküler hasarı tamir ederek etkili olmaktadır (185).

Oksidatif stres altında oluşan bu radikaller aynı zamanda LDL'de lipid peroksidasyonunu başlatmaktadır (24,30,73). Doymamış yağ asidi zincirleri sitoplazmik yapının ve biyolojik membranların temel elemanıdır; oksijen veya bir radikal varlığında oksidasyona uğrayarak hücrenel hasara neden olan, metabolizmayı değiştiren ve dokularda kan akımı değişikliklerine neden olan ürünler oluşturmaktadırlar. Çifte bağlar yeniden düzenlenime uğrayarak konjuge dien yapısına dönüşmekte ve daha sonra peroksidasyon devam ederek lipid endoperoksitleri ve/veya lipid hidroperoksitlerinin oluşumuna yol açmaktadır. Lipid endoperoksitlerinin ileri yıkılımı ile oluşan MDA, 4-HNE gibi aldehitler, keton ve oksisterol türevleri gibi ürünler oksidan stresin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Aterosklerotik koroner arter hastalığında arteriyel dokunun subendotelial bölgesinde makrofajlardan salınan aşırı süperoksit radikalleri yine bu bölgede tuzağa düşen LDL partiküllerini oksidatif modifikasyona uğratmaktadır. Bu bölgede artmış olan oksidan

stres organizmada normal fizyolojinin gereği olarak antioksidan savunma mekanizmasını harekete geçirmektedir.

Paraoksonazın lipid peroksitlerinin oluşumunu önlemek suretiyle LDL'nin oksidasyonunu geciktirmektedir. Mackness ve arkadaşları (11), PON1'in TBARS ve lipid peroksidasyonu oluşumunu önlediğini göstermişlerdir. Nitekim, bizim bulgularımıza göre lipid peroksidasyonunun göstergesi olan total peroksit ve lipid hidroperoksit düzeyleri de hasta grubunda artmıştır. Bu bulgular da lipid peroksidasyonunun oluştuğunu ve bunun sonucunda PON1 aktivitesinin azaldığını desteklemektedir. Yaptığımız korelasyon analizi sonucunda, hasta grubunda PON1 aktivitesi ile total peroksit ve lipid hidroperoksit düzeyleri arasında negatif korelasyon olduğu görüldü. Yani, hasta grubunda PON1 aktivitesi azalırken, total peroksit ve lipid hidroperoksit düzeylerinin artmış olduğu bulundu. Aynı zamanda bu korelasyon hastalıklı damar sayısıylada negatif yönde devam etmekteydi. Bu da bize, hasta grubunda lipid peroksidasyonunun arttığını göstermektedir.

Yapılan biyokimyasal çalışmalar, deneysel hayvan çalışmaları ve epidemiyolojik araştırmalar sonucu LDL'nin oksidatif modifikasyonu ateroskleroz patogeneğinde önemli bir faktör olarak belirlenmiş ve Ox-LDL oluşumunda lipid peroksidasyonunun rolü olduğu ortaya çıkmıştır. LDL oksidasyonu *in vitro* kültür hücreleri (endotel hücre, düz kas hücre, makrofaj) veya bakır gibi ağır metal iyonları ile inkübasyonla gerçekleştirilmektedir. Henüz *in vivo* fizyolojik mekanizmalar tam açık değildir. Oluşan lipid peroksidasyon ürünleri LDL'nin protein içeriği "apoB-100"de de kimyasal modifikasyona neden olmaktadır. Lizin birimlerinin maskelenmesi ile LDL'nin doğal reseptörüne bağlanma yeteneğinin bozulmasına ve yakalayıcı reseptörlere bağlanarak köpük hücre oluşumuna doğru ilerlemesine katkıda bulunur. Böylece LDL oksidasyonun hem lipid hem de protein içeriğinde modifikasyonla sonuçlanmaktadır (68,86). Watson (123) ve Navab (14) paraoksonazın LDL oksidasyonunu önleyerek inflamatuvar yanıtı bloke ettiğini göstermiştir. PON1, inflamatuvar genleri aktive ederek monositlerin endotele yapışmasını tetikleyen *in vivo* okside lipidleri temizleyerek vasküler hastalık riskini değiştirebilir. Deneysel verilere göre PON1, KAH riskini aterosklerotik lezyon ilerlemesinde gerekli proinflamatuvar molekülleri yıkarak azaltır. Çeşitli çalışmalar KAH'lı olguların plazmalarında lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığını göstermektedir. Bu çalışmamızda LDL fraksiyonunda yapılan analizler değerlendirildiğinde kontrol ve hasta lipid oksidasyon bulguları istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı idi

Düşük dansiteli lipoprotein oksidasyonunu ölçen çok sayıda direkt ve indirekt yöntemler vardır. Direkt ölçüm yöntemlerinden en uygun olanı, F2 isoprostanın idrar veya kanda ölçülmesidir. Genel olarak en çok kullanılan yöntem ise konjuge dien oluşumunun

ölçülmesidir. Biz bu çalışmamızda LDL seperasyonu yaparak  $\text{CuSO}_4$  ile oksitleyip lipid oksitlenebilirliği kapasitesini ve lag fazın uzunluğunu ölçtük (Şekil 17,18). Gecikme fazı ile tanımlanan LDL'nin oksidasyona yatkınlığının koroner ateroskleroz şiddeti ile ilişkili olduğu ve lipid oksidasyonunun prematür aterosklerozu tetiklediği, trigliserid içeriği yüksek LDL'li olan bireylerin daha yüksek KAH riski taşıdığını ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur (186). KAH olgularında gecikme fazının daha kısa olduğunu söyleyen çalışmalarda vardır. PON1 *in vivo* koşullarda Ox-LDL'deki lipidleri, özellikle kolesteril linoleat hidroperoksit ve hidroksitleri hidrolize ederek peroksidaz benzeri aktivite göstermektedir ve HDL'deki diğer enzimlere göre lipid peroksitleri hidroliz etmede daha güçlüdür. Böylece aterojenik okside lipoproteinlerin dolaşımdan karaciğere artmış hücrenel alımı ile uzaklaştırılması ve daha az aterojenik ürünlere dönüşmesinde etkindir.

İnsan koroner ve karotid aterosklerotik lezyonlarında, kolesteril linoleat hidroperoksit ve kolesteril linoleat hidroksitlerin, PON1 ile, linoleat hidroperoksit ve linoleat hidroksitlere hidrolize olduğu, böylece PON1'in esteraz ve peroksidaz benzeri aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Aterosklerotik lezyonda PON1'in bulunması, yoğun oksidatif stresin bulunduğu lezyon bölgesinde PON1'in alana girerek okside lipidleri aterosklerotik lezyondan uzaklaştırdığını düşündürmektedir.

Hasta grubu, damar sayısı kriterlerine göre (Tablo 5) gruplandırılarak, total peroksit, lipid hidroperoksit ve toplam oksitlenebilirlik düzeyleri darlık grubunda anlamlı yüksek bulunurken, PON1 aktiviteleri ve HDL düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Ancak lipid maksimum oksitlenebilirlik düzeylerinde herhangi bir fark bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ).

Bu verilere dayanarak, koroner arter hastalarında, *in vitro* koşullarda yapılan bir çok çalışma LDL'nin kontrol grubuna nazaran oksidasyona daha yatkın olduğunu bulmuş. Fakat yapılan bir çalışmada oksidasyona yatkınlığın bireyler arasında değişkenlik gösterdiğini ve bu da benzer kolesterol düzeyi olan olgularda farklı KAH insidansı nedenini açıklamaktadır (187). Bize göre lag fazının uzunluğu aynı zamanda LDL'nin antioksidan içeriğine bağlıdır. Daha öncede bahsettiğimiz gibi LDL yapısında bulunan temel antioksidanlar  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten ve askorbik asit gibi güçlü antioksidanlardır. Prooksidan yük ve antioksidanlar arasındaki denge arteriyel duvardaki LDL'nin oksidatif modifikasyonunun derecesini saptamaktadır (88). Bu da kişiden kişiye değişebilmektedir dolayısıyla biz bu çalışmada ortalama oksidasyon pik zamanı yönünden (Maksimum oksitlenebilirlik kapasite) hasta ve kontrol arasında herhangi bir fark bulamadık. Ancak eğri altı alanın tamamını (AUC) hesaplayıp toplam oksitlenebilirlik kapasitesine baktığımızda hasta ile kontrol arasında ileri

derecede anlamlı bir fark bulduk. Bu nedenle LDL oksidasyonuna yeni bir tanım getirerek 'Area Under Curve'(AUC) yani eğri altı alanın tamamının hesaplanması ve aynı zamanda lag fazın uzunluğuna bakılması gerektiğini saptadık. Çünkü gerek oksidasyon piki (maksimum oksitlenebilirlik kapasite) gerekse oksidasyon hızı kişiden kişiye, o anki beslenme durumuna çevresel koşullara varıncaya kadar bir çok nedene bağlı olarak değişebilmektedir. Oksidasyon piki yada oksidasyon hızı akut bir stresin göstergesi olabilir. Ancak KAH gibi kronik bir sürecin gösterilmesi için AUC'nin bakılması daha uygun görülmektedir. Bizim oksidasyon piki ve oksidasyon hızında gruplar arasında bir fark bulamayıp ama AUC'ler arasında ciddi bir fark bulmamız bunun en iyi göstergesi olduğuna inanıyoruz. Marchesi ve ark. yaptığı bir çalışma *in vivo* oksidasyon göstergeleri ile aterosklerotik lezyonun büyüklüğü arasında korelasyon bulunamamış, ancak intima-media kalınlığı ile LDL-MDA ve Ox-LDL'e karşı antikor titresi arasında korelasyon izlenmiştir (188). Buda bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Oksitlenmiş LDL yukarıda da bahsettiğimiz gibi reseptör yapısına varıncaya kadar içindeki yağ asitlerinin yapısı dahi değişmekte ve oksidasyona direnç kazanabilmektedir. Bu durum kişiden kişiye çevresel faktörler, ailesel faktörler ve çalışma koşullarına varıncaya kadar bir çok nedene bağlı olarak değişebilmektedir. Dolayısıyla kontrol ve hasta grupları arasında maksimum oksitlenebilirlik düzeyi (oksidasyon piki) arasında fark bulunamaması bizim için bir sürpriz değildir. Fakat hastaların kontrole göre lag fazının kısalığı ve toplam oksitlenebilirlik kapasitenin yüksek olması ve bu ilişkinin anlamlı bir fark meydana gelmesi bu çalışmanın en önemli özelliklerinden birini oluşturmaktadır.

Liu ve ark, yine KAH'lı olgulardan izole edilen LDL'nin oksidatif özelliklerini sağlıklı bireyler ile karşılaştırdığında okside kolesterol içeriğinin yüksek olduğunu ve hem LDL hem de VLDL'de MDA oluşumunun fazla olduğunu, bununla birlikte LDL'de izlenen lizin reaktivitesinin VLDL'de bulunmadığını göstermiştir; bu bulgular LDL'nin oksidasyon alanındaki lipid türünün önemini bir kez daha ortaya koymaktadır (67).

Çalışmamızın sonuçlarını şu şekilde özetleyebiliriz:

1-Hasta ve anjiografisi normal grupta paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi yönünden gruplar arasında ileri derecede anlamlı bir fark tespit edilmiştir.

2-Genetik polimorfizm gösteren PON1 enziminin farklı fenotiplerinin KAH' na karşı korunmada farklı etkinlikte olduğu belirtilmekte bir çok tartışmalı yayına ek olarak bu çalışmada da PON1 fenotipinin anlamlı bir risk faktörü olamayacağı saptanmıştır.

3-Hasta ve kontrol grupta total peroksit ve lipid hidroperoksit düzeylerinde artışın tıkalı dammar sayısı ile paralellik göstermesi, bu parametrelerin KAH'larının ciddi bir oksidatif



strese maruz kaldığını ve ateroskleroz için bir gösterge olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

4-Paraoksonaz/HDL oranının, kontrol grubunda hasta grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla HDL'nin konsantrasyonu başına düşen PON1 aktivitesinin önemli olduğu ortaya konmuştur.

5-Yapılan korelasyon analizleri sonucunda, PON1 aktivitesi ve HDL konsantrasyonu arasında korelasyon saptanamamıştır. Bu sonuca dayanarak, PON1 aktivitesinin ölçülmesinin, KAH'nın belirlenmesinde bağımsız bir risk faktörü olabileceğini söyleyebiliriz.

6-Düşük dansiteli lipoprotein oksidasyona yatkınlığı üzerine farklı PON1 fenotipleri araştırılmış ancak aralarında bir anlamlı fark bulunamamıştır. Yapılan bir çok çalışmaya rağmen oksidasyon piki ve oksidasyon hızının yerine lag fazının uzunluğu ve AUC'nin hesaplanmasının toplam oksitlenebilirlik yönünden daha uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Ekmekci A. Koroner arter hastalığında ve tedavisinde damar endotel fonksiyonları. **CIBA 1995**, İstanbul.
2. Onat A. Risk factors and cardiovascular disease in Turkey. *Atherosclerosis* 2001; 156:1-10
3. K lt rsoy H. Koroner kalp hastalığı primer ve sekonder korunma. ARGOS 2001; T.A.Ş İstanbul
4. Koylan N. Koroner arter hastalığı epidemiyolojisi lipid düşürücü tedavi ile ilgili büyük klinik alışmalar. *Türk Kardiyol Dern Arşv* 2000;13:9-20
5. Castelli W P, Wilson P W F, Deny D, Anderson K D. Cardiovascular risk factors in the elderly. *Am J Cardiol.* 1989; 63:12-19
6. Gordan T, Castelli W P, Hjortland M C. Lipoproteins cardiovascular diseases and death. The Framingam Studyo. *Arch Intem Mad.* 1981; 141: 1128
7. Mahley R W, Innearity T L, Rall S.C, Weisgraber K.H, Plasma lipoproteins, apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research.* 1984; 25: 1277-94
8. Mackness M I, Arrol S, Durrington P N, Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991; 286: 152-154,
9. Hernandez A F, Pla A, Valenzuela A., Gil F, Hougen H P, Villanueva E. Paraoxonase activity in human pericardial fluid its relationship to coronary artery disease. *Int J Leg Med.* 1993; 105: 321-324
10. Kelso G J, Stuart W D, Richter R J, Furlong C E, Jordan-Starck T C, Harmony J A. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry* 1994; 33:832-839
11. Mackness M I, Arrol S, Abbott C, Durrington P N. Protection of low density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993; 104:129-135
12. Mackness M I, Harty D, Bhatnagar D, Winocour P R, Flirol S, Ishola M, Durrington P. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991; 86:193-199
13. Eckerson H W, Wyte C M, La Du B N. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1983; 35:1126-1138

14. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten R I, Fonarow G C, Cardinez C J, Castellani L W, Brennan M L, Lusis A I, Fogelman A M, La Du B N. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest.* 1997; 99:2005-2019
15. Odowara M, Tachi Y, Yamashita K. PON1 polymorphism (Gln 192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin end Metb* 1997; 82:2257-2260
16. Heinecke I W, Lusis A J. Paraoxonase-gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis? *Am J Hum Genet* 1998; 62:20-24
17. Kao Y L, Donaghue K, Chan A, Knight J, Silink M. A variant of paraoxonase (PON1) gene is associated with diabetic retinopathy in IDDM. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2589-2592
18. Gan K N, Smolen A, Eckerson H W, La Du B N. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos.* 1991; 19:100-106
19. Costa L G, Mc Donald B E, Murphy S D, Omenn G S, Richter R J. Serum PON and its influence on Paraoxon. *Tox and Applied Pharmaeology* 1990; 103:66-76
20. Hegele R A, Connelly P W, Scherer S W, Hanley A J, Harris S R, Tsui L C, Zinman B. Paraoxonase 2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3373-3377
21. Libby P. The vascular biology of atherosclerosis In: Braunwald: heart disease: A textbook of cardiovascular medicine, Braunwald E 6<sup>th</sup> ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia. 2001, pp. 995-996
22. Liao J K. Endothelium and acute coronary syndromes. *Clin Chem.*1998; 82:1799-1808
23. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. In: Braunwald E. Heart Disease A Textbook of Cardiovasculer Medicine. 4<sup>th</sup> ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia 1992; 1106-1109
24. Gersh B J. Braunwald E, Bonow R O. Chronic coronary artery disease. In: Braunwald: heart disease: a textbook of cardiovascular medicine, Braunwald E 6th ed. Copyright W. B. Saunders Company. New York 2001; pp.1272-1273
25. Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 ; 340: 115–126
26. Rubanyi G.M. The role of the endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22:1-14

27. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature* 1993;362: 801-809
28. Hajjar D P, Haberland A E. Lipoprotein trafficking in vascular cells: molecular Trojan horses and cellular saboteurs. *J Biol Chem.* 1997; 272: 22975-22978
29. Castell J V, Gomez-Lechon M J, David M. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBBS Lett.* 1989; 242:237-239
30. Ross R., Fuster V, The pathogenesis of atherosclerosis. In: *Arteriosclerosis and coronary artery disease.* Fuster V, Ross R, Topol E, eds. Vol. 1. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia 1996; pp. 441-460
31. Smith E B, Keene G A, Grant A. Fate of fibrinogen in human arterial intima. *Atherosclerosis* 1990; 10:263-275
32. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer D E. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1386-1392
33. Falk E, Shah P K, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation.* 1995; 9:657-671
34. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen C-reactive protein albumin or leukocyte count with coronary heart disease. *J Am Med Assoc* 1998; 279:1477-1482
35. Koenig W. Fibrinogen and coronary risk. In: *Novel risk factors and the prevention of coronary heart disease.* Fuster V. ed. *Current Cardiology Reports*, Philadelphia. Current Science 1999; 1:112-118
36. Thigerson A M., Jansson J H., Boman K. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998; 98:2241-2247
37. Maede T W, Cooper J A, Starling Y. Factor VIII ABO blood group and the incidence of ischaemic heart disease. *Br J Haematol* 1994; 88: 601-606
38. Vigushin D M, Pepys M B, Hawkins P N. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest* 1993; 91:1351-1357
39. WHO expert Committee on Biological standardization. WHO technical. Report Series 760; Genova WHO 1987

40. Macy E M, Hayes T E, Tracy R P. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications. *Clin Chem* 1997; 43:52-58
41. Wilkins J, Gallimore J R, Moore E G, Pepys M B. Variability in the measurement of C-Reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications. *Clin Chem* 1997; 43:52-58
42. Kuller L H., Tracy R P, Shaten J, Meilahn E N: Relation of C-Reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. *Multiple Risk Factor Intervention. Trial. Am J Epidemiol* 1996; 144:537-547
43. Ridker P M., Cushman M., Stampfer M J, Traey R P, Hennekens C H: Inflammation aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336:973-979
44. Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer H G., Lowel H., Doring A, Hutchinson W L, Pepys M B. C-Reactive protein a sensitive marker of inflammation predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation.* 1999; 99:237-242
45. Ridker P M., Buring J E, Shih J, Matias M, Hennekens C H. Prospective study of C-Reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 1998; 98:731-733
46. Ridker P M., Glynn R J, Hennekens C.H: C-Reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation.* 1998; 97:2007-2011
47. Mendall M A, Patel P, Asante M, Ballam L, Morris J, Strachan D P, Camm A J, Northfield T C. Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart.* 1997; 3:273-277
48. Ridker P M, Rifai N, Stampfer M J, Hennekens C H. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000; 101:1767-1772
49. Hwang S J, Ballantyne C M., Sharrett A R., Smith L C, Davis C E, Gotto A M. J, Boerwinkle E: Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997; 96:4219-4225

50. Ridker P M, Hennekens C H, Roitman-Johnson B, Stampfer M J: Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule-1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998; 351:88-92
51. Nageh M F, Sandberg E T, Marotti K R, Lin A H, Melchior E P, Bullard D C, Beaudet A L. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 8:1517-1520
52. Gefken D, Cushman M, Burke G, Polak J, Sakkinen P, Tracy R. The association of physical activity and markers of inflammation in a healthy elderly population. *Am J Epidemiol* 2001; 153:242-250
53. De Maat M P., Pietersma A, Kofflard M. Association of plasma fibrinogen levels with coronary artery disease, smoking and inflammatory markers. *Atherosclerosis* 1996; 121:185-191
54. Ditschuneit H H., Flechtner-Mors M, Adler G. Fibrinogen in obesity before and after weight reduction. *Obes Res* 1995; 3:43-48
55. Rosenson R S, Tangney C C. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. *J Am Med Assoc* 1998; 279:1643-1650
56. Pitt B, Mancini G B, Ellis S G, Rosman H S, Park J S, McGovern M E. Pravastatin limitation of atherosclerosis in the coronary arteries (PLAC I):reduction in atherosclerosis progression and clinical events. PLAC I investigation. *J Am Coll Cardiol* 1995; 5:1133-1139
57. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol 'lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344:1383-1389
58. Richardson P D, Davies M J, Bom G V. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1989; 2:941-944
59. Welty F K, Mittleman M A, Wilson P W, Sutherland P A, Matheney T H, Lipinska I, Muller J E, Levy D, Tofler G H. Hypobetalipoproteinemia is associated with low levels of hemostatic risk factors in the Framingham offspring population. *Circulation* 1997; 95:825-830
60. Braunwald E. Cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns and opportunities. *N Engl J Med* 1997; 337:1360-1369
61. Basic Pathology 6. edisyon Ç.editörü: Uğur çevikbaş. 2000; Say no:285
62. Benditt E P. Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Proc. Natl. Acad Sci.USA* 1973; 70:1753

63. Montgomery R, Conway T, Spector A, Chappel D. Biyokimya: Olgu sunumlu yaklaşım. 6. Basım. 1996 Mosby-Year Book (çeviri: Altan N,1. Baskı 2000)
64. Grundy SM. Smail. LDL atherogenic dyslipidemia and metabolic syndrome. *Circulation* 1997; 95:1-4
65. Lamarche B, Tchernof A, Moorjan S, Cantin B Smail. low density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. *Circulation* 1997; 95: 69-75
66. Selwyn A P, Kinlay S, Libby P, Ganz P. Atherogenic lipids vascular dysfunction and clinical signs of ischaemic heart disease. *Circulation* 1997; 95:5-7
67. Liu K, Cuddy E, Pierce GN. Oxidative status of lipoproteins in coronary disease patients. *Am Heart J* 1992; 123:285-290
68. Jialal I, Devaraj S. Low density lipoprotein oxidation antioxidants and atherosclerosis. A clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996; 42:498-506
69. Witztum J L, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88:1785-1792
70. Maor I, Aviram M. Macrophage released proteoglycans are involved in cell-mediated aggregation of LDL. *Atherosclerosis* 1999; 142:57-66
71. Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; 95:1062-1071
72. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Rad Biol Med* 2000; 28:1815-1826
73. Xing X., Baffic J, Sparrow CP. LDL oxidation by activated monocytes. Characterization of the oxidized LDL and requirement for transition metal ions. *J Lipid Res* 1998; 39:2201-2208
74. Delattre J, Therand P, Vasson M P, Legrand A., Rousselot, DB. Deleterious vascular effects of oxidized LDL and their modulation by antioxidants. 20<sup>th</sup> Espen congress 1998; September 16-19
75. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272:20963-20966
76. Sevanian A, Asatryan L, Ziouzenkova O. Low density lipoprotein modification: Basic concepts and relationship to atherosclerosis. *Blood Purif* 1999; 17:66-78
77. Jialal I. Evolving lipoprotein risk factors: lipoprotein (a) and oxidized low-density lipoprotein. *Clin Chem* 1998; 44:1827-1832

78. Kaplan M., Aviram M. Oxidized low density lipoprotein: Atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 777-787
79. Salonen JT, Malin R, Tuomainen TP, Nyssönen K, Lakka TA., Lehtimäki T. Polymorphism in high density lipoprotein paraoxonase gene and risk of acute myocardial infarction in men: prospective nested case-control study. *BMJ* 1999; 319: 487-489
80. Febbraio M., Podrez EA., Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 2000; 105:1049-1056
81. Mackness B, Durrington, P N, Abuashia B, Boulton AJM, Mackness MI. Low paraoxonase activity in type II diabetes Mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci* 2000; 98:355-363
82. Sözmen B, Delen Y, Girgin FK, Sözmen EY, Catalase and paraoxonase in hypertensive Type II diabetes mellitus: correlation with glycaemic control. *Clin Biochem* 1999; 32:423-427
83. Sanghera D K, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1067-1073
84. Halliwell B. Oxidation of low density lipoproteins: questions of initiation propagation and the effect of antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:6705-6715
85. Winther MPJ, Hofker MH. Scavenging new insights into atherogenesis. *J Clin Invest* 2000; 105:1039-1044
86. Esterbauer H., Wag G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *British Med Bull* 1993; 49:566-576
87. Aviram M. Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1993; 109:89-94
88. Aviram M. Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis and the antiatherogenicity of antioxidants. *Euro J Clin Biochem* 1996; 34:599-608



89. Leonhardt W, Hanefeld M., Schaper, F. Diminished susceptibility to in vitro oxidation of low density lipoproteins in hypercholesterolemia: key role of  $\alpha$ -tocopherol. *Atherosclerosis* 1999; 144:103-107
90. Nielsen L B. Atherogenicity of lipoprotein (a) and oxidized low density lipoprotein: insight from in vivo studies of arterial wall influx degradation and efflux. *Atherosclerosis* 1999; 143:229-243
91. Steinerova, A., Racek, J., Stozicky, F., Tatzber, F., Lapin, A. Autoantibodies against oxidized LDL in the first phase of life. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37:913-917
92. Kontush A, Spranger T, Reich A, Baum K. Lipophilic antioxidants in blood plasma as markers of atherosclerosis: the role of  $\alpha$ -carotene/ $\gamma$ -tocopherol. *Atherosclerosis* 1999; 144:117-122
93. Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999; 144: 285-301
94. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H., Wada Y, Kohno K, Imazumi, T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 1997; 95:76-82
95. Chen LY, Mehta P, Mehta JL. Oxidized LDL decreases L-arginin uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets: relevance of the effect of oxidized LDL on platelet function. *Circulation* 1996; 93:1740-1746
96. Sata M., Walsh K. Oxidized LDL activates Fas-mediated endothelial cell apoptosis. *Clin Invest* 1998; 102:1682-1689
97. Ishikawa K, Navab M, Leitinger N, Fogelman AM. Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J Clin Invest* 1997; 100:1209-1216
98. Van Reyk, DM, Jessup W, Dean RT. Prooxidant and antioxidant activities of macrophages in metal mediated LDL oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1119-1124
99. Zarev S, Bonnefont-Rousselot D, Jedidi I, Cosson C, Couturier M, Legrand A, Beaudeau J L, Theronda P. Extent of copper LDL oxidation depends on oxidation time and copper/LDL ratio: chemical characterization. *Arc of Bioch and Biophys* (2003)
100. Gersh B.J. Braunwald E, Bonow R.O. Chronic coronary artery disease, In: Braunwald heart disease: a textbook of cardiovascular medicine, Braunwald E, 6<sup>th</sup> ed. Copyright W. B. Saunders Company, New York 2001; pp.1272-1273

101. Aldridge W N. An enzyme hydrolyzing diethyl p-nitro phenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J* 1953; 53:117-124
102. Ooms A J, Boter H L. Sterospecificity of hydrolytic enzymes in their reaction with optically active organophosphorus compounds. The reaction of cholinesterases and paraoxonase with S-alkyl p-nitrophenyl methyl phosphono thiolates. *Biochem Pharmacol* 1965; 12:1839-1845
103. Geldmacher-von Mallinckrodt M., Petenyi M., Flugel M., Burgis H, Dietzel B, Metzner H., Nirschl H., Renner O. Genetically determined polymorphism of human serum paraoxonase (EC 3.1.1.2). *Humangenetik*. 1973; 17:331-335
104. Brophy V H., Jampsa RL, Clendenning J B., McKinstry L A, Jarvik G P, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase gene (PONI) expression. *Am J Hum Genet*. 2001; 68:1428-1436
105. Mackness MI, Hallam SD, Peard T, Warner S, Walker CH. The separation of sheep and human serum "A"-esterase activity into the lipoprotein fraction by ultracentrifugation. *Comp Biochem Physiol B*. 1985; 82:675-677
106. Szabo F, Rona K, Czinner A, Gachalyi B, Kaldor A: Is paraoxon hydrolytic activity in serum predictive of myocardial infarction? *Clin Chem* 1987; 33:742-743
107. Mackness MI, Walker CH.: Multiple forms of sheep serum A-esterase activity associated with the high-density lipoprotein. *Biochem J* 1988; 250:539-545
108. suchocka Z, swatowska J, pachecka J, suchocka P; RP-HPLC determination of Paraoxonase activity in human blood serum; *J of pharmaceutical and biomedical analysis* 2006; 42:113-119
109. Lipincott W. Paraoxonase a cardioprotective enzyme: continuing issues, *Curr Opin Lipidol* 2004; 15:261-267
110. Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, Suissa A, Aviram M; Paraoxonases 1, 2 and 3 are expressed in human and Mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2; *Free Radical biology* 2005; 39:336-344
111. Yang X, Gao Y, Zhou J, Zhen Y, Yang Y, Wang J, Song L, Liu Y, Xu H, Chen Z, Hui R; Plasma homocysteine thiolactone adducts associated with risk of coronary heart disease; *C Chimica acta* 2006; 364: 230-234
112. Gülcü F, Gürsu F; The standardization of paraoxonase and arylesterase Activity Measurements; *Turkish J Biochem* 2003; 28:45-49

113. Mackness M, Durrington P, Mackness B. Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15:399–404.
114. Aviram M, Davies J. A, Paraoxonase 1 and atherosclerosis: Is the gene or the protein more important? *Free Radical Biology* 2004; 37:1317-1323
115. La Du BN, Eckerson HW. The polymorphic paraoxonase/arylesterase isozymes of human serum. *Fed Proc* 1984; 43:2338-2341
116. Karakaya A., Suzen S., Sardas, S, Karakaya AE, Vural N. Analysis of the serum paraoxonase/arylesterase polymorphism in a Turkish population. *Pharmacogenetics* 1991; 1:58-61
117. Mallinckrodt M, Geldmacher V, Hommel G, Dumbach J. On the genetics of the human serum paraoxonase. *Hum Genet* 1979; 50:313-326
118. Kleemola P, Freese R, Jauhiainen M, Pahlman R, Altfhan G, Mutanen M; Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis* 2002; 160:425-432
119. Ombres D, Pannitteri G, Montali A, Candeloro A, Seccareccia F, Campagna F, Cantini R, Campa P P, Ricci G, Arca M. The Gln-Arg192 Polymorphism of Human Paraoxonase Gene Is Not Associated With Coronary Artery Disease in Italian Patients. *Atheroscler Throm Vasc Biol.* 1998; 18:1611-1616
120. Garin MCB, James RW, Dussoix P, Blanchè H, Passa P, Froguel P, Ruiz J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme: a possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 1997; 99:62–64.
121. Agachan B, Ergen H A, Karaali Z E, Isbir T, PON1 55 and 192 Polymorphism and Its Effects to Oxidant-Antioxidant System in Turkish Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Physiol Res* 2005; 54:287-293
122. Karakaya A, Ibis S, Kural T, Kose SK, Karakaya A.E, Serum paraoxonase activity and phenotype distribution in Turkish subjects with coronary heart disease and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Chem Biol Interact* 1999; 118:193-200
123. Watson AD, Berliner J A, Rama S Y, La Du B N, Faull K F, Fogelman AM, Navab M: Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96:2882-2891
124. Aviram M., Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Nelton R, Rosenblat M., Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. Paraoxonase active site required for protection against LDL

- oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 13: 1617-1624
125. Seres I, Paragy G, Deschene E, Fulop Jr T, Khalil A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Experimental gerontoloji* 2004; 39:59-66
  126. Fere N, Camps J, Fernandez-Balart J, Arija V, Murphy M.M, Ceruello S, Biarnes E, Vilella E, Tous M, Joven J. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic Nutritional and lifestyle factors in the general population. *Clin Chemistry* 2003; 49:1491-1497
  127. Ozols J. Isolation and complete covalent structure of liver microsomal paraoxonase. *Biochem J* 1999; 338:265-272
  128. Vlachos G D, Bartzeliotou A, Schulpis K H, Partsinevelos G A, Lazaropoulou C, Papadima C, Papastamataki M, Antsaklis A, Papassotiriou I. Maternal- neonatal serum paraoxonase-1 activity in relation to the mode of delivery. *Clin Biochemistry* 2006
  129. Costa L, Vitalone A, Cole T B, Furlong C E. Modulation paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology* 2004
  130. Jaouad L, Guise C.D, Berrougui H, Clouiter M, Isabellea M, Fulop T, Payette H, Khalil A. Age- Related decrease in HDL's antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups. *Atherosclerosis* 2006; 185:191-200
  131. La Du B N, Aviram M., Billecke S, Navab M., Primo-Parmo S., Sorenson RC, Standiford TJ, On the physiological roles of the paraoxonases. *Chem Biol Interact.* 1999; 120:379-388
  132. Rosenblat M, Karry R, Aviram M. PON1 is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: Relavance to diabetes. *Atherosclerosis* 2006; 187:174-79
  133. Thomas-Moya E, Gianotti M, Liadino I, Proenza A.M Effects of caloric restriction and gender on rat Paraoxonase 1 activity. *J N Biocchemistry* 2006; 17:197-203
  134. Yeung D T, Josse D, Nicholson J D, Khanal A, McAndrew C W, Bahnson B J, Lenz D E, Cerasoli D.M. Structure/function analyses of serum paraoxonase mutants designed from a DFPase-like homolog model. *Biochimica and biophysica Acta.* 2004; 1702:67-71
  135. James R W, Deakin S P. The importance of HDLs for paraoxonase-1 secretion stability and activity. *Free radical biology* 2004; 37:1986-1994

136. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du B N. 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* 1993; 52:598-608
137. Hassett C, Richter R J, Humbert R, Chapline C, Crabb L W., Omiecinski C L, Furlong CE. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry* 1991; 30:10141-10149
138. Furlong CE, Richter RJ, Chapline C, Crabb J W. Purification of rabbit and human serum paraoxonase. *Biochemistry* 1991; 30:10133-10140
139. Furlong C E, Li W F, Brophy VH, Jarvik G P, Richter R J, Shih D M, Lusic A L, Costa L G: The PON1 gene and detoxication. *Neurotoxicology* 2000; 21:581-587
140. Furlong CE, Richter RJ., Seidel S L, Motulsky AG. Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon. *Am J Hum Genet* 1998; 43:230-238
141. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffmann A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonase (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 2000; 101:2510–2517
142. Akgür S A, Öztürk P, Solak I, Moral A R, Ege B. Human serum paraoxonase activity in acute organophosphorus insecticide poisoning. *Forensic science international*.2003; 133:136-140
143. Sözmen E Y, Mackness B, Sözmen B, Durrington P, Girgin F.K, Aslan L, Mackness M. Effect of organophosphate intoxication on human serum paraoxonase. *Human and Experimental toxicology* 2002; 21:247-252
144. Furlong CE.: PON1 status and neurologic symptom complexes in. Gulf War veterans. *Genome Res* 2000; 10:153-155
145. Benning M M., Hong S B, Raushel F M., Holden H M. The binding of substrate analogs to phosphotriesterase. *J Biol Chem* 2000; 275:30556-30560
146. Leviev L, Righetti A, James RW. Paraoxonase promoter polymorphism T(107) C and relative paraoxonase deficiency as determinants of risk of coronary artery disease. *J Mol Med* 2001; 79:457-463
147. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo S L, La Du B N. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101:1581-1590

148. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995; 96:3005-3008
149. Zama T, Murata M, Matsubara Y, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, Watanabe G, Ishikawa K, Ikeda YA. 192Arg variant of the human paraoxonase (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3565-3569
150. Zech R, Rockseisen M., Kluge K, Dewald K, Armstrong V W, Chemnitz I M. Lipoproteins and hydrolysis of organophosphorus compounds. *Chem Biol Interact* 1993; 87:85-94
151. Li H, Reddick R L, Maeda N. Lack of apoA-I is not associated with increased susceptibility to atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:1814-1821
152. Plump AS, Azrolan N, Odaka H, Wu L, Jiang X, Tall A, Eisenberg S, Breslow J L. Apo A-1 knockout mice: characterization of HDL metabolism in homozygotes and identification of a post-RNA mechanism of apo A-I upregulation in heterozygotes. *J Lipid Res* 1997; 38:1033-1047
153. Rozenberg O, Rosenblat M, Coleman R, Shih D.M, Aviram M. Free radical biology 2003; 34:774-784
154. Nguyen S D, Sok D E. Preferable stimulation of PON1 arylesterase activity by phosphatidylcholines with unsaturated acyl chains or oxidised acyl chains at sn-2 position. *Biochimica et Biophysica acta* 2006; 1758:499-508
155. James R, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Fuegel P, Gavin MCB. Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000; 29:390-39
156. Paragh G, Balla P, Katona E, Seres I, Egerhazi A, Degrell I, Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2002; 252:63-67
157. Ferre N, Marsilach J, Camps J, Rull A, Coll B, Tous M, Joven J. Genetic association of paraoxonase-1 polymorphisms and chronic hepatitis C virus infection. *Clinica chimica acta*. 2005; 18:112-118
158. Min J, Park H, Park B, Kim YJ, Park J, Lee H, Ha E, Park E A, Hong Y C. Paraoxonase gene polymorphism and vitamin levels during pregnancy: relationship with maternal oxidative stress and neonatal birthweights. *Reproductive toxicology* 2006; 147:363-367

159. Clarimon J, Eerola J, Hellstrom O, Tienari PJ, Singleton A, Paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and Parkinson's disease in a Finnish population.. *Neurosci Lett* 2004; 367:168-170
160. Paşca S.P, Nemeş B, Vlase L, Gaygi C.E, Dronca E, Miu A.C, Dronca M,. High levels of homocysteine and low serum paraoxonase 1 arylesterase activity in children with autism. *Life sciences* 2006; 78:2244-2248
161. Raiszadeh F, Solati M, Etemadi A, Azizi F. Serum paraoxonase activity before and after treatment of thyrotoxicosis. *Clin Endocr* 2004; 60:75–80
162. Delgado Alves J, Ames PR, Donohue S, Stanyer L, Nourooz-Zadeh J, Ravirajan C, Isenberg DA, Noorouz-Zadeh J. Antibodies to highdensity lipoprotein and  $\beta$ -2 glycoprotein-I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2003; 48:284
163. Mackness MI, Mackness B, Arrol S, Wood G, Bhatnagar D, Durrington PN. Presence of paraoxonase in human interstitial fluid. *FEBS Letters* 1997; 416:377-380.
164. Griffith MK, Virella GT, Stevenson HC, Lopes-Virella MF. Low density lipoprotein metabolism by human macrophages activated with low density lipoprotein immune complexes. A possible mechanism of foam cell formation. *J Exp Med* 1988; 168:1041-1059
165. Szafran Z, Nowak J, Szafran H, Janik A. Esterolytic activity of blood serum in infants with hypertrophic pyloric stenosis. *J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 17:321-324
166. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Staffonini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes proinflammatory during the acute phase response. *J Clin Invest* 1995; 96:2758-2767
167. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91:2488–2496
168. Marchesani M, Hakkarainen A, Tuomainen T P, Kaikkonen J, Pukkala E, Uimari P, Seppalo E, Matikainen M, Kallioniemi O P, Schleutker J, Lehtimaki T, Salonen J T. New paraoxonase 1 polymorphism I102V and the risk of prostate cancer in Finnish Men *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:812-818
169. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38:1103-1111
170. Arab K, Steghens J.P. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. *Analytical Biochemistry* 2004; 325:158–163

171. Ayub A., Mackness M.I, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:330-335
172. Cascorbi L, Laule M, Mrozikiewicz PM, Andel C, Boumann G, Roots L, Stangl K. Mutations in the human paraoxonase 1 gene frequencies, allele linkages and association with coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 755-761
173. Baum L, Ng H K, Woo K S, Tomlinson B, Rainer T H, Chen X, Cheung W S, Chan D K Y, Thomas G Y, Tong C S W, Wong K S Paraoxonase 1 gene Q192 R polymorphism affects stroke and myocardial infarction risk. *Clin Biochem* 2006; 39:191-195
174. Jarvik GP, Rozek LS, Braphy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, Furlong CE. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2441-2447
175. Rontu R, Karhunen P J, Iveskoski E, Mikkelsen J, Kajjander O, Perolla M, Penttila A, Koivisto A L, Lehtimaki T. Smoking-dependent association between paraoxonase 1 M/L 55 genotype and coronary atherosclerosis in males: an autopsy study. *Atherosclerosis* 2003; 171:31-37
176. Mackness B, Mackness MI, Durrington PN, Arrol S, Evans AE, Mc.Master D, Ferrieres J, Ruidavets JB, Williams NR., Howard AN. Paraoxonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. *Euro J Clin Invest* 2000; 30: 4-10
177. Hippe M, Vestbo J, Hein HO, Borch-Johnsen K, Jensen G, Sorensen TI, Familial predisposition and susceptibility to the effect of other risk factors for myocardial infarction. *J. Epidemiol Comm Health* 1999; 53:269-276
178. James RW, Leview I, Righetti A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2000; 101: 2252-2257
179. Aslan M, Kosecik M, Horoz M, Selek S, Celik H, Erel O. Assessment of paraoxonase and arylesterase activities in patients with iron deficiency anemia. *Atherosclerosis* 2006.
180. Himbergen T.M.V, Tits L.J.H.V, Hectors M.P.C, Graaf J.D, Roest M, Stalenhoef A.F.H. Paraoxonase 1 and linoleic acid oxidation in familial hypercholesterolemia. *Bio Biophys R Com* 2005; 333:787-793
181. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Paraoxonase 1 is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis* 2005; 180:55-61



182. Kerkeni M, Addad F, Chauffert M, Chuinad L, Miled A, Trivin F, Maroufi K. Hyperhomocysteinemia paraoxonase activity and risk of coronary artery disease. *Clin Biochem* 2006; 39:821-825
183. Adolphson I L, Albers J J. Comparison of two commercial nephelometric methods for apoprotein A-I and apoprotein B with standardized apoprotein A-I and B radioimmunoassays. *J Lipid Res* 1989; 30:597-606
184. Graham A, Hassall D G, Rafique S, Owen J S, Evidence for a paraoxonase independent inhibition of low-density lipoprotein oxidation by high-density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1997; 135:193 -204
185. Azarsız E. Koroner arter hastalığı olgularında LDL oksidasyonu ve risk faktörü olarak paraoksonaz fenotipinin değerlendirilmesi.2001 Uzmanlık tezi.
186. Regnström J, Nilsson J, Tornvali P, Landou C, Hamsten A, Susceptibility to low density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 1992,339:1183-1186
187. Halevy D, Thiery J, Nagel D, Amond S, Erdman E, Hofling B, Cremer P, Seidel D, Increased oxidation of LDL in patients with coronary artery disease is independent from dietary vitamins E and C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1432-1437
188. Marchesi E, Martignoni A, Salvini M, Catalano O, Maggi E, Negro C, Traversa B, Bellomo G, Carotid intima-media thickening and in vivo LDL oxidation in patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens* 1996; 10:577-582