

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNSAN SERUM PARAOKSONAZ ENZİMİ
(PON 1) 192 GLN-ARG GEN POLİMORFİZMİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEKLİSANS TEZİ

FUNDA AKÇAY

Balıkesir, Eylül, 2006

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNSAN SERUM PARAOKSONAZ ENZİMİ
(PON 1) 192 GLN-ARG GEN POLİMORFİZMİNİN
BELİRLENMESİ

YÜKSEKLİSANS TEZİ

FUNDA AKÇAY

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR

Prof. Dr. Oktay ARSLAN (İkinci danışman)

Sınav Tarihi: 01 Eylül 2006

Jüri Üyeleri: Doç.Dr.Feray KOÇKAR

Yard.Doç.Dr.Ekrem DÜNDAR

Yard.Doç.Dr.Turgut KILIÇ

Balıkesir, Eylül, 2006

ÖZET

İNSAN SERUM PARAOKSONAZ ENZİMİ (PON 1) 192 GLN-ARG GEN POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ

Funda AKÇAY

**Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

**(Yükseklisans Tezi /Tez Danışmanı: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR)
(İkinci Danışman: Prof. Dr. Oktay ARSLAN)
Balıkesir, 2006**

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Paraoksonaz (PON1), Ateroskleroz, LDL oksidasyonu, Kanser, Organofosfat, Polimorfizm, Koroner Kalp Hastalığı

Paraoksonaz (PON1, EC.3.1.8.1) insan serumunda HDL'ye bağlı olarak bulunan ve organofosfat ajanları (OP) ve sinir gazlarını hidroliz eden ve LDL'nin oksidasyonu ile lipit peroksitlerin oluşumuna karşı koruyucu etkisi olan önemli bir karaciğer enzimidir.

Paraoksonaz gen ailesi PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere bilinen üç üyeye sahiptir. Yapısal yönden büyük benzerlikler gösteren bu genlerden PON1 ortaya çıkarıldığı süreden beri yıllardır çalışılmaktadır.

PON1 geni Q/R 192 ve M/L 55 olmak üzere iki önemli polimorfizm göstermektedir. Bunlar içinde en yaygın polimorfizmi, Q/R 192 polimorfizm serum paraoksanaz aktivitesini değiştirmektedir ve farklı populasyonlar da üçlü fenotipik dağılımının oranlarının değiştiği gösterilmektedir (QQ, QR, RR). Bu polimorfizmde pek çok pato-fizyolojik koşullarda ilgisi gösterilmiştir. En son olarak da I/V 105 mutasyonunun Finlandiya populasyonunda prostat kanseri riskini arttırdığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada, Türk populasyonunda farklı kanser türlerine sahip 82 birey ile kontrol grubunu oluşturan 79 sağlıklı bireyin paraoksanaz enzim aktivitesi ölçülerek PON1 Q/R 192 polimorfizmin fenotipi belirlenmiş ve serumda HDL'ye bağlı bu enzimin lipit seviyeleri bakımından bir ilişkinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Bazal PON aktivitesi kanserli bireylerde istatistiki olarak bir azalma göstererek, kontrol bireylerde $0,02343 \pm 0,01616$ EU, kanser hastalarında $0,01353 \pm 0,00931$ EU olarak tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Populasyondaki fenotipik dağılım % 64.6 QQ, % 30.76 QR ve % 4.6 RR olarak belirlenirken, tümörlü hastaların PON fenotipi % 50 QQ, % 26.6 QR ve % 23.3 RR şeklinde bir dağılım göstermiştir. Bu fenotipler PCR-RFLP analizleri yapılarak tespit edilmiştir. Paraoksanaz aktivitesi ile belirlenen fenotip dağılımı ile ilgili bireylerin serumdaki lipit ve lipoprotein düzeyleri aynı zamanda karşılaştırılmıştır.

ABSTRACT

THE DETERMINATION OF GLN-ARG 192 GENE POLYMORPHISM OF HUMAN SERUM PARAOXONASE (PON1)

Funda AKCAY

Balikesir University , Institute of Science, Department of Biology

(Msc. Thesis / Supervisor: Doc. Dr. Feray KOÇKAR

(Cosupervisor: Prof. Dr. Oktay ARSLAN)

Balikesir, Turkey, 2006

KEY WORDS: Paraoxonase (PON1), Atherosclerosis, LDL oxidation, Cancer, Organophosphate, Polymorphism, Cardiovascular Disease

Paraoxonase (PON1, EC3.1.8.1) bound to HDL is an important liver enzyme responsible for prevention of lipid peroxides accumulation in low-density lipoprotein (LDL) and hydrolyses OP insecticides and nerve gases.

The paraoxonase gene family contains at least three members, including PON1, PON and PON3. Amongst structure all the related three members, PON1 has been well studied since it has been identified.

Paraoxonase gene shows two important polymorphism, Q/R 192 and M/L55. The most common polymorphism, Q/R 192, changes the PON activity and a triphasic phenotypic frequency distribution of PON1 activity was shown in the

human population (QQ, QR, RR). This polymorphism have been associated with the number of the patho-physiological conditions. More recently, it was reported that I/V 102 polymorphism was linked to an increased risk of prostate cancer in Finnish population.

In this study, the phenotype of PON Q/R 192 polymorphisms were determined from 82 subject from different cancer type and 79 subjects from healthy people by using serum paraoxonase activity. These phenotypes have been confirmed by PCR-RFLP analysis. Their possible relationships with serum lipid and lipoprotein levels were also investigated.

The basal PON activity from the Cancer patients ($0,01353 \pm 0,00931$ EU) significantly decreased compared to controls ($0,02343 \pm 0,01616$ EU) ($p < 0,001$). The phenotypic distribution was determined as % 64.6 QQ, % 30.76 QR and % 4.6 RR in healthy subjects while PON phenotype in tumoured patients shows % 50 QQ, % 26.6 QR and % 23.3 RR distribution. Moreover, the comparison of the phenotypic distribution determined by paraoxanase activity and serum lipids and lipoprotein levels were also carried out.

İÇİNDEKİLER	
	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SEMBOL LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖNSÖZ	
1. GİRİŞ	1
1.1. Paraoksonaz Enzimi	2
1.2. Adlandırılması	3
1.3. Paraoksonaz Gen Ailesi	4
1.3.1. PON1	5
1.3.1.1. PON1 Biyokimyasal Yapısı	5
1.3.1.2. PON1'in HDL'ye Bağlanması	7
1.3.1.3. PON1 Sentezlenmesi ve Salgılanması	8
1.3.2. PON2	9
1.3.3. PON3	10
1.4 PON1 Polimorfizmleri	11
1.5. PON1'in Fonksiyonel Önemi	16

1.5.1. Hidrolitik aktivite; Organofosfatlara karşı koruma	17
1.5.2. Lipopolisakkarid inaktivasyonu; Bakteriyel endotoksinlere karşı koruma	19
1.5.3. Oksidatif veya peroksidatif aktivite; LDL oksidasyonunun önlenmesi	20
1.5.3.1. Arterioskleroz nedir?	20
1.5.3.2. Ateroskleroz ve Paraoksonaz enzimi arasındaki ilişki nedir?	23
1.6. PON1 ve Çevresel Faktörler	26
1.7. Paraoksonaz enzimi ve diğer hastalıklarla ilişkisi	26
1.8. AMAÇ	28
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	
2.1. MATERYALLER	
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
2.1.2. Kullanılan Örnekler	29
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	29
2.1.4. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	30
2.2. YÖNTEMLER	
2.2.1. Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu	32
2.2.2. Kan serumunun ayrılması	32
2.2.3. Enzim Aktivite Tayini	33
2.2.4. Genotip Belirlenmesi	33
2.2.4.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu	33
2.2.4.2. PCR Amplifikasyonu (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	34
2.2.4.3. Etanol Presipitasyonu ile DNA'nın Yıkanması	35
2.2.4.4. Restriksiyon Endonükleaz İle Kesim (RFLP)	35
2.2.5. DNA'nın Analizi	36
2.2.5.1. Spektral Yöntem	36
2.2.5.2. Agaroz Jel Elektroforezi	36
2.2.6. Lipit parametrelerin belirlenmesi	37

2.2.7. İstatistiksel Analiz	37
3. BULGULAR	
3.1. Sağlıklı ve Tümörlü Bireylerde Paraoksonaz Enzim Aktivitesinin ve Fenotipinin Belirlenmesi	38
3.2. Kontrol ve Tümörlü Bireylerin Karşılaştırılması	39
3.2.1. Sağlıklı Bireylerde PON aktiviteleri ve lipit değerlerinin karşılaştırılması	39
3.2.2. Tümörlü Bireylerde PON aktiviteleri ve lipit değerlerinin karşılaştırılması	44
3.3. Kontrol ve Tümörlü Bireylerin Karşılaştırmalı Analizi	54
3.4. Sağlıklı ve Tümörlü Bireylerde Fenotip Belirlenmesi	58
3.4.1. PCR-RFLP Stratejisi	58
3.4.2. Genomik DNA İzolasyonu	59
3.4.3. Polimeraz Zincir reaksiyonu (PCR)	59
3.4.3.1 PCR optimizasyonu	61
3.4.3.1.1. DNA konsantrasyon optimizasyonu	61
3.4.3.1.2. MgCl ₂ optimizasyonu	61
3.4.4. Restriksiyon Endonükleaz İle Kesim (RFLP)	62
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	64

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Anlamı
PON	Paraoksonaz enzimi
KAH	Koroner Kalp Hastalığı
OP	Organofosfat ajanları
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
AChE	Asetilkolinesteraz
DFPase	Diisopropilfluorofosfataz
LPS	Lipopolisakkarit
MI	Miyokard Infarktüsü
E.C.	Enzim kodu
U	Enzim ünitesi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
UV	Ultra-viole
TBE	Tris Borat EDTA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon Endonükleaz
dNTP	Deoksiribo-nükleik asit
OD	Optik Densite
CHOL	Kolesterol
TG	Trigliserit

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Paraoksonun kimyasal yapısı (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat)	3
Şekil 1.2	Paraoksonaz Enzim Mekanizması	4
Şekil 1.3	PON1'in üç boyutlu yapısı	6
Şekil 1.4	PON1'in HDL'ye bağlanması	8
Şekil 1.5	PON1 enzimi gen polimorfizmleri	13
Şekil 1.6	PON1 enzimi promoter bölgesi polimorfizmleri	15
Şekil 1.7	OP bileşiği genel formülü	17
Şekil 1.8	Sinir gazlarının hidrolizi	18
Şekil 1.9	Organofosforus İnsektisitlerin detoksifikasyonu	18
Şekil 1.10	Aromatik esterlerin hidrolizi	19
Şekil 1.11	Ateroskleroz	22
Şekil 3.1	Kontrol grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve kolesterol değerinin karşılaştırılmalı grafiği	43
Şekil 3.2	Kontrol grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve tuzla uyarılmış paraoksonaz aktivitelerinin karşılaştırılmalı grafiği	43
Şekil 3.3	Kontrol grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve trigliserit değerinin karşılaştırılmalı grafiği	44
Şekil 3.4	Tümörlü grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve kolesterol değerinin karşılaştırılmalı grafiği	51
Şekil 3.5	Tümörlü grubunda paraoksonaz enzimi bazal PON aktivite ve trigliserit değerinin karşılaştırılmalı grafiği	51
Şekil 3.6	Tümörlü grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve tuzla uyarılmış paraoksonaz aktivitesinin karşılaştırılmalı grafiği	52
Şekil 3.7	Tümörlü grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve tuzla uyarılmış aktivitelerinin istatistiksel	52

	korelasyon grafiği	
Şekil 3.8	Tümörlü grubunda paraoksonaz enzimi bazal PON aktivite ve HDL değerinin karşılaştırılmalı grafiği	53
Şekil 3.9	Tümörlü grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve HDL değerinin istatistiksel korelasyon Grafiği	53
Şekil 3.10	Kontrol grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve tuzla uyarılmış PON aktivitelerinin karşılaştırılmalı grafiği	54
Şekil 3.11	Kontrol ve hasta gruplarda lipit değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği.	56
Şekil 3.12	Kontrol ve hasta gruplarda paraoksonaz aktivitelerinin karşılaştırılmalı grafiği	57
Şekil 3.13	PON1 192Q/R (A/B) fenotiplerinin kontrol ve hasta gruplarındaki dağılımları	57
Şekil 3.14	PCR-RFLP stratejisi	58
Şekil 3.15	İzole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü	59
Şekil 3.16	PCR amplifikasyonu yapılan DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü	60
Şekil 3.17	Farklı DNA konsantrasyonları kullanılarak yapılan PCR'ın agaroz jel elektroforez görüntüsü	61
Şekil 3.18	Farklı MgCl ₂ konsantrasyonları kullanılarak yapılan PCR'ın agaroz jel elektroforez görüntüsü	62
Şekil 3.19	RFLP yapılan DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü (QQ)	63
Şekil 3.20	RFLP yapılan DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü (QR)	63

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 1.1	Epidemiyolojik risk faktörleri	22
Çizelge 2.1	Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	29
Çizelge 2.2	Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	30
Çizelge 2.3	DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	31
Çizelge 2.4	PCR için Kullanılan Çözeltiler	31
Çizelge 2.5	Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	32
Çizelge 3.1	Sağlıklı ve tümörlü bireylerin cinsiyete göre yaş aralığı	39
Çizelge 3.2	Sağlıklı bireylerin serum paraoksonaz enzim aktivitesi, lipit parametreleri ve diğer bilgilerinin karşılaştırılması	41
Çizelge 3.3	Tümörlü bireylerin serum paraoksonaz enzim aktivitesi, lipit parametreleri ve diğer bilgilerinin karşılaştırılması	46
Çizelge 3.4	Kontrol ve hasta gruplarda ölçülen serum paraoksonaz enzim aktivitesi ve lipit parametrelerinin istatistiksel değerlendirilmesi	55
Çizelge 3.5	PON 192_Forward	60
Çizelge 3.6	PON 192_Reverse	60

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışmanın deneysel aşamaları, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji ve Kimya laboratuvarlarında yapılmış olup, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi **Doç. Dr. Feray KÖÇKAR** ve Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi ve dekanı **Prof. Dr. Oktay ARSLAN** danışmanlığında sonuçlanmıştır.

Tez çalışmamın planlama ve uygulaması sürecinde en kısıtlı zamanlarda bile yardımlarını esirgemeyen, bilgiye ve kaynaklara ulaşmamda teşvik edici, yol gösterici olan danışman hocalarım Doç. Dr. Feray KÖÇKAR ve Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a,

Çalışmada kullandığım kanların temininde yardımcı olan Balıkesir Güven Laboratuvarına, Bursa Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesine ve sevgili arkadaşım Derya Sucu'ya,

Maddi ve manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan dostlarım Zafer BAL, Meltem AYDIN ve Turan BAYRAM'a

Hayattaki amacım doğrultusunda kayıtsız şartsız desteği ile beni yönlendiren, güçlendiren, en imkansıza ulaşmayı hedeflediğimde bile başaracağıma inanan ve ulaştığım başarıyı büyük bir heyecanla kutlayan, beni taçlandıran teyzem Fahriye BAŞ'a,

Bu çalışmanın ortaya çıkmasının birinci nedeni annem ve babama,

Teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Koroner Kalp Hastalığı (KAH), her yıl milyonlarca kişinin yaşamını kaybetmesine neden olmakta ve Dünyada ve Türkiye’de morbidite ve mortalite nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Arteriosklerotik hastalıklar, ciddi bir sorun olup kişinin yaşam süresi ve yaşam kalitesi ile ilgilidir. Toplumdaki her 5 kişiden birisi en az bir çeşit arteriosklerotik bir hastalığa yakalanmakta ve toplumdaki her altı kişiden biri 60 yaşından önce arteriosklerotik bir hastalıktan ölmektedir [1].

Paraoksonaz insan serumunda ilk olarak 1961’de Uriel tarafından elektroforezden sonra HDL immunopresipitatlarında saptanmıştır [2]. PON1 organik fosforlu bir insektisit olan parationun aktif metaboliti olan paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip A-esterazlar grubundan bir enzimdir. Paraoksonaz, HDL’ye bağlı olarak bulunan, organofosfat ajanları (OP) ve sinir gazlarını hidroliz eden, LDL’nin oksidasyonu ile lipit peroksitlerin oluşumuna ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu etkisi olan önemli bir karaciğer enzimidir. LDL’nin oksidasyonu arterioskleroz sürecinin başlangıç evresini oluşturması, enzimin antioksidant özelliğinin önemini ortaya koymaktadır [3, 4]. Arteriosklerotik hastalıklara karşı vücuttaki savunma mekanizmalarından biri de paraoksonaz (PON1) enzimidir.

Paraoksonaz gen ailesi, insanlarda kromozom 7’nin uzun kolunda bulunur. PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere bilinen üç üyeye sahiptir. Yapısal yönden büyük benzerlikler gösteren bu genlerden PON1 ortaya çıkarıldığı süreden beri yıllardır çalışılmaktadır. PON1, fizyolojik substratları ortaya çıkarılması ve arteriosklerozis ile ilişkisi ortaya konulması nedeniyle PON2 ve PON3’e göre nispeten daha iyi aydınlatılan genidir [5]. PON1 geni, Q/R 192 ve M/L 55 olmak üzere iki önemli polimorfizm göstermektedir. Bunlar içinde en yaygın Q/R 192 polimorfizmidir. PON1 enzim aktivitesindeki polimorfizm substrat bağımlıdır ve

farklı etnik kökenli populasyonlara göre değişkenlik gösterir [2]. Bu polimorfizmin pek çok pato-fizyolojik koşullarda ilgisi gösterilmiştir. En son olarak da I/V 105 mutasyonunun Finlandiya populasyonunda prostat kanseri riskini arttırdığı bildirilmiştir [6].

1.1 Paraoksonaz Enzimi (PON) (EC. 3.1.8.1)

Paraoksonaz, Aldridge sınıflama sistemine göre A grubu arildialkilfosfataz sınıfı ester hidrolaz enzimidir. Önceleri organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeni ile toksikoloji alanında çalışılmış, son yıllarda ise antioksidan etkileri nedeni ile KKH riskinden korunulabileceği düşünülerek güncellik kazanmıştır [2].

Paraoksonaz, ilk olarak 1953 yılında Aldridge W.N. tarafından p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütirat'ı hidroliz eden A-esteraz olarak teşhis edilmiştir. İnsan serumunda ilk kez 1961'de Uriel tarafından elektroforez sonrası HDL immunopresipitatlarında saptanmıştır [7]. Mackness ve ark, ilk olarak HDL-ayırımı için santrifüj yöntemini geliştirdikten sonra, koyunlarda paraoksonaz aktivitesinin çoğunlukla apo AI içeren partiküllerde HDL ile birlikte bulunduğunu ve insan serumunun ultra santrifüjlenmesi ile enzimin kanda HDL yapısında taşındığını ortaya koymuşlardır [8]. Saflaştırılmış sığır serum paraoksonazının lipidlerle ilişkili ve HDL ile aynı moleküler kütleyle sahip olduğunu göstermişlerdir. Saflaştırma sırasında apo A-I'in paraoksonazdan ayırımının zor olması, ikisinin sıkı ilişkili olduğunu düşündürmüş ve HDL kolesterol tayini sırasında lipoprotein fraksiyonunda aril-esteraz aktivitesine rastlamışlardır [7]. Enzim, paraokson, metil paraokson ve klormetil paraoksone yüksek derecede seçicilik gösterdiği için, paraoksonaz olarak adlandırılmıştır. Mackness ve ark., PON'un HDL üzerinde apo A-I'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini ve 1991 yılında LDL üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır [8]. Aynı zamanda Macness ve ark, farklı populasyonlarda (Fransız, Sudanlı vs) polimorfizm analizleri yapılarak, allellik formları belirlenmiş ve populasyon çalışmaları enzim aktivitesiyle HDL, apo A-I, apo AII arasında istatistiksel ilişki gösterilmiştir [8]. Immunoafinite kromatografi çalışmaları insan serum paraoksonazının gerçekte apolipoprotein AI ve

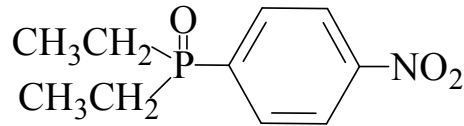
klusterin (apolipoprotein J) içeren HDL tipleri ile ilişkili olduğunu ve PON'un total HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu göstermiştir [2, 8].

Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, farklı kardiyovasküler hastalıklarda enzim aktiviteleri incelenmiş, lipoproteinlerle ve lipid peroksidasyon arasındaki ilişkisi araştırılmış, enzimin aminoasit dizisi belirlenmiştir [9].

1.2. Adlandırılması

Biyokimya ve Moleküler Biyolojinin Uluslararası Nomenklatur Komitesi'nin (IUBMB) enzim isimlendirmesinde paraoksanaz iki numaraya (EC 3.1.1.2 ve EC 3.1.8.1.) sahiptir. 1990'lı yıllardan sonra, paraoksanazın arilesterazdan farklı olarak yalnız fenolik esterleri değil, fosforik ve fosfinik asit esterlerini de hidroliz ettiği anlaşılmış ve EC 3.1.8.1 ile tanımlanmıştır [9].

Paraoksanaz enziminin, A grubu Arildialkilfosfataz sınıfı bir ester hidrolaz enzimi olması nedeniyle sistematik adı arildialkilfosfatazdır. A esteraz grubunda yer alan paraoksanaz enzimi, aktivitesinin ölçümünde ilk olarak paraokson substratı kullanıldığı için paraoksanaz adını almıştır [10].

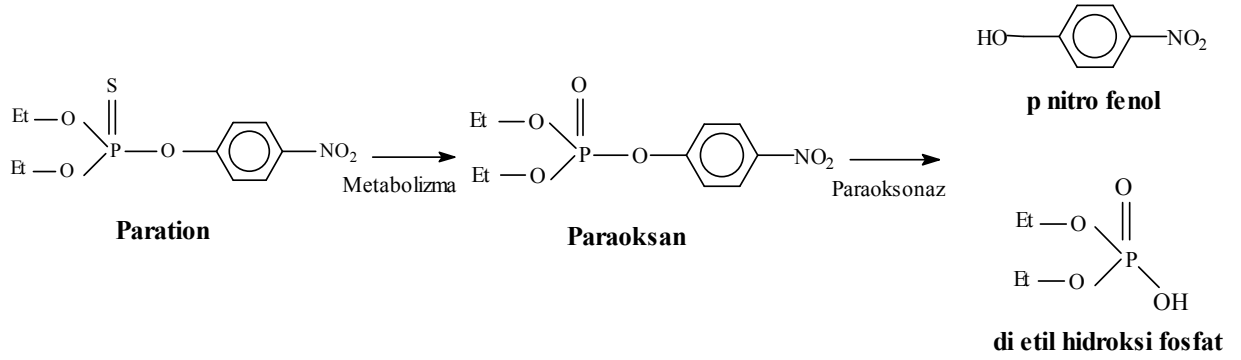


Şekil 1.1 Paraoksonun kimyasal yapısı (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat)

Paraoksanaz enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenmemiştir. Ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

İnsan serum paraoksanaz enzimi, parationun metabolik ürünü olan paraoksanı kataliz etme yeteneğindedir. Paraoksan organizmaya zararlı olup pestisit

olarak kullanılmaktadır. Paraoksanın, paraoksonaz enzimi ile yıkımı sonucu paraoksana oranla göreceli olarak daha az zararlı p-nitro fenol ve di etil hidroksi fosfat bileşikleri oluşur (şekil 1.2) [2].



Şekil 1.2 Paraoksonaz Enzim Mekanizması [2]

1.3. Paraoksonaz Gen Ailesi

Paraoksonaz gen ailesi, insanlarda kromozom 7'nin uzun kolunda q21.3 ve q22.1 arasında bulunmaktadır [5, 11]. İlk olarak memelilerde tanımlanan PON ve PON ile ilişkili genler sonraları kümes hayvanları, zebra balığı ve omurgasızlardan *Caenorhabditis elegans*'ta bulunmuştur [12].

Paraoksonaz gen ailesi; PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere bilinen üç üyeye sahiptir. Bu genler büyük yapısal benzerlikler göstermektedir ve ortak evrimsel öncüden gen dublikasyonlarının meydana gelmesiyle oluşur. Memeli türleri içerisinde PON1, PON2 ve PON3 aminoasit düzeyinde % 60, nükleotid düzeyinde % 70 benzerlik gösterir. Bununla birlikte memeli türleri arasında bu üç genin her biri aminoasit düzeyinde % 79-90, nükleotid düzeyinde % 81-91 benzerlik göstermektedir. PON1, PON2 ve PON3 ile karşılaştırıldığında 4. ekzonda kodlanan 105 aminoasit içinde üç nükleotid rezidüsüyle ayrılır [5, 13].

PON1 ortaya çıkarıldığı süreden beri yıllardır çalışılmaktadır. Son zamanlarda fizyolojik substratlarının ortaya çıkarılması ve arterosklerozis ile ilişkisi ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. PON2 ve PON3, PON1 kadar aydınlatılamamıştır

[5, 14]. PON2'nin gen ürünü biyolojik dokularda henüz tanımlanamamıştır, fakat PON3, tavşan HDL'si üzerinde lokalize olan laktonaz aktivitesi ile tanımlanabilmiştir [5, 15].

1.3.1. PON1

1.3.1.1. PON1 Biyokimyasal Yapısı

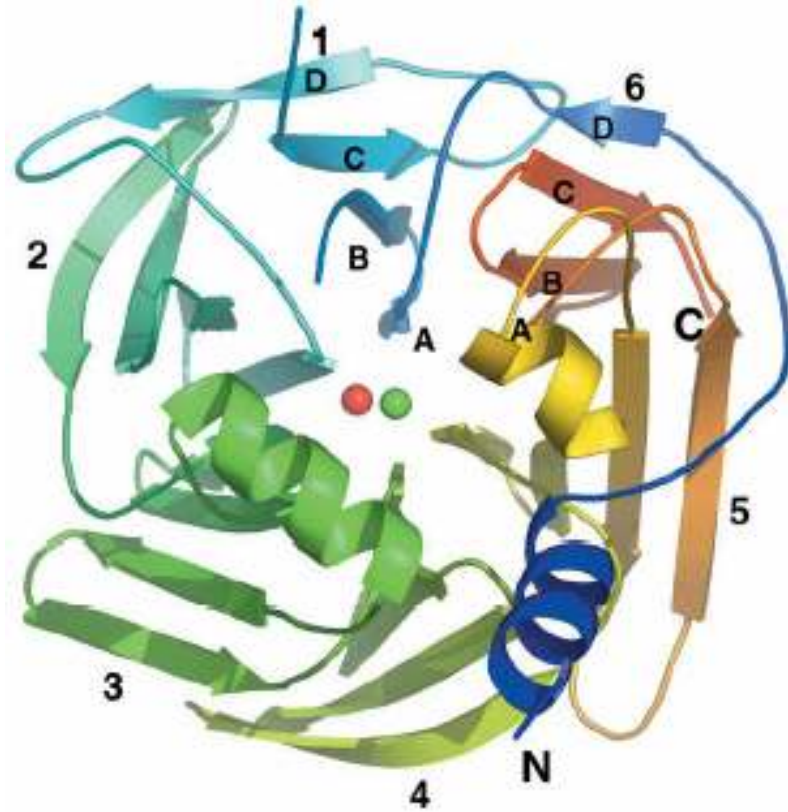
PON gen ailesi içerisinde PON1 yıllardır çalışılan ve PON2 ve PON3'e göre en iyi aydınlatılan enzimdir. Serum PON1, organofosfatların hidrolizini katalizlediği bilinen kalsiyum bağımlı bir esterazdır. Karaciğer, böbrek, bağırsak gibi dokulara geniş çapta yayılmıştır. PON1 serumda HDL'ye bağlı olarak bulunur ve PON1'in kararlılığı ve bağlanma ilgisindeki etki HDL içerisinde şekil ve büyüklük değişimine neden olur [13].

PON1, 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip 354 aminoasit içeren bir proteindir [13, 16]. Her molekül total ağırlığın %15.8'ini oluşturan üç karbonhidrat zinciri içermektedir. İzoelektrik noktası 5.1'dir. Aminoasit bileşimi yüksek lösin içeriği dışında bir özellik göstermez [17]. Yapısında yer alan 3 sistein (Cys) rezidüsünden 284'teki serbest 42 ve 352. sistein rezidüleri arasında tek disülfid bağı bulunur. *İn situ* hibridizasyon çalışmaları ile PON1 geninin 7. kromozomun uzun kolu üzerinde q21-q22' de bulunduğu gösterilmiştir [2, 8].

PON1'in ince yapısı 4 adet zincirden oluşmuş 6 adet β -kırmalı yapıdan meydana gelmiştir (Şekil1.3). Enzim 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü ile sonlanarak üç boyutlu yapısını kazanır [18]. N terminal ve C terminal uçlarının bu şekilde kovalent bağlanması β -kırmalı yapıyı enzimlerde nadir görülür.

Üç boyutlu yapıda; β -kırmalı tabakaların merkezinde 7.4Å aralıklı iki adet Ca^{+2} iyonu bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi yapısal kalsiyum olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır [19]. Diğer ise

katalitik etkinlikte görev alan kalsiyumdur. Bu kalsiyum iyonu 2.2-2.5Å uzaklıkta 5 adet aminoasit rezidüsü (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu 53) ile etkileşim halindedir. Aynı kalsiyum iyonu bir su molekülü ile fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşmektedir. PON1'in yapısı 6 adet β -kırmalı tabaka ile merkezdeki Ca^{+2} iyonları açısından diisopropilfluorofosfataz (DFPase) enzimi ile benzerlik göstermektedir [20]. Ancak PON1 esteraz, fosfotriesteraz ve laktonaz aktivitesi gösterirken, DFPase sadece fosfotriesterase aktivitesi gösterir. Ancak bu iki enzimin aminoasit dizilerinde belirgin bir benzerlik yoktur [21]. PON1 aktif bölgede diğer β -kırmalı yapılardan farklı olarak hidrofobik heliks (H_2 ve H_3) yapıları vardır (şekil 1.3). Bunlar aynı zamanda sonlanma noktalarıdır. Bu yapı aktif bölgenin korunması ve enzimin HDL'ye bağlanması gibi kritik rollere sahiptir. PON1 sentezlendiğinde monomerik yapı şeklindedir. Eğer HDL'ye bağlanmazsa oligomerizasyon yapabilir. Bu olay *in vitro* deterjanlı ortamda H_2 ve H_3 heliksleri ile deterjan misellerine bağlanarak gerçekleşir [22].



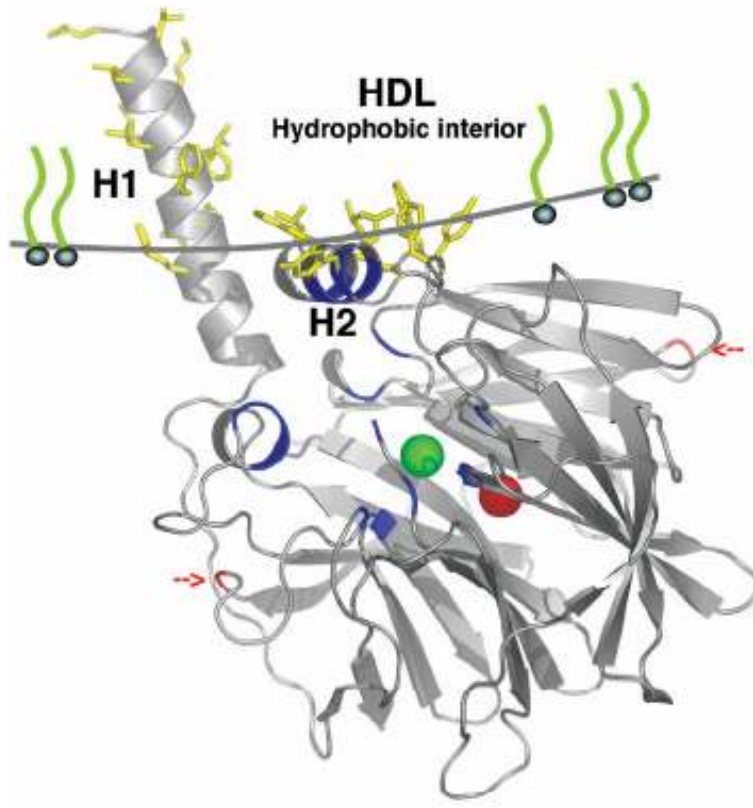
Şekil 1.3 PON1'in üç boyutlu yapısı [15]

PON1 üzerinde 4 tane potansiyel N-glikozillenme bölgesi vardır. İki tanesi (Asn 227 ve Asn 270) β -kırmalı tabakaların merkezinde, diğer ikisi ise yüzeye bakan bölgede (Asn 253 ve Asn 324) yer almaktadır. PON1 memeli hücrelerinde ekspre edildikten bu noktalardan glikozillenir [23]. PON ailesinin hidrolitik aktivitesi için glikolizasyon önemli değildir [24, 25]. Ancak enzimin yapısında bulunan bu karbohidrat molekülleri spesifik olmayan hücre membranlarına bağlanmada veya kararlılığı ve çözünürlüğü arttırmada etkili olabilir [26, 27].

1.3.1.2. PON1'in HDL'ye Bağlanması

PON1 ve PON3 karaciğerde sentezlendikten sonra kana salınır, orada spesifik olarak HDL'ye bağlanır. HDL periferel hücrelerden kolesterolün taşınmasını sağlayan ve kendisine bağlı platelet aktive eden faktör, PON1 ve PON3 gibi enzimler ile LDL'nin oksidasyonunu önler [57, 58].

HDL yaklaşık 10nm çapında kompleks bir yapıdır. Bileşiminde öncelikle membran bileşenleri (fosfolipidler, kolesterol ve kolesterol esterleri), apolipoprotein A1 ve aromatik heliksler yer alır [59]. HDL'ye bağlı olan enzimlerden ilk kez üç boyutlu yapısı aydınlatılan PON1 enzimidir. PON1 hidrofobik N terminal ucuyla sonlanır, H₂ ve H₁ hidrofobik heliksler bir araya gelerek potansiyel membrana bağlanma yüzeyi oluşturular (şekil 1.4). Heliks yapılar lizin, triptofan ve tirozin yan zincirleri ile oluşturdukları yapı karakteristiği ile HDL ara yüzeyine girebilmektedir [27].



Şekil 1.4 PON1'in HDL'ye bağlanması [15]

1.3.1.3. PON1 Sentezlenmesi ve Salgılanması

PON1 sentezi karaciğerde gerçekleştiğinden dolayı, serumdaki PON1 seviyesini belirleyen başlıca faktör karaciğer fonksiyonlarıdır. Serumdaki PON1 seviyesi ve aktivitesi bireyler arasında çok değişkendir [60]. Bunun nedeni enzim aktivitesini ve peptit konsantrasyonunu etkileyen PON1 geninin kodlanma ve promotor bölgesinde çok sayıda polimorfizm göstermesidir. PON1'in serumdaki aktivitesini ve konsantrasyonunu belirleyen promotor aktivitesi üzerinde en önemli polimorfizm -107 pozisyonundadır [37, 38]. PON1 sentezinde önemli olan bir diğer faktör karaciğer hücrelerindeki kolesterol dengesidir. Ayrıca PON1'in karaciğerden sentezini herhangi bir hastalık durumu da etkilemektedir [61-63].

PON1 karaciğerden sentezlendikten sonra serumda HDL'ye veya karaciğerde mikrozomlara bağlanabilmesi için sentez sırasında N-terminal hidrofobik bölgesi olması gerekmektedir. N-terminal hidrofobik bölgesi bağlamada

belirleyici olduğu kadar salgılanma prosedüründe de önemli role sahiptir [64, 65]. Yapılan çalışmalarda hamster ovaryum hücresi ve insan hepatosit hücresine transfekte edilen PON1 sentezlendikten sonra hücre zarının dış yüzeyine bağlandığı gösterilmiştir [66]. PON1 karaciğerde sentezlendikten sonra da önce mikrozomlara bağlı, daha sonra hücrenin dış yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir [67, 68]. Hücrenin zarının dış yüzeyinden salınması ve HDL'ye bağlanması tesadüf değildir, bu bağlanmada fosfolipit kompleksi önemli rol oynamaktadır ve LDL PON1'in hücreden salınmasına ve kendisine bağlanması için fosfolipit içeriği yeterli değildir [27, 66, 67].

1.3.2. PON2

PON2, moleküler ağırlığı yaklaşık 44 kDa olan hücre içinde elde edilen büyük bir proteindir [81, 82]. Paraoksonaz gen ailesinin üyesi olan PON2 hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. PON2, hemen hemen her insan dokusundan elde edilebilir, yüksek oranda ekspresyon karaciğer, böbrek, plasenta, testis ve kalpte yapılır [4].

PON2, kromozom 7q21.3-22.1 üzerinde bulunan paraoksonaz gen ailesinin ikinci üyesidir [4]. PON1'e benzerlik gösteren PON2 pato fizyolojik şartların sayısına bağlı olarak iki polimorfizme sahiptir. Populasyon çalışmalarında PON2 148. pozisyonda alanin veya glisin (A/G148) ve 311. pozisyonda sistein veya serin (C/S311) aminoasitlerinin yer değişimine bağlı olarak polimorfizm göstermektedir. A/G148 polimorfizmi total veya LDL kolestrol seviyeleri, plazmadaki glikoz seviyeleri ve başlangıç ağırlığının değişimleri ile ilişki halindedir [47, 83]. C/S311 polimorfizmi ise kalp damar hastalıkları, tip 2 diyabet, alzheimer ve menopoz sonrası kemik ağırlığını düşmesi ile ilişkilidir [84-86].

PON2 genetik polimorfizmi ile farklı plazma lipoproteinleri arasında bir ilişki bulunduğu belirtilmiştir. İlk olarak PON2 gen polimorfizmleri, lipoprotein metabolizmaları üzerinde direkt bazı fonksiyonel etkilere sahiptir. Örneğin PON2 polimorfizmi lipoproteinlerin sentez ve salgılanması üzerinde fonksiyonel etki gösterir. İkinci olarak PON2 polimorfizmleri PON aktivitesini etkileyebilir. Lipit

metabolizma yolundaki bazı önemli enzimleri (lipoprotein lipaz, hepatik lipaz gibi) aktif yada inaktif yapabilir. Bunun sonucunda lipoprotein kompozisyonu ve lipit seviyeleri değişikliğe uğrayabilir. Benzer ilişki farklı etnik popülasyonlardan alınan örnekleri belirleme de zorluk yaratabilir. Bununla birlikte PON2 polimorfizminin lipoproteinlerle ilişkisi belirlenerek; PON2'nin kromozom 7 üzerindeki genetik polimorfizmlerinin, plazma lipoproteinleri içerisindeki ortak karakterlerin önemli varyasyonlar ile bağlantılı olduğunu gösterir [13].

PON2'nin fizyolojik ve patolojik fizyolojik fonksiyonelleri az bilinmesine rağmen, hücresel düzeyde antioksidant etkisi olduğu bilinmektedir. PON2'nin transfekte edildiği hücrelerde oksitlenmiş lipitler yada hidrojen peroksidin neden olduğu hücre içi oksidatif stres seviyesinin belirgin şekilde düştüğünü gösterir. Rosenblat ve ark.'nın yaptığı çalışma da saflaştırılmış rekombinant PON2'nin, LDL oksidasyonuna karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir [82, 87]. Ayrıca PON2, minimal oksitlenmiş LDL'nin oksidasyonunu da geciktirebilir (MM-LDL). Sonuç olarak; PON2, hücreleri oksidatif stresten korur ve hücresel antioksidant olarak görev yapar. Bununla birlikte PON2'nin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır [13].

1.3.3. PON3

PON3, moleküler ağırlığı yaklaşık 40 kDa olan bir proteindir. Paraoksonaz gen kümesi içerisinde insanda kromozom 7 üzerinde PON1 ve PON2'nin arasında bulunur. PON1 ve PON2'ye karşılık PON3, son zamanlarda tanımlanmış karakterizasyonu en az bilinen proteindir. Son zamanlarda İtalya'nın güneyindeki popülasyon üzerinde yapılan çalışmalara göre PON3, 311. pozisyonda serin veya tironin (S/T311) ve 324. pozisyonda glisin veya aspartik asit (G/D324) aminoasitlerinin yer değişimine bağlı olarak iki polimorfizm göstermektedir. Fakat bu polimorfizmlerin fonksiyonel önemi belirlenememiştir [4, 13, 88].

PON1' benzerlik gösteren PON3'te karaciğerde sentezlendikten sonra kana salınır, orada spesifik olarak HDL'ye bağlanır. HDL periferik hücrelerden

kolesterolün taşınmasını sağlayan ve kendisine bağlı platelet aktive eden faktör, PON1 ve PON3 gibi enzimler ile LDL'nin oksidasyonunu önler [88].

PON1 ve PON3 arterosklerozun önlenmesinde farklı rollere sahiptir. PON3 arteroskleroza karşı bazal koruma fonksiyonu sağlarken, PON1'in koruyucu etkisi daha farklıdır. PON1 ekspresyonu, arterogenezin uyarılması lehine baskılanır [89].

PON3, PON1 ve PON2'ye benzer olarak antioksidant özelliklere sahiptir. Draganov ve ark.'larının yaptığı bir çalışma; tavşan serumundan saflaştırılan PON3'ün *in vitro* ortamda LDL oksidasyonunu arttıran bakırını inhibe ettiğini göstermektedir. Yine aynı çalışma göstermiştir ki her mikrogram üzerinden oksidasyona karşı LDL'yi korumada tavşan PON3'ü tavşan PON1'inden 100 kat daha güçlüdür [4].

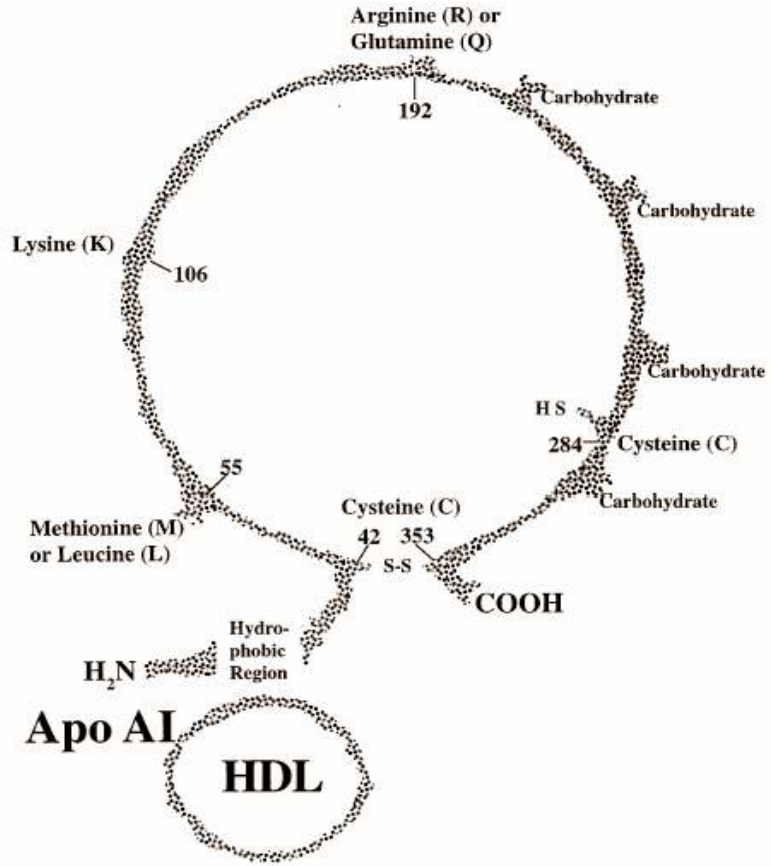
PON3'ün insan dokusunda saflaştırılması ve karakterizasyonu zordur. İnsan PON3, HepG2 hücrelerinden klonlanmış ve karakterize edilmiştir [15, 88, 89]. PON1'e karşın PON3, ne farelerin karaciğerindeki aterojenik diyet ne de HepG2 hücrelerindeki oksitlenmiş fosfolipitler tarafından düzenlenir. Bununla birlikte PON3 oksitlenmiş lipitlerin birikimini önlemez fakat oksitlenmiş LDL'nin neden olduğu monosit kemotaksisi engeller [90]. Ayrıca doğal substratları bilinmemektedir. PON3, PON1 gibi paraokson ve fenilasetata benzer sentetik substratları hidroliz edemez. PON3, PON1'e göre çok az arilesteraz aktivitesine sahiptir ve paraoksonaz aktivitesi göstermez. Fakat laktonazları çok hızlı hidroliz eder [13, 15, 88].

1.4. PON1 Polimorfizmleri

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, bir kısmı PON1 geninin kodlanma bölgesinde, diğerleri intronlarda ve genin düzenleyici yani promoter bölgesinde olmak üzere 160'dan fazla polimorfizm tespit edilmiştir [28]. PON1 enzim aktivitesindeki polimorfizm substrat bağımlıdır ve farklı etnik kökenli popülasyonlara göre değişkenlik gösterir [2]. İlk olarak 1973'de Von Mallinckrodt

ve arkadaşları tarafından enzimin genetik polimorfizm gösterdiği ve enzim aktivitelerinin trimodal dağılıma sahip olduğu gösterilmiştir [29]. Daha sonra 1976'da Playfer ve arkadaşları PON1'in insanlar arasında düşük, orta ve yüksek aktiviteye sahip polimorfik dağılım gösterdiğini daha detaylı bulgularla açıklamıştır [30].

Paraoksonaz aktivite polimorfizminin moleküler temeli, PON1'in kodlanma bölgesindeki kendiliğinden olan mutasyonlar sonucu iki aminoasitin yer değiştirmesi ile ilişkilidir. Bu mutasyonlarda birincisi kodlanma bölgesindeki 192. kodonda glutaminden (Q) arjinine (R) olan değişimdir (şekil 1.5) [31]. Kodlanma bölgesindeki ikinci değişim 55. pozisyonda lösinden (L), metiyonine (M) olan değişimdir. Bu mutasyonun PON1'in aktivitesi üzerinde etkisi çok az iken, serumdaki protein seviyesini etkilediği tespit edilmiştir. PON1'in R allelinin kodlandığı proteinin paraoksan hidroliz aktivitesi Q allele göre sekiz kat daha yüksektir [2]. Ayrıca PON1 Q formu yükseltgenmiş HDL ve LDL'nin metabolize edilmesinde R formundan daha etkilidir [32]. Bu genetik polimorfizm serum protein konsantrasyonunu da etkiler. Homozigot R bireyler homozigot Q'ya göre daha yüksek enzim konsantrasyonuna sahiptir [8]. Farklı populasyonlardaki polimorfik dağılım bireyler arasında varyasyona neden olur [33]. PON1 allozimlerinin kalitatif ve kantitatif olarak farklı olduklarının keşfi ile fenotipleme metodları geliştirilmiştir. İlk olarak 1983'te Eckerson tarafından iki izoenzimin tuz ve pH'a farklı yanıtlarını temel alarak iki fenotip tanımlanmıştır [34]. Tuz (NaCl) varlığında homozigot R allozim (RR) paraoksana karşı daha yüksek enzim aktivitesine sahiptir.



Şekil 1.5 PON1 enzimi gen polimorfizmleri [2]

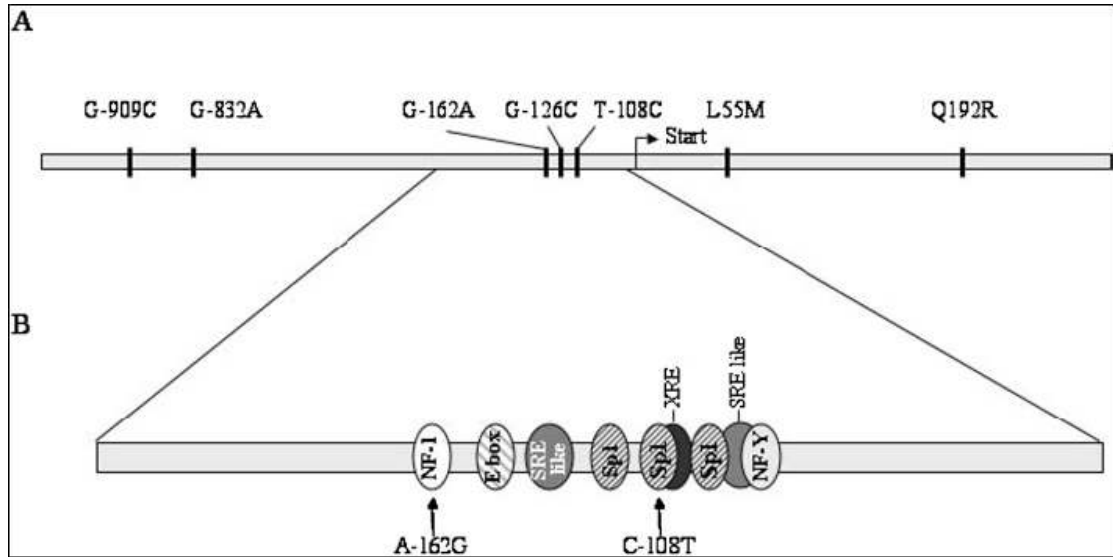
PON1'in kodlanma bölgesindeki PON1 M/L55 ve Q/R192 polimorfizmlerinden başka promotor bölgesinde de en az beş polimorfizm belirlenmiştir. Bu polimorfizmler -107/-108 (C/T), -126 (C/G), -160/-162 (A/G), -824/-832 (A/G) ve -907/-909 (C/G) bölgelerde bulunmaktadır (şekil 1.6) [35, 36]. PON1 genindeki promotor polimorfizmlerinin, gen ekspresyonu ve enzimlerin serum düzeyleri üzerinde güçlü etkisinin olduğu bulunmuştur [13, 37]. HepG2 hücrelerindeki lusiferaz geninde yapılan çalışmalarda; promotor içersindeki GACC polimorfizmleri -909, -832, -162, ve -108 pozisyonlarında CGGT'ye göre iki kat daha aktiftir [37]. -107T, -824G ve -907G polimorfizmleri en yüksek konsantrasyon ve aktivite gösteren polimorfizmlerdir ve -107T polimorfizmi, PON1 gen ekspresyonu üzerinde dominant etkiye sahiptir [13, 37]. Promoter aktivitesi içersindeki bu varyasyonlar, serum PON1 konsantrasyonu ve aktivitesi içersindeki anlamlı farklılıklarla ilişki halindedir [37]. Ayrıca promotor polimorfizmleri PON1

geninin 3' okunmayan bölgesi içersinde de ortaya çıkarılmıştır, fakat bunların önemi henüz bilinmemektedir [35].

İki popülasyonun haplotip analizi göstermiştir ki; C(108)T polimorfizminin serum PON1 varyasyonunda %23-24 oranında esas katılımcıdır. Ayrıca az da olsa A(-162)G polimorfizmi de %1,1 oranında etki etmektedir. -909 ve -832. bölgelerdeki polimorfizmlerin ise serum PON1 düzeyindeki farklılıklarla ilişkisi bulunmamaktadır [35, 38].

-108 ve -162 polimorfizmlerini kapsayan yaklaşık 200 bp'lik alan, PON1 geninin transkripsiyonu için gereklidir [35, 39, 40]. -108. bölgede meydana gelen polimorfizm PON1 serum varyasyonunun en önemli katılımcısıdır. Bu polimorfizm Sp1 ve Sp3 transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için konsensusun ortasında lokalize olmuştur. Bu konsensus alanı -108T varyasyonu varlığında engellenir [35, 37]. Sp1'in bağlanmasında polimorfizmlerin etkisi ile ilgili olarak yapılan araştırmalara göre -108. bölgeye Sp1'in bağlanmasında T'nin varlığının C'den daha zayıf olduğu bulunmuştur [38]. -162. bölgede bulunan polimorfizm, NF-1 (nuclear factor-1) bağlanma alanının üzerinde bulunur. -162A varyasyonu NF-1'in bağlanmasında G varyasyonuna göre daha yüksek aktivite göstermektedir. -162'deki bu değişim gen ekspresyonu üzerinde açıklanabilir [35, 36].

PON1 promoter polimorfizmleri ve kodlama bölgesinde oluşan polimorfizmler arasında ilişki bulunmaktadır. -108C ve 192R polimorfizmleri kardiyovasküler hastalıklara karşı daha düşük seviyede koruma gösterir. Bununla birlikte PON1-192 (Q/R) polimorfizmi enzim aktivitesi bakımından düşünüldüğünde bağımsız olarak hareket eder [35].



Şekil 1.6 PON1 enzimi promoter bölgesi polimorfizmleri [35]

Paraoksonaz polimorfik dağılımı büyük interetnik değişim göstermektedir. Türk popülasyonunda RR allel oldukça düşük bir oranda bulunmuştur. Trimodal dağılım için QQ, QR ve RR allellerinin frekansı sırasıyla % 48.6, % 41.0 ve % 10.4 olarak tespit edilmiştir [33]. Düşük aktivite gösteren Q allel Avrupa, Kanada ve Amerika'da yüksek, Avustralya, Aborigin ve Zambiya'da düşüktür [2].

PON1'in kodlanma bölgesindeki diğer bir polimorfizm 102. kodonda izolösinden valine olan değişimdir [6]. PON1'in promoter bölgesinde 5 tane polimorfizm tespit edilmiştir. Bunlardan plazma PON1 seviyesini etkileyen en önemli olanı C108T polimorfizmidir [35].

PON1 enziminin aktivitesi polimorfizme bağlı olarak oldukça değişim göstermektedir. Söz konusu enzimin organizmada fizyolojik fonksiyonu tam olarak açıklanamamasına rağmen, klinik yayınlarda PON enzim aktivitesi ile çeşitli hastalıklar arasında ilişkinin belirlenmesine yönelik pek çok çalışmaya rastlanmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarda özellikle incelenen hastalıklar ile PON1 polimorfizmi arasında bir bağlantı olup olmadığı araştırılmıştır.

Öncelikle yapılan pek çok çalışmada kalp damar hastalıkları ile PON1 R/Q192 polimorfizmi arasında önemli bir ilişki olduğu gösterilmiştir [41-46]. Ancak başka çalışmada PON1'in Arjinin 192 polimorfizmi ile kalp damar hastalık riski ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir [47, 48]. Benzer şekilde PON1'in M/L55 polimorfizmi ile kalp damar hastalıkları oluşma riski arasında bir grup çalışmada bağlantı var iken [28, 47], diğer bir çalışma grubunda herhangi bir ilişki olmadığı gösterilmiştir [49-53]. Sonuç olarak, PON1 192. ve 55. polimorfizm genotipleri direkt enzim aktivitesini etkilemektedir. PON1 aktivitesi de geleneksel risk faktörleri dışında, kalp damar hastalıkları oluşma tehlikesini bize önceden haber vermektedir.

Yapılan bir çalışmada, PON1'in 192R ve 55M polimorfizmlerinin erkeklerde prostat kanseri riski ile istatistiksel olarak herhangi ilişkisi olmadığı gösterilmiştir [6]. Japon toplumunda tip 2 şeker hastalarında yapılan bir çalışmada, PON1 enziminin Q192R polimorfizmi ile hastalık arasında önemli bir bağlantı olmadığı tespit edilmiştir [54]. Paraoksonaz enziminin 192. kodonda Q alleli bulunduran kişilerde Parkinson hastalığı olma riskinin istatistiksel olarak ($p<0.005$) yüksek olduğu tespit edilmiştir [55]. Alzheimer hastalarında yapılan bir çalışmada, PON1 geninin 192. polimorfizmi R allel görülme sıklığı kontrol grubuna göre oldukça düşük bulunmuştur [56].

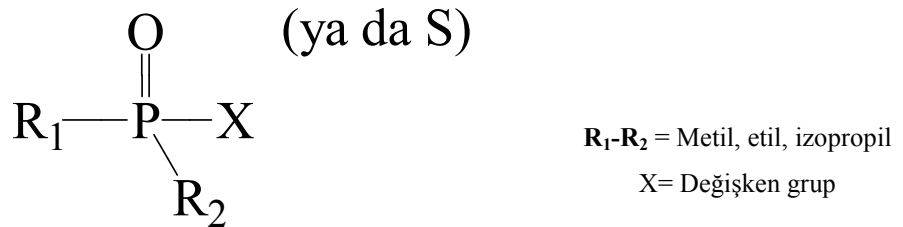
1.5. PON1'in Fonksiyonel Önemi

PON1 ve bazı memeli paraoksonazları toksik ajanların (OP) hücrel zararlarına, plazmadaki LDL'nin lipitleri oksitlemesine ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu olarak hareket eder. Ayrıca LDL'nin lipit bileşenlerinin oksidasyonundan oluşan toksik ürünleri de inaktive edebilir [69].

1.5.1. Hidrolitik aktivite; Organofosfatlara karşı koruma

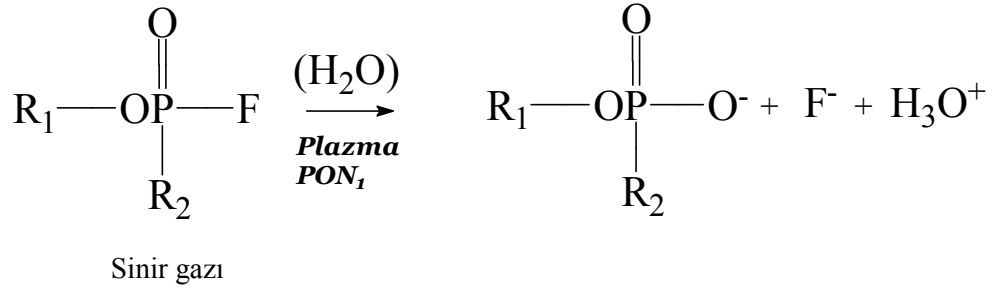
Paraoksonazın arterosklerozisin önlenmesindeki önemli fonksiyonlarından biri organofosfatlara (OP) karşı koruma sağlamasıdır [2]. OP bileşikleri, tarımda pestisit olarak ürün verimini artırma ve veteriner ilaçları yapımında kullanılan fosforik asitlerin triesterleridir. OP'lerin etki mekanizması sinir sistemi içersindeki asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonu ile ilişkilidir. Asetilkolinesteraz merkezi, somatik ve parasempatik sinir sistemindeki asetilkolinleri ve önemli nörotransmitterleri hidroliz eden bir enzimdir. Paraoksonda asetil kolinleri yıkan kolisterezazların potent inhibitörüdür, ardışık nöron uyarılması ile sinaptik bileşelerde asetilkolin birikimine yol açar. Memelilerde karaciğerdeki detoksifikasyondan kaçan herhangi bir okson organofosfat etki alanına ulaşmadan önce kanda serum PON1 enzimiyle hidroliz edilebilir. Bu enzimin inhibisyonu ile OP zehirlenmeleri ve sinir sisteminde bozukluklar meydana gelir [70].

Organofosfatlar, tüm bileşiklerinde organik molekülünün bir parçasında fosfat grubu veya fosfat türevlerini içerirler. OP'lerin genel formülü büyük çoğunluğunda aynıdır. Merkezde fosfat atomu bulunur ve fosfat atomunun oksijen veya sülfürle çift bağ yapmasına göre farklı adlandırılır (şekil 1.7). OP, P=O formunda iken yalnızca asetilkolinesterazları etkileyebilir. Genel olarak kullanıldığı insektisidlerde P=S formun oksijen analoglarına dönüşmesi gereklidir. R₁ ve R₂ grupları genelde alkil veya aril gruplarıdır. X grubu geniş bir değişkenlik göstermekle birlikte genelde alifatik, aromatik ve heterosiklik grupları tanımlamaktadır [28, 71].



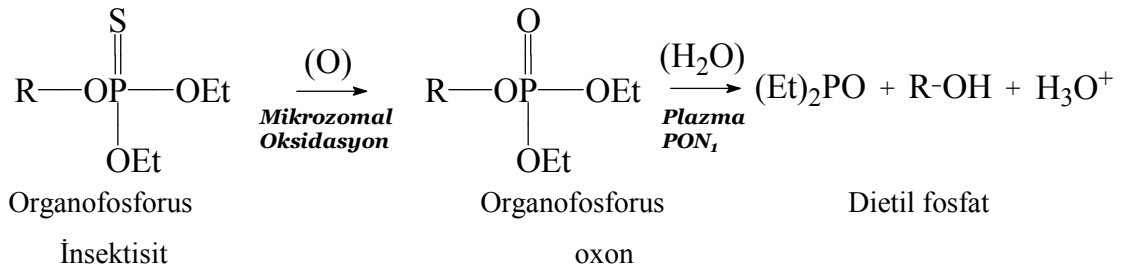
Şekil 1.7 OP bileşiği genel formülü [71]

Organofosfatlar tarımdaki faydalarının yanı sıra insanların hayatını önemli ölçüde tehdit eden toksik kimyasallardır. Paraoksonaz enzimi savunma sistemi oluşturarak OP'lerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmaktadır. Soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir gazlarını hidroliz ederek bunları daha az zararlı bileşiklere dönüştürmektedir (Şekil 1.8) [71].



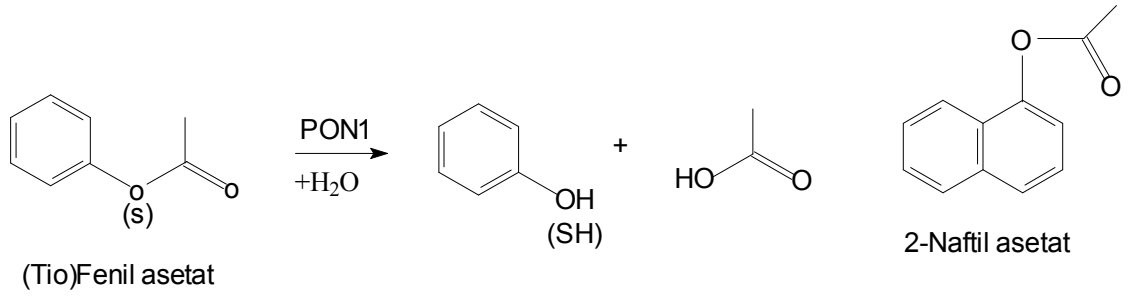
Şekil 1.8 Sinir gazlarının hidrolizi [72]

İnsan serum paraoksonaz enzimi ayrıca paration, diazinon ve klorpirifos gibi çok sayıda insektisit toksik okson metabolitlerini hidrolizleyebilmektedir (Şekil 1.9) [72].



Şekil 1.9 Organofosforus İnsektisitlerin detoksifikasyonu [72]

Bu aktivitelerinin yanında PON1 enzimi sınıflandırılmada yer aldığı A-esteraz grubunda bulunması ile fenilasetat gibi ester substartlarını da hidrolizleyebilmektedir (Şekil 1.10).[23, 27, 34, 73]



Şekil 1.10 Aromatik esterlerin hidrolizi [12]

PON1 eksikliği gösteren böcekler organofosfat için hedef organizmadır. Memelilere kıyasla kuşlarda organofosfat zehirlenmesine yatkınlık daha yüksek bulunmuştur, bu da kuşlarda serum PON1 enziminin yokluğuna bağlıdır. Benzer durum sürüngenler ve balıkların zehirlenmeye yatkınlığını da açıklar [74].

Organofosfatlara karşı koruma sadece enzimin kan ve dokuda bulunan düzeylerine bağlı değildir, izoenzimlere de bağlıdır. B tip (R izozim) paraoksonu hidroliz etmede A tipten (Q izozim) daha etkilidir. Fakat birçok organofosfat B'ye göre A izozimi ile daha iyi hidroliz edilebilir. Bu nedenle PON1'in koruyucu rolü değerlendirilirken PON1'in düzeyinin yanısıra tipide dikkate alınmalıdır [2].

1.5.2. Lipopolisakkarid inaktivasyonu; Bakteriyel endotoksinlere karşı koruma

İnsan serumunda HDL'de bulunan bir proteinin bakteriyel lipopolisakkaritleri inaktive ederek toksik semptomları önlediği saptanmıştır. Lipopolisakkarit inaktivasyonu immunolojik olmaktan çok enzimatik bir reaksiyondur. Bu reaksiyondan sorumlu enzimin PON1 olduğu saptanmıştır. PON1, bakteriyel lipopolisakkariti lipit A molekülündeki 4' fosfat üzerine fosfataz etkisi ile hidroliz eder. HDL'nin bir subfraksiyonu olan Tripanolitik faktör (TLF) *Trypanosoma brucei brucei*'e sitotoksiktir ve apo AI, PON, haptoglobulin ile ilişkili bir proteindir. Lizozomal pH'ta aktive olan PON'un peroksidaz aktivitesi olduğu düşünülmektedir. HDL kompleksinin endotoksin toksisitesine karşı koruyucu

olduğu bilinmektedir. Gram (-) bakteriyel enfeksiyon sırasında endotoksemi gelişimine karşı korumayı bir ölçüde sağlar. PON, makrofaj hücre yüzeyindeki CD14 spesifik bağlayıcı proteinle, bakteri yüzeyinden köken alan lipoprotein polisakkaritin etkileşimini önler. Aksi takdirde TNF- α , IL-1, IL-6 gibi sitokin başlıklarının salınımını başlatır, bu sitokinler değişik semptomlara neden olur [2].

Dr Standiford'un yaptığı çalışmada; farelere, lipopolisakkarit enjeksiyonundan iki saat önce saflaştırılmış PON1 enjekte edilmiştir ve hayvanların %60'ı hayatta kalmıştır. Buna karşılık farelere LPS enjeksiyonundan 2 saat sonra PON1 verildiğinde farelerin % 30'u yaşamıştır. PON1 enjeksiyonu hiç yapılmadan LPS verildiğinde bütün fareler ölmüştür. Bu ve diğer çalışmaların sonucu olarak PON1'in hücreleri LPS'den koruma yeteneğine sahip olduğu anlaşılmaktadır. Fakat PON1'in tip ve düzeyinin bireylerin endotoksinlerine karşı duyarlılığı ve sensitivitesinde fark yaratıp yaratmadığı tartışmalıdır [69].

1.5.3. Oksidatif veya peroksidatif aktivite; LDL oksidasyonunun önlenmesi

PON1, LDL oksidasyonu üzerinde HDL'nin koruyucu etkisinden sorumlu HDL ana bileşenidir. HDL, antioksidant ve antiemflamatur özelliklere sahiptir ve LDL oksidasyonunu buna bağlı olarak da arterosklerozisi geciktirir. Paraoksonaz arterosklerozise karşı koruyuculuğunu sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile göstermektedir. Enzim 4 atomdan 7 atoma kadar değişen lakton halkası ihtiva eden en az 30 çeşit laktonu hidrolizleyebilmektedir [75, 76]

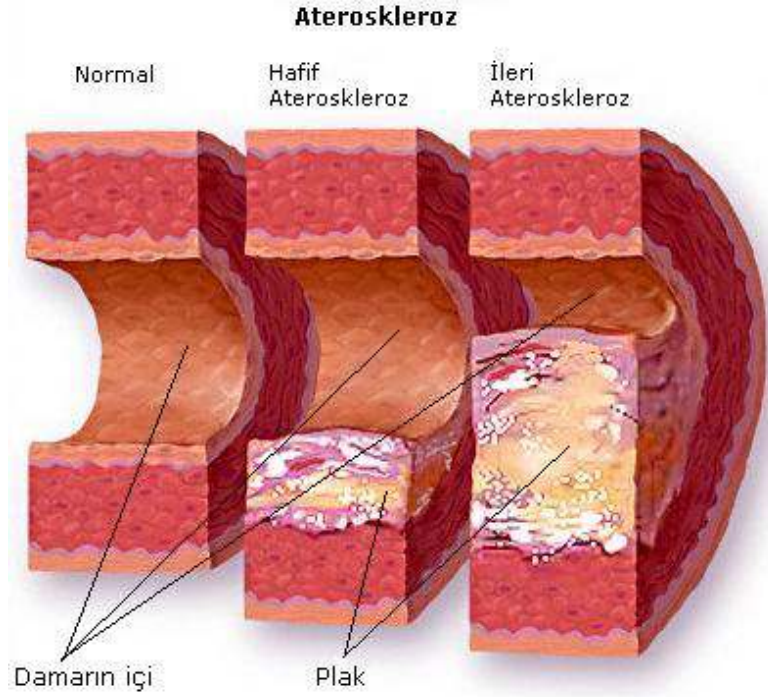
1.5.3.1. Arteroskleroz nedir?

Arteroskleroz, orta ve büyük çaplı arterlerin kan akımını azaltabilen veya tı kayabilen subintimal kalınlaşmalarıyla (aterom) karakterize edilir. Gelişmiş ülkelerdeki en sık ölüm nedeni arterosklerozdur. Aterosklerotik lezyonun bulunduğu yere göre klinik sonuçlar değişkenlik gösterir, örneğin koroner arterin arterosklerozu miyokard enfarktüsü ve anjina pektoris yol açarken, merkezi sinir sistemini besleyen arterlerin arterosklerozunda felç ya da geçici iskemik atak

görülebilmektedir. Aterosklerotik lezyonlar sıklıkla kan akımının bozulduğu, arterlerin ayırım noktalarında oluşur. Arteriosklerozun sözlük anlamı atardamar sertleşmesidir [91].

Atardamar duvarı içten dışa doğru iç, orta ve dış olmak üzere üç katmandan oluşur (şekil 1.11). İç katman bir kat hücre, yani endotel ile onun altında yer alan elastik bağ dokusundan oluşur. Orta katmanda daha çok kas dokusu egemendir. Dış katman ise bağdokusu yapısındadır. Yapı olarak bazı açılardan trigliserit, fosfolipit ve lipoproteine benzeyen yağlar damardaki kanın basıncıyla atardamar duvarının iç katmanlarına doğru itilir. Bu yağlar olağan koşullarda atardamar duvarını aşarak lenf dolaşımına katılırlar. Ama kan dolaşımındaki yağların çok fazla, yağ moleküllerinin büyük olması ve atardamar duvarının esnekliğini yitirmesi durumunda yağlar atardamar duvarının iç ve orta katmanlarında sıkışıp kalırlar. Atardamar duvarındaki enzimler yağ moleküllerini parçalayarak arterioskleroz oluşumundan daha az önem taşıyan kolesterol, yağ asitleri ve başka maddelerin açığa çıkmasını sağlar. Serbest kalan bu maddeler atardamar duvarını tahriş eder. Damar duvarı bu uyarıya iltihabi bir tepki ile yanıt verir. İltihap sonucu gelişen sert bağ dokusu damar duvarını sertleştirir. Bu süreç sırasında yıkıma uğrayan atardamar duvarında, kolayca parçalanabilen yeni kılcal damarlar belirir. Bu da, iltihaplanmanın daha da artmasına yol açar [92].

Yağların sürekli olarak birikmesi ve atardamar duvarının belirli noktalarda kalınlaşması, damar duvarının içeriye doğru katlanarak aterom plaklarının oluşmasına neden olur. Aterom plakları parçalanabilir, ülserleşebilir ya da içeriğinin bir kısmını damara bırakabilir (ateromun ezilerek pelteleşmesi). Özellikle ülserleşme durumunda, dolaşımdaki trombositlerin plak üzerinde birikmesiyle pıhtılaşma süreci başlar. Bu, daha ileride pıhtı oluşumuna ve damar tıkanmasına yol açacaktır. Pıhtıdan kopan parçalar kan dolaşımıyla taşınarak daha küçük çaptaki atardamarları tıkarlar ve ciddi sonuçlara neden olabilirler [91].



Şekil 1.11 Arterioskleroz [93]

Aterosklerotik hastalıklar halen ülkemizde ve gelişmiş ülkelerde birinci sıradaki ölüm sebebi olarak yer almaktadır. Ülkemizde de aynı eğilim görülmektedir. Aşağıdaki tabloda epidemiyolojik risk faktörleri kısaca özetlenmiştir [91].

Çizelge 1.1 Epidemiyolojik risk faktörleri [91]

Değiştirilebilir Risk Faktörleri	Değiştirilemez Risk Faktörleri
Sigara içilmesi (10 adet/gün'den fazla)	İleri Yaş
Hipertansiyon	Erkek Cinsiyet
Kolesterol yüksekliği	Ailede erken (55 yaş altında) koroner Damar Hastalığı Hikayesi Bulunması
Lipoprotein a Yüksekliği	Şeker Hastalığı
Fiziksel Aktivite Azlığı (hareketsizlik)	Kişilik Yapısı (stresli yaşantı)
Doğum Kontrol Hapı Kullanımı	Şişmanlık (obezite)
Alkol Kullanımı	

Arterioskleroz tedavisine, hastalık klinik belirtiler vermeden önce başlamak gerekir. Tedavide beslenme alışkanlıkları yeniden düzenlenir; pıhtılaşma önleyici ve pıhtı çözücü (fibrinolitik) ilaçlar, ayrıca lipoprotein miktarını azaltarak kolesterol sentezini ve taşınmasını önleyen ilaçlar kullanılır.

Arteriosklerozda cerrahi tedavi de uygulanabilir. Koroner damar ya da büyük atardamarların arterioskleroz sonucunda tıkanıdığı olgularda cerrahi girişime başvurulabilir. Günümüzde koroner baypas ameliyatı ya da tıkanan damarın vücuttan alınan bir başka damar parçasıyla değiştirilmesi gibi uygulamalar yapılmaktadır [91].

1.5.3.2. Arterioskleroz ve paraoksonaz arasındaki ilişki nedir?

Son yıllarda yapılan çalışmalar, HDL'nin üzerinde bulunan Ca^{+2} , a bağlı enzim olan paraoksonazın, okside olmuş lipidlerin metabolizmasında ve arteriosklerozdan korumada önemli fizyolojik rolü olduğu yönündedir. 1991'de Mackness grubu heterozigot familial hiperkolesterolemi ve diabetli hastalarda genetik değişiklikten bağımsız olarak kontrolden düşük PON aktivitesi saptamıştır [77]. Fish eye ve Tangier hastalığı olanlarda ise çok düşük, saptanamayacak düzeyde PON aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Bu hastalıklarda arterioskleroz gelişimine yatkınlıktaki artış, yine PON-arterioskleroz ilişkisini ve olasılıkla HDL'nin anti-aterojenik özelliklerinde PON'un önemini ortaya koymuştur. Mackness, serum PON'un arteriosklerozis sürecinin başlangıç evresi olan LDL fosfolipitlerinin oksidasyonuna karşı korunmasında önemli olduğunu ilk gösteren araştırmacıdır [2]. Mackness ve ark. yaptığı çalışmada insan serum PON'de LDL fosfolipit oksidasyonuna karşıya oksidasyonu katalizleyen bakır iyonları kullanmıştır. Sonuç olarak HDL'nin bakırla inkübe edilen LDL'de lipit peroksit oluşumunu % 90 inkübe ettiğini, HDL'den saflaştırılan PON'un TBARS düzeylerini ve lipoperoksit oluşumunu önlediğini gösterdi [69].

PON 1'in LDL'nin yanı sıra lipit peroksitlerin taşıyıcı HDL'i de koruduğu, böylece makrofajlardan kolesterol çıkışındaki etkinliğini arttırdığı tanımlanmıştır. HDL'deki PAF-AH, LCAT gibi diğer enzimlere göre PON'un lipit peroksitleri

hidroliz etmede daha güçlü olduğu bilinmektedir. PON1, lipid peroksidlerin yanı sıra hidrojen peroksit üzerine de etkilidir. Arterogenez sırasında arter duvar hücrelerince üretilen major toksik oksijen metaboliti olan hidrojen peroksit, oksidatif koşullarda daha potent ürünlere dönüşerek LDL oksidasyonuna neden olur. PON'un oksitlenmiş LDL'deki kolesteril linoleat hidroperoksidler ve hidroksitleri indirgemesi nedeniyle peroksidaz benzeri aktivitesi olduğu düşünülmektedir [2,69].

LDL oksidasyonundan korumasında ve LDL oksidasyonuyla oluşan toksik metabolitlerin aktivitesinin azaltılmasında, HDL ile ilişkili olan PON'un HDL üzerine katalizör etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Saflaştırılmış PON'un HDL oksidasyonu üzerine, konsantrasyon bağımlı inhibitör etkisi gözlenmiş, serumda PON miktarının artması HDL'nin oksidasyona karşı direncini arttırmıştır. HDL'nin oksidasyona yatkınlığı, PON inhibitörleri ile ön muamele edildikten sonra artmıştır. PON inhibitörlerinin serum PON aktivitesini azalttığı ve HDL'nin oksidasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. HDL-PON kompleksi veya saflaştırılmış PON'un LDL oksidasyonu üzerine olan inhibitör etkisinin, metal iyon şelasyonu veya peroksidaz benzeri aktiviteden kaynaklandığı belirtilmiştir.

Ayrıca, deneysel çalışmalara göre PON1, KAH riskini ve arterosklerotik lezyon ilerlemesinde gerekli proinflamatuvar molekülleri yıkarak azaltır. Paraoksonaz, LDL'nin oksidasyonu ile oluşan proinflamatuvar moleküllerini parçalamasıyla vasküler hastalık riskini azaltabilir. Örneğin; *invitro*'da saflaştırılmış paraoksonaz, vasküler hücre kültür sistemi içinde okside olmuş LDL'nin proinflamatuvar etkisini bloke eder. PON ve apo A-I arasındaki yakın ilişki, bu iki proteinin doğrudan bağlandığını düşündürür.

Aterosklerotik apoprotein-E eksikliği oluşturulan fareler üzerinde yapılan çalışmada, serum PON aktivitesi ve serum lipidlerinin oksidatif düzeyi arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Apo E eksik olan farelerde hızlı arteroskleroz oluşumu ve oksidatif stres artışı belirgin olarak gözlenmiştir. Benzer şekilde, aterojenik diyet uygulanan fareler üzerinde yapılan çalışmada, farelerin serum PON düzeyleri baskılanmış, oksidasyonuna karşı savunma yeteneğini kaybetmiş ve

kısmen okside olmuş LDL'nin bu farelere enjeksiyonunu serum PON aktivitesini belirgin şekilde düşürmüştür.

İnsan PON1 geninde kodon 192'de DNA polimorfizmi KAH açan risk faktörüdür. Mackness ve ark., B allelin KAH için bağımsız risk faktörü olduğunu ileri sürmüşlerdir [77]. Çalışmalarında iki allosimin LDL üzerindeki lipit peroksidlerin birikimini önleme yeteneğinde bireysel farklılıklar yaratan temel elemanlar olduğunu ortaya koymuştur. Mackness, A genotip PON içeren HDL'nin AB ve BB genotipine göre LDL'yi bakırla indüklenen oksidasyona karşı korumada daha etkili olduğunu göstermiştir. PON AA homozigotlar LDL'yi oksidasyondan korumada daha etkindir, lipit peroksidleri metabolize etme aktivitesi yüksektir.

PON1 geninde tanımlanan 55. pozisyondaki M-L polimorfizminde HDL'nin LDL'yi oksidasyondan korumadaki etkisinde MM varyantının en etkin olduğu ve bu bireylerin KAH gelişimine en az yatkın olduğu saptandı [2].

Yalnız, PON1 aktivitesinin 55-192 polimorfizminden bağımsız olarak 40 kat fazla olabileceği ve bunun sebebi olarak, kazanılan faktörlerin HDL'nin lipid çevresinin içeriğine etkisi (PON1'in işlevi), PON1 geninin promotor bölgesi veya henüz tanımlanamayan başka etkiler sonucu olabileceği düşünülmektedir. PON1 aktivitesi KKH hastalarında direk olarak ölçüldüğünde, hastalık taşımayan kontrollerin yarısı kadar olduğu gözlenmiş ve bu ölçümlerin, MI geçirmiş hastaların kardiyak iskemik göğüs ağrısından birkaç saat sonraki ölçümleri olmasından dolayı, düşük serum PON1 aktivitesinin olaydan önce meydana gelebileceği tahmin edilmiştir. Düşük serum PON1 aktivitesinin genotipten bağımsız olduğu klinik ve deneysel DM, hiperkolesterolemia ve böbrek yetmezliği gibi KKH ile ilişkisi bilinen çeşitli hastalıklarla belirtilmiştir [9].

1.6. PON1 ve Çevresel Faktörler

PON1 aktivitesi yaş, çevresel kimyasallar, diyet, yaşam şekli ve fizyolojik ve patolojik durumlar gibi parametrelerle birlikte değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda PON1 aktivitesi ile yaş arasındaki korelasyon sonucu yaşlı kişilerin gençlere göre HDL oksidasyonundan daha çok etkilendiği gösterilmiştir [78]. Yaşla birlikte PON1 aktivitesindeki azalmada PON1-192 (Q/R) polimorfizmi rol oynamaktadır [36]. Bunu yanında lipit oksidasyon ürünlerince zengin diyetin serum PON1 aktivitesini ve LDL oksidasyonuna yatkınlığı değiştirip değiştirmeyeceği insanlarda henüz tam aydınlatılamamıştır; ancak Sutherland ve ark., doymuş yağdan zengin diyetin tokluk serum PON1/arilesteraz aktivitesini azalttığını, doymamış yağ içeren diyetin ise ters etki yaptığını gösterdi [2]. James ve ark.'larının yaptığı çalışmada sigara kullanan kişilerde kullanmayanlara oranla serum PON1 konsantrasyon ve aktivitesinin daha düşük olduğu saptanmıştır [79]. Buna karşın Van der Gaag ve ark.'larının yaptığı çalışmada KAH riski düşük olan sağlıklı erkeklerde ılımlı alkol alımının PON1 aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir [80]. Gebelik gibi fizyolojik ve patolojik durumlarda da PON1 aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir [28].

1.7. Paraoksonaz enzimi ve diğer hastalıklarla ilişkisi

Paraoksonaz HDL'ye bağlı olup, kalp damar hastalıkları ile ilişkisinin yanı sıra, pek çok klinik yayınlarda gösterildiği gibi enzimin aktivitesinin diğer hastalıklarla da ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Hipergliseminin oksidatif stres ve arteroskleroza zemin hazırladığı düşünülürse, DM'li olgularda serum PON'un rolü ortaya çıkar. PON1-192RR ve PON1-55LL genotipleri NIDDM'li (non-independent Diyabetis mellitus) olgularda daha sık izlenmiştir. DM, hiperkolestrolemi, böbrek yetmezliği gibi KKH ile ilişkisi olduğu bilinen hastalıklarda düşük serum PON1 aktivitesinin genotipten bağımsız olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir [94].

Lipid peroksidasyonu ve oksidatif hasar etkisi ile gelişen nöronal dejenerasyon izlenen Alzheimer hastalığının arteroskleroz ile ilişkisi bilindiğinden

PON polimorfizmi ile ilişkisi incelenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamamıştır [95].

Dilek Yavuz ve ark.'larının hipertiroidli kişilerde yaptığı çalışmada kontrol grubuna göre hipertiroidli kişilerde paraoksonaz enzim aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir [96]. Tip1 diyabetik grupta yapılan diğer bir çalışmada ise endotel fonksiyonu ve PON aktivitesi arasında pozitif korelasyon ($r=0.40$, $p<0.05$) olduğu belirlenmiştir [97].

Nicole Helbecque ve ark.'larının yaptığı çalışmada Alzheimer hastalarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Gln 192 ve T-107 allelleri içeren kişilerde plazmadaki paraoksonaz seviyesinin ve PON1 aktivitesinin düşük olduğu gözlenmiştir. Alzheimer hastalarında yapılan diğer bir çalışmada, PON1 geninin 192. polimorfizmi R allel görülme sıklığı kontrol grubuna göre oldukça düşük bulunmuştur [98].

Marja Marchesani ve ark.'larının Finlandiya popülasyonunda prostat kanseri üzerine yapılan bir çalışmada, PON1 I-102-V polimorfizminin kanser riskini arttırdığı belirlenmiştir [6].

Non-Hodgink lenfoma hastalığına sahip bireylerde PON1-192R polimorfizminin kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Slavonski Broad çevresinde yapılan bir çalışmada, PON1'in paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi hemodiyaliz hastalarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) düzeyde bir azalma gözlenmiştir [99].

Paraoksonaz aktivitesinin romatizmal kireçlenme ile bir ilişkisi tespit edilmiştir. Kireçlenme görülen romatizma hastalarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum paraoksonaz aktivitesinde önemli bir azalma olduğu belirlenmiştir [27].

1.8 AMAÇ

HDL'nin arteroskleroz sürecindeki önleyici rolü iyi bilinmektedir. Arteroskleroz üzerine HDL'nin bu koruyucu etkisinin en muhtemel mekanizması; HDL'nin revers kolesterol transport sistemi ile perifer dokularda fazla kolesterolün birikmesini önlemesi yoluyla olduğu düşünülüyordu. Ancak son kanıtlar, HDL'nin LDL partiküllerinin oksidatif modifikasyonunu inhibe etmesini içeren farklı yollarla da arterosklerozu önlediği rapor edilmiştir. Bu süreçte, Paraoksonaz enzimi gibi, HDL'ye bağlı birkaç enzimin, LDL oksidasyonunu önlemede önemli rol oynadıkları düşünülmektedir.

Aterosklerotik hastalık riski ile serum PON aktivitesi arasında ters bir ilişki bulunmuş ve bu ilişki PON'un okside LDL üzerine olan hidrolitik aktivitesine bağlanmıştır.

Serum PON aktivitesi, çeşitli popülasyon gruplarının arasında ve aynı popülasyon içinde geniş varyasyonlar gösterir. Serum PON aktivitesindeki bu varyasyonları belirleyen en önemli etkenin 192. kodonda kodlanan aminoasit değişimine (Glu-Arg) ve 55.kodonda kodlanan aminoasit değişimine bağlı polimorfizmden kaynaklandığı düşünülmektedir. Paraoksonaz gen polimorfizmi ile aterosklerotik hastalık riski arasındaki ilişkiyi inceleyen birçok çalışma yapılmış ve bu güne kadar yapılan çalışmalarda birbiriyle çelişen sonuçlar elde edilmiştir.

Büyük bir tartışmanın ve birbiri ile çelişen çalışma sonuçlarının olduğu bu konuda, biz de Türk popülasyonunda PON gen polimorfizminin etkisini saptamak amacıyla çalışmamızda, tümörlü ve sağlıklı bireylerde paraoksonaz geninin 192. kodondaki polimorfizmini inceledik.

Bu çalışmamızda; lipit profilleri belirli farklı kanser türlerine sahip bireyler ile sağlıklı kişilerde, serum paraoksonaz enzim aktivitesindeki değişimler ve moleküler biyoloji yöntemleri kullanılarak PON Q/R 192 polimorfizminin fenotipi belirlenmiş, tümörlü ve sağlıklı bireylerde enzimin lipit seviyeleri ile PON1 fenotipleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar; Merc, Sigma, Fermentas ve Biolabs'tan temin edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan örnekler

Araştırmada, 27 - 72 yaş aralığında 79 sağlıklı ve 26 - 104 yaş aralığında 82 tümörlü bireye ait kan kullanılmıştır. Kullanılan kanların kolestrol, trigiliserid, HDL ve LDL lipit değerleri belirlidir. Sağlıklı bireylere ait kanlar Balıkesir Güven Tıp laboratuvarından, tümörlü bireylere ait kanlar Bursa Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesinden temin edilmiştir.

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Çizelge 2.1. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Kullanılan Gereç	Modeli
Soğutmalı santrifüj	Sigma 3K15
Mikrosantrifüj	Thermo
pH metre	Hana pH 211 Microprocessor
UV-Spektrofotometre (Plaka okuyuculu)	Biotek Power Wave XS
Manyetik karıştırıcı	Torrey Pines Scientific
Terazi	Sartorius BL 210S

Otomatik pipetler	Hi-Tech ve Finipipette
Elektroforez Sistemi	Hoefer, HSI
-80 °C ultralow freezer	Sanyo, Japonya
Saf su Cihazı	Destilasyon 3.1(Comekta Sa,)
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Otoklav	Hirayama HV 85
Buz makinesi	Fiocchetti AF 10
Su Banyosu	Elektro-mag
Thermo-block	Eliwell FALC
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)
PCR cihazı	Techne
Etüv	Elektromag

2.1.4. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Çalışmanın deneysel kısımlarında kullanılmak üzere aşağıda isimlendirilmiş çözeltiler hazırlanmıştır.

Çizelge 2.2. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Substrat çözeltisi 2mM paraoksan çözeltisi	10,8µl paraoksan, 1ml asetonda iyice çözüldükten sonra üzerine 1ml bazal aktivite tamponu eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra kullanıldı.
Bazal aktivite tamponu 2mM CaCl ₂ içeren 100mM Tris-HCl, pH=8	3,0285g (25mmol) Tris 200ml destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH'ı 8.0'e getirildi. 0,0555g (0,5mmol) CaCl ₂ katılarak son hacim 250ml'ye tamamlandı.
Tuzla uyarılmış aktivite (salt stimulate) aktivite tamponu	3,0285g (25mmol) Tris, 14,61g NaCl 200ml destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH'ı 8.0'e getirildi. 0,0555g (0,5 mmol) CaCl ₂ katılarak son hacim 250ml'ye tamamlandı.

2mM CaCl ₂ , 1M NaCl içeren 100mM Tris-HCl, pH=8	
---	--

Çizelge 2.3. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Proteinaz K 10mg/ml	0,01g Proteinaz K 1ml destile suda çözülür. -20°C’de saklanır.
Sature Amonyum Asetat (NH₄Ac)	74g NH ₄ Ac, destile su ile 100ml’ye tamamlanır. Magnetik karıştırıcıda yaklaşık 40°C’de çözülür. Filtrasyon ile steril edilir. +4 °C’de saklanır.
Nüklei Lizis Buffer 10mM Tris Base, 400mM NaCL, 2mM EDTA (pH=8,2)	100µl Tris Base, 4ml NaCl ve 40µl Na ₂ EDTA 5860µl destile suda çözülür. 121°C’de 20 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edilir. +4°C’de saklanır.

Çizelge 2.4. PCR için Kullanılan Çözeltiler

dNTP karışımı 10mM	Her bir nükleotitten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10µl alınır ve steril destile su eklenerek 100µl’ye tamamlanır.
Primer Forward sulandırılması 100pmol/µl için 487µl Primer Forward	50pmol/µl için 974µl steril destile su primer forward ile karıştırılır. Oluşan karışım 5 ependorfa eşit oranda ayrılarak saklanır.
Primer Reverse sulandırılması 100pmol/µl için 559µl Primer Reverse	50pmol/µl için 1118µl steril destile su primer reverse ile karıştırılır. Oluşan karışım 5 ependorfa eşit oranda ayrılarak saklanır.

Çizelge 2.5. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

5X/L TBE tamponu pH:8,00	54g Tris Base, 27,5g Borik Asit, 20ml 0,5M EDTA (pH:8,00) tartılır. Üzeri destile su ile 1litreye tamamlanır.
DNA ladder 500µl DNA ladder	100µl DNA ladder (1 hacim), 200µl loading dye (2 hacim) 200µl steril destile suda (2 hacim) çözülür.
%0.8'lik agaroz jel	4g agaroz tartılarak 50ml TBE'de çözülür. 40 – 45°C'ye soğuduktan sonra 2,5µl etidyum bromür eklenerek tanka dökülür.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu

Isıya dayanıklı pipet uçları, ependorflar ve diğer malzemeler 121°C'de 20 dakika (1,02atm basınçta) otoklavda steril edildi. Cam malzemeler 180°C'de pastör fırınında 90 dakika steril edildi.

Çalışmaya başlamadan önce pipetler ve çalışılan yüzey %70'lik alkol ile temizlendi.

2.2.2. Kan serumunun ayrılması

Kan numuneleri, kuru santrifüj tüpüne alındıktan sonra 5000rpm'de, +4°C'de ve 10 dk santrifüj edilerek serumlarının ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan serum aktivite ölçümüne kadar -20°C'de bekletilmiştir. Daha sonra enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Geriye kalan kan ise DNA izolasyonunda kullanılmak için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.3. Enzim Aktivite Tayini

Paraoksonaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümünde substrat olarak paraokson kullanıldı. Aktivite ölçümü için 0.05ml enzim çözeltisi (serum) alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1ml tampon (100mM Tris-Base pH:8.00) ve substrat (2mM paraokson) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412nm’de 1 dakikadaki 37°C’de absorbansta meydana gelen bazal aktivite değeri okundu. Aynı solüsyonlara koenzim (1M NaCl₂) ilave edilerek de salt stimulate aktivite değeri ölçüldü. Bu şekilde paraoksanın p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 ünite Paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün nmol’ü olarak tayin edildi.

Paraoksonaz enzimi bazal ve salt aktiviteleri ölçümünden sonra aşağıda verilen formül kullanılarak fenotip belirlenmesi yapıldı [34].

$$\frac{1M NaCl varlığında paraoksonaz aktivitesi - Bazal paraoksonaz aktivitesi}{Bazal paraoksonaz aktivitesi} \times 100\%$$

Paraoksonun yüksek aktiviteli enzim ile hidrolizi 1M NaCl ile stimüle edildiğinde düşük aktiviteli form inhibe olur. Bu analizde trimodal dağılım izlenir. Geniş düşük aktivite piki (%60 altı) homozigot AA (QQ), daha küçük aktivite piki heterozigot AB (QR) ve en küçük aktivite piki (%200 üzeri) homozigot BB (RR) bireyleri temsil eder.

2.2.4 Genotip Belirlenmesi

2.2.4.1 Kandan Genomik DNA İzolasyonu

400µL EDTA’lı kan 1,5ml’lik eppendorf tüpüne kondu, üzerine 1000µl destile su pipetle eklendi ve 5 dakika iyice çalkalandı. 10 dakika 3500rpm’de

santrifüj edildi. Üstteki sıvı dikkatlice pipetle çekilerek atıldı. Çökelti üzerine 1000 µl destile su eklendi ve iyice çalkalandı. 10 dakika 3500rpm’de santrifüj edildi. Üstteki sıvı dikkatlice pipetle ekilerek atıldı. Çökelti üzerine 250µl nükleli lizis tamponu, 20µl % 10’luk SDS ve 20µl proteinaz K eklendi ve tüp alt-üst edilerek çalkalandı. Eppendorf tüp 72C⁰’deki su banyosunda 10 dakika bekletildi. Eppendorf tüpe 175µl doymuş amonyum asetat eklendi ve 30 saniye çalkalandı. Oda ısısında 15 dakika bekletildi. 4500rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı temiz bir eppendorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 2 katı oranında absolu etanol eklendi. Eppendorf tüpü yavaşça alt-üst edildi. DNA’nın belirmesi gözlemlendi. 13000rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvının tümü pipetle atıldı ve çökelti üzerine 250µl % 75’lik etanol ilave edildi. 13000rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvının tümü pipetle atıldı, DNA hava kurutuldu ve üzerine 250µl destile su eklenerek DNA çözüldü.

2.2.4.2 PCR Amplifikasyonu (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR toplam reaksiyon hacmi 50µl olacak şekilde aşağıdaki bileşenler bir PCR tüpüne kondu. Reaksiyonda PON192-A, PON192-B primerleri kullanıldı. Karışıma en son enzim eklendi. PCR’da kullanılacak malzemeler çalışma esnasında buz üzerinde muhafaza edildi.

Steril destile su	32,8µl
dNTP	1µl
PCR buffer	5µl
Primer Forward (50 pmol/µl)	1µl
Primer Reverse (50 pmol/µl)	1µl
MgCl ₂ (4 mM)	12µl
Kalıp DNA	1µl
Taq DNA Polimeraz	0,2µl

Her PCR’da negatif kontrol çalışıldı. Negatif kontrol çalışılan PCR tüpüne DNA yerine aynı miktar steril destile su eklendi. PCR tüpüne konan bileşenlerin

iyice karışması için çok kısa bir süre (1-2 saniye) santrifüleme yapıldı. Tüpler PCR aletine yerleştirildi. Uygun program seçilerek reaksiyon başlatıldı.

95 °C	3 dakika		
95 °C	1 dakika	}	35 döngü
60 °C	1 dakika		
72 °C	30 saniye		
72 °C	10 dakika		
+4 °C	91 saat		

PCR sonuçları %2'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

2.2.4.3 Etanol Presipitasyonu ile DNA'nın Yıkınması

PCR sonrası tüpte bulunan DNA dışındaki diğer bileşenleri uzaklaştırmak için etanol presipitasyonu ile yıkama yapıldı. PCR edilmiş DNA 1 hacim steril destile suda çözüldü. Üzerine 0,1 hacim 3 M sodyum asetat ve 2 hacim etanol eklendi. 30 dakika -20°C'de bekletildi. 10.000rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Üst faz atılarak çökelti üzerine 300µl %70'lik etanol ile yıkandı. 10.000rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Üst faz atıldı. Pellet 30 µl destile suda çözüldü. -20 °C'de saklandı.

2.2.4.4 Restriksiyon Endonükleaz İle Kesim

Reaksiyon karışımı aşağıdaki miktarlarda hazırlandı.

25µl	DNA
10µl	Steril destile su
4µl	Reaksiyon Buffer (NEBuffer 4)
1µl	Enzim (AlwI)

Karışım 37°C'de 4 saat inkübe edildi.

Sonuçlar agaroz jel elektroforezinde % 2'lik jelde yürütüldü. -20°C'de saklandı.

2.2.5 DNA'nın Analizi

2.2.5.1 Spektral Yöntem

İzole edilen DNA'ların 260nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri (A_{260}) mikrogram düzeyindeki miktarların belirlenmesini sağlar. Çalışmamda kullandığım DNA molekülleri için, 1 OD'nin 50µg/ml'ye karşılık geldiği bilinmektedir. Buna göre DNA miktarlarının belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{sulandırım oranı} \times 50$$

DNA saflığını belirlemek amacıyla DNA'ların 260 ve 280nm dalga boyunda ölçümü yapılarak A_{260} / A_{280} oranından DNA saflığı belirlendi. Saf DNA'larda bu oran 1,75-1,8 olmalıdır.

2.2.5.2 Agaroz Jel Elektroforezi

Kullanılacak jelin büyüklüğüne göre tartılan agaroz, 50ml 0,5X/L TBE (Tris Borat) tamponunda bir erlenmayer içinde ısıtılarak çözüldü. Tampon içerisindeki agaroz iyice eridikten sonra ısıtıcıdan alındı. 40-45°C'ye kadar soğutulmuş jelin içersine 2,5µl etidyum bromür eklendi. Agaroz jel elektroforezinin kaseti jel döküm aparatına yerleştirildi ve kuyucukları oluşturacak olan taraklar takıldı. Jel hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek kasete döküldü. Jelin 30 - 45 dakikada polimerleşmesi beklendi ve taraklar çıkarılarak tanka yerleştirildi. Jelin ilk kuyucuğuna marker diğer kuyucuklara DNA'lar yüklendi. 80V elektrik akımı verilerek DNA'lar yürütüldü. UV'de gözlemlendi ve jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı.

Genomik DNA'lar %0,8'lik jelde 1kb marker kullanılarak yürütüldü. Yükleme için 5µl destile su, 5µl genomik DNA ve 2µl yükleme boyası kullanıldı. PCR ile amplifike edilmiş DNA'lar %2'lik jelde 100bp marker kullanılarak yürütüldü. Yükleme için 10µl genomik DNA ve 2µl yükleme boyası kullanıldı. Restriksiyon Endonükleaz ile kesilmiş DNA'lar %2'lik jelde 50bp marker kullanılarak yürütüldü. Yükleme için 40µl genomik DNA ve 2µl yükleme boyası kullanıldı.

2.2.6. Lipit parametrelerin belirlenmesi

Araştırmada, kullanılan sağlıklı ve tümörlü bireylere ait kanların HDL, LDL, trigliserit ve kolesterol parametreleri belirlenmiştir. Sağlıklı bireylere ait kanlar Balıkesir Güven Tıp laboratuvarında Integra 400 biyokimya analizatörü ile, tümörlü bireylere ait kanlar Bursa Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesinde Hitacchi 902 biyokimya analizatörü ile ölçülmüştür.

2.2.7 İstatistiksel Analiz

İstatistik analiz için Minitab (versiyon 1.0) programı kullanılmıştır. Örneklerin ve kontrol grubunun analizi anova ile yapılmıştır. $p < 0.05$ değeri için kontrol grubu ile örnek arasında ki fark anlamlıdır.

3. BULGULAR

3.1. Sağlıklı ve Tümörlü Bireylerde Paraoksonaz Enzim Aktivitesinin Ve Fenotipinin Belirlenmesi

Çalışmamızda; lipit değerleri belirli 79 sağlıklı bireye ait kan önekleri Balıkesir Güven Tıp laboratuvarı ve 82 farklı kanser türlerine sahip bireylere ait kan önekleri Bursa Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesinden temin edildi. Çalışmada kullanılan sağlıklı bireylerin cinsiyetleri ve yaşları izelge 3.2.'de, tümörlü bireylerin cinsiyet, yaş ve tümör tipleri izelge 3.3.'de gösterildi. Sağlıklı hastalarda ve kanserli hastalarda temin edilemeyen bilgi * şeklinde ifade edilmiştir.

PON1 serumda HDL'ye bağlı olarak bulunan bir enzim olduğundan dolayı enzim aktivitesi ve lipit değerleri ile arasında korelasyonu belirlemek amacıyla çalışmada kullanılan bireylerin kolestrol, trigiliserid, HDL ve LDL değerleri belirlendi (şekil 3.1-2). Kontrol ve sağlıklı bireylere ait kanlar, EDTA paraoksonazı inhibe edeceğinden dolayı kuru tüpte -20°C'de muhafaza edildi. Serum paraoksonaz enzim aktivitesindeki değişimler ve fenotipleri belirlemek için bölüm 2.2.2'de anlatıldığı gibi serum ayrıldı. Daha sonra ayrılan serumda paraoksonaz enziminin aktivitesi 412nm'de paraokson substratına karşı spektrofotometrik olarak tayin edildi. Paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümünde substrat olarak paraokson kullanıldı. Aktivite lm için enzim çözeltisi (serum) alınıp, 1ml tampon (100mM Tris-Base pH:8.00) ve substrat (2mM paraokson) zeltisine eklendikten sonra 412nm'de 1 dakikadaki 37 °C'de absorbansta meydana gelen bazal aktivite değeri okundu. Aynı solüsyonlara koenzim (1M NaCl) ilave edilerek de tuz varlığında tuz ile uyarılmış aktivite değeri ölçüldü. Bu şekilde paraoksanın p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 nite Paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün nmol' olarak tayin edildi.

Paraoksonaz enzimi bazal ve salt aktivite ölçümünden sonra aşağıda verilen formül kullanılarak fenotip belirlenmesi yapıldı [34].

$$\frac{1M NaCl \text{ varlığında paraoksonaz aktivitesi} - \text{Bazal paraoksonaz aktivitesi}}{\text{Bazal paraoksonaz aktivitesi}} \times 100\%$$

Fenotip belirlenmesinde trimodal dağılım izlenir. Geniş düşük aktivite piki (%60 altı) homozigot AA (QQ), daha küçük aktivite piki heterozigot AB (QR) ve en küçük aktivite piki (%200 üzeri) homozigot BB (RR) bireyleri temsil eder.

Çizelge 3.1 Sağlıklı ve tümörlü bireylerin cinsiyete göre yaş aralığı

	n sayı	Yaş (y*)
Kontrol (kadın)	32	26-76
Kontrol (erkek)	47	26-68
Kanser (kadın)	26	28-104
Kanser (erkek)	56	26-79

3.2. Kontrol ve Tümörlü Bireylerin Karşılaştırılması

3.2.1. Sağlıklı Bireylerde PON aktiviteleri ve lipit değerlerinin karşılaştırılması

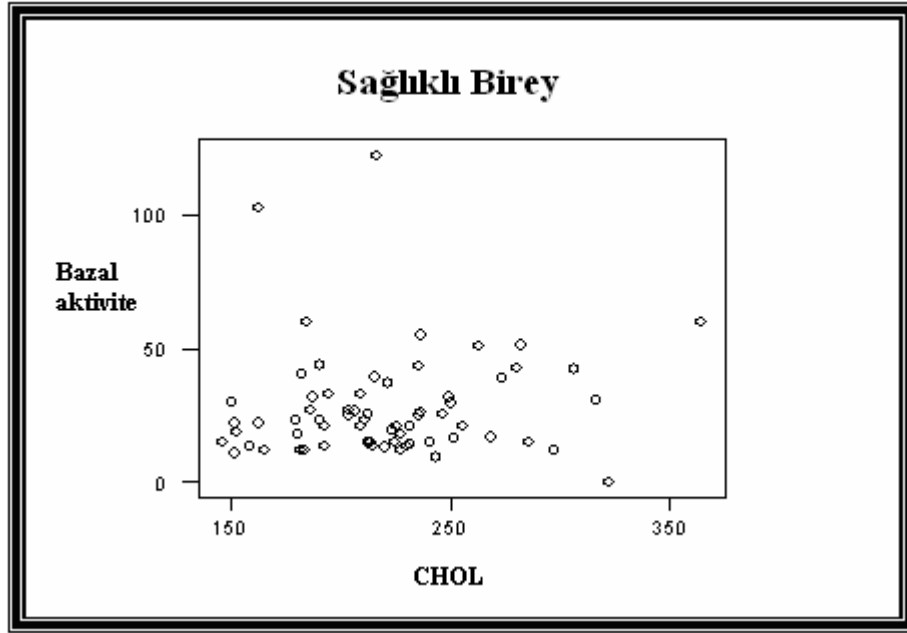
Önemli bir hastalık tanısı konmamış yaş aralığı 26-76 arasında bulunan 32 kadın, 26-68 yaşlarında 47 erkek çalışmamıza dahil edilmiştir. Her bir bireye ait cinsiyet, yaş verileri ile ilgili kişilere ait lipit değerleri kolesterol, HDL ,LDL (mg/dl) değerleri ve bazal paraoksonaz aktivitesi , tuzla uyarılmış paraoksonaz aktiviteleri de çizelge 3.2 de görülmektedir. Bazal aktiviteleri ve tuzla uyarılmış praoksonaz aktivitelerinden yararlanarak fenotip tahmini de yukarıda belirtildiği gibi yapılmıştır.

Buna göre; kontrol grubunu kendi içinde değerlendirdiğimizde, kontrol grubunda bazal aktivite genellikle 0-50 U ve kolesterol 200-250mg/dl (Şekil 3.1), bazal paraoksonaz aktivite 0-50U ve tuz ile uyarılmış aktivite 50-100 U (Şekil 3.2), bazal aktivite 0-50U arasında ve trigliserit 100-300mg/dl (Şekil 3.3) değerleri arasında yoğunlaştığı görülmektedir.

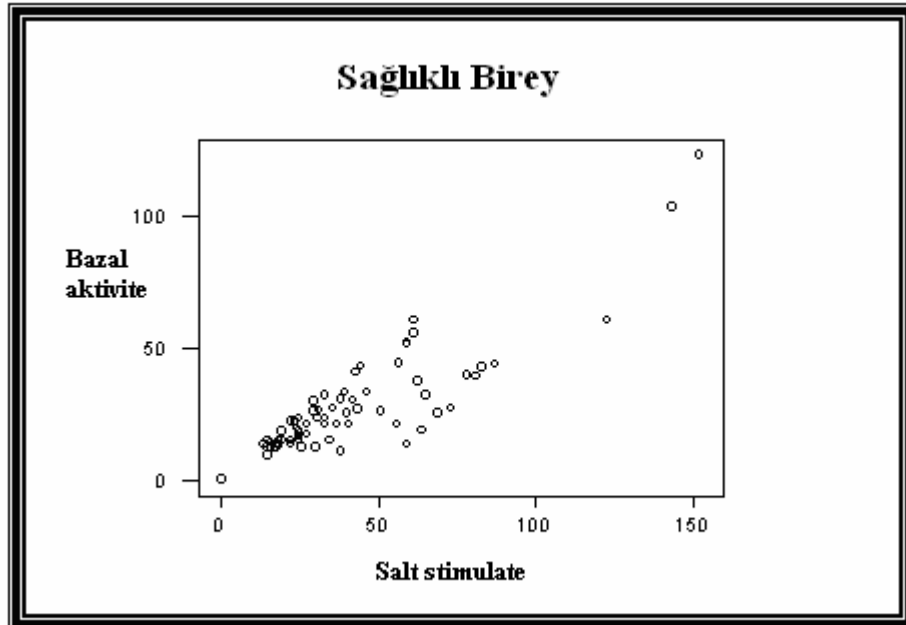
Çizelge 3.2 Sağlıklı bireylerin serum paraoksonaz enzim aktivitesi, lipid parametreleri ve diğer bilgilerinin karşılaştırılması (* temin edilemeyen bilgi)

	Cinsiyet	Yaş	CHOL (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	Bazal Aktive (U)	Tuzla uyarılmış Aktivite (U)	Fenotip
1	K	68	322	122	80.6	216.8	0.035	0.060	AB
2	K	33	181	91	45.5	117.1	12.28	30.08	AB
3	K	65	215	160	49.1	133.8	39.66	78.1	AB
4	E	62	180	227	45.8	101.7	18.42	24.56	AA
5	E	39	236	143	42.7	164.9	55.26	61.40	AA
6	E	43	158	269	41.3	62.7	13.51	17.56	AA
7	K	48	223	124	72.3	126.2	19.64	24.07	AA
8	E	41	246	69	71.1	107.4	25.79	29.47	AA
9	K	39	364	448	44.2	264.5	60.17	122.81	AB
10	K	45	192	69	71.1	107.4	20.88	27.02	AA
11	E	47	151	74	42.8	98.1	11.06	38.07	BB
12	K	40	211	76	61.7	134.2	23.33	30.70	AA
13	K	40	162	83	60.7	84.9	22.11	23.33	AA
14	E	44	280	119	48.9	207.4	42.98	44.21	AA
15	K	43	209	86	74.9	*	20.88	40.53	AB
16	E	48	190	131	50.1	113.5	44.21	56.49	AA
17	K	60	268	171	88.2	145.7	17.19	27.02	AA
18	E	68	187	97	83.8	84.3	31.93	33.16	AA
19	E	40	150	106	43.5	85.2	29.84	41.75	AA
20	K	27	184	87	81.9	86	60.18	61.40	AA
21	E	65	216	225	42.9	128.5	122.80	152.28	AA
22	E	61	203	90	64.5	120.8	27.02	35.61	AA
23	E	52	162	112	46.1	93.3	103.16	143.68	AA
24	E	54	240	125	36.3	*	14.73	34.39	AB
25	E	44	243	95	60	163.8	9.21	14.74	AB
26	E	44	250	141	50.9	170.8	29.47	29.47	AA
27	E	44	212	454	43.1	116.2	14.74	24.56	AB
28	E	45	209	172	30.8	143.7	33.16	39.30	AA
29	E	41	213	332	41.2	105.5	14.74	22.11	AA
30	E	28	151	81	39.5	95.3	22.11	22.11	AA
31	K	63	316	*	43.6	212.7	30.70	38.07	AA
32	E	50	182	245	40.9	92.1	40.53	42.98	AA
33	E	35	227	335	31.9	148.9	12.28	25.79	AB
34	K	53	165	127	54.1	85.5	12.28	14.74	AA
35	K	50	183	95	63.2	100.8	12.28	17.19	AA
36	E	63	282	298	59.2	183.2	51.58	58.95	AA
37	K	52	231	87	66	147.6	20.8	36.84	AB
38	E	45	231	198	44.8	146.6	14.33	15.96	AA
39	E	38	190	93	67.9	103.5	23.33	33.16	AA

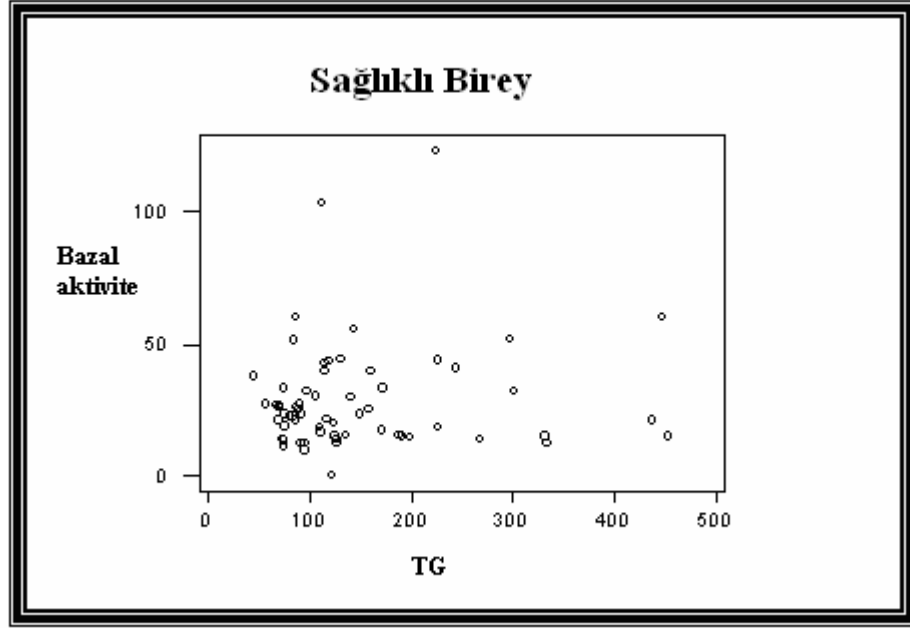
	Cinsiyet	Yaş	CHOL (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	Bazal Aktive (U)	Tuzla uyarılmış Aktivite (U)	Fenotip
40	E	52	146	192	34.5	72.9	14.74	14.74	AA
41	E	41	297	*	43.7	205	12.28	15.55	AA
42	K	54	214	127	64.4	1247	13.51	58.95	BB
43	E	51	203	159	42.6	128.6	25.18	39.92	AA
44	K	52	224	136	51.9	145.4	15.15	18.42	AA
45	E	63	227	110	48.6	156.7	18.42	19.24	AA
46	E	31	249	302	44	163.7	31.93	65.09	AB
47	E	51	225	439	39	114	20.88	33.16	AA
48	K	27	206	70	48.2	144.3	26.60	43.39	AB
49	E	39	152	76	45.5	91.5	18.83	63.86	BB
50	K	42	194	75	69.8	109.3	33.16	46.27	AA
51	E	38	230	75	52.5	162.5	13.51	22.11	AB
52	K	52	251	111	57.6	171.6	16.58	24.56	AA
53	K	43	221	44	76.8	135	37.25	62.63	AB
54	E	14	192	73	68.2	109.1	13.51	13.51	AA
55	K	45	306	115	69.5	213.7	42.57	83.01	AB
56	K	54	263	84	61.2	*	51.17	58.95	AA
57	E	63	255	117	64.5	167.5	21.29	56.08	AA
58	E	32	235	226	53.5	136.6	43.80	87.19	AB
59	E	42	285	188	53.2	194	15.15	19.24	AA
60	E	44	212	86	45.8	148.8	25.79	50.76	AB
61	K	67	273	115	69.9	180.1	39.3	81.05	AB
62	K	50	236	66	69.2	153.3	26.40	31.11	AA
63	E	48	220	74	47.9	157.5	13.11	18.42	AA
64	E	30	179	149	40.8	101	23.33	24.56	AA
65	E	56	235	89	76.6	140.4	24.97	69.18	AB
66	K	72	186	57	89.4	*	27.02	73.07	AB
67	E	36	125	237	33.6	67.4	12.28	12.28	AA
68	K	52	237	148	53,6	153,4	12,28	20,88	AB
69	E	52	243	72	61,2	167,3	31,93	39,3	AA
70	E	60	256	55	67,4	177,2	36,84	49,12	AA
71	E	52	243	149	54,4	159,4	22,1	38,07	AB
72	K	76	193	173	44,4	113,7	27,01	28,24	AA
73	E	49	218	149	78	110,7	30,7	58,95	AB
74	K	26	152	93	99,9	58,2	31,93	71,22	AB
75	K	68	254	128	73,3	155,2	39,3	67,54	AB
76	K	28	193	51	115,3	67,3	20,87	20,87	AA
77	K	55	147	58	63,4	72	15,96	17,19	AA
78	E	65	246	114	74,3	149	8,5	24,56	AB
79	E	53	182	427	38	88,6	29,47	60,38	AB



Şekil 3.1 Kontrol grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve kolestrol değerinin karşılaştırılmalı grafiği



Şekil 3.2 Kontrol grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve tuzla uyarılmış paraoksonaz aktivitelerinin karşılaştırılmalı grafiği



Şekil 3.3 Kontrol grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve trigliserit değerinin karşılaştırılmalı grafiği

3.2.2. Tümörlü Bireylerde PON aktiviteleri ve lipit değerlerinin karşılaştırılması

Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesinden farklı tümörlere sahip, yaşları 28-104 arasında değişen 26 kadın, 26-79 arasında değişen erkek 56 hasta çalışmamızda PON 192 polimorfizmi belirlemek amacıyla çalışmamıza dahil edilmiştir. Ağırlıklı olarak akciğer kanseri olmak üzere çok farklı tümör tipine sahip hastalar tedavinin farklı evrelerindeydiler. Bazı hastaların tümör tipleri konusunda bilgi edinilememiştir (çizelge 3.3). Buna göre tümör tipleri konusunda bir değerlendirilme yapıldığında, cinsiyet ayrımı yapılmaksızın 24 akciğer kanseri, 5 meme kanseri, 3 prostat kanseri, 5 kolon kanseri, 2 cilt kanseri, 2 karaciğer kanseri, 3 beyin tümörü, 2 pankreas kanseri, 3 over kanseri, 9 rektum kanseri, 6 non-hodgink lenfoma, 1 mesane kanseri, 1 omurilik kanseri, 1 İntraabdominal ve 5 mide kanserine sahip tümörlü bireyle çalışma yapılmıştır.

Tümörlü bireyler kendi içinde değerlendirildiğinde, bazal aktivite 0-30U arasında ve kolestol değerleri 0-200mg/dl arasında genellikle yoğunlaştığı görülmektedir (şekil 3.4). Kanser hastalarının trigliserit düzeyinin 0-250mg/dl ve bazal aktivitenin 0-30U arasında (şekil 3.5) değiştiği belirlenmiştir. Tuzla uyarılmış paraoksonazın 0-40U ile ve bazal aktivite 0-30U arasında odaklandığı da görülebilir. Ayrıca kanserli hastalarda görülen bazal aktivite ile tuzla uyarılmış aktiveler arasında pozitif bir korelasyon görülmektedir ($R=0,581$) (şekil 3.6. ve şekil 3.7). Hastaların HDL düzeylerinin 0-60mg/dl arasında bulunduğu bazal aktivitenin de 0-30U arasında değiştiği şekil 3.8 de görülebilir. HDL ve bazal aktivite arasında beklenildiği gibi doğru orantı bir korelasyon hala görülmektedir ($R=0,102$) (şekil 3.9). Hastaların tuzla uyarılmış aktiveleri 0-50 U arasında değiştiği, HDL lerinde 0-60mg/dl arasında değiştiği görülmektedir (şekil 3.10).

Çizelge 3.3 Tümörlü bireylerin serum paraoksonaz enzim aktivitesi, lipid parametreleri ve diğer bilgilerinin karşılaştırılması (* temin edilemeyen bilgi)

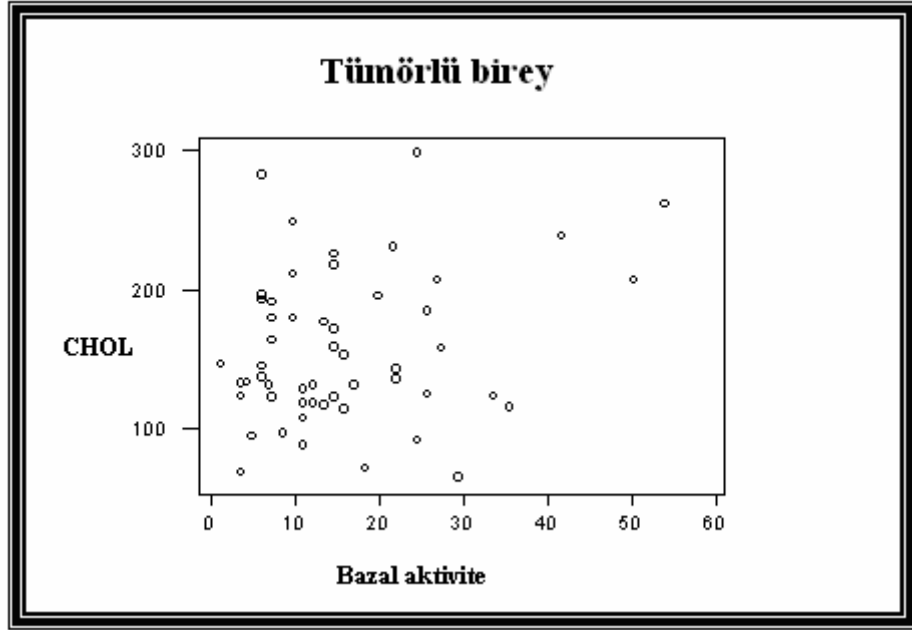
	Cinsi yet	Yaş	Kanser Türü	CH OL (mg/dl)	TG (mg/dl)	HD L (mg/dl)	Bazal Aktivite (U)	Tuzla uyarılması Aktivite (U)	Fenotip
1	E	57	Akciğer Kanseri	206	*	159	50,35	106,84	AB
2	K	63	Miyelom Kanseri	115	460	19.4	35,61	40,53	AA
3	E	56	Pankreas Kanseri	157	164	28.6	27,43	28,24	AA
4	E	71	Akciğer Kanseri	298	70	77.7	24,56	77,37	BB
5	K	82	Vajen Kanseri	144	98	31.4	6,14	22,11	BB
6	K	104	Hepatocellüler Kanser	261	138	62.1	54,04	73,70	AA
7	E	41	*	225	189	33.5	14,74	18,42	AA
8	K	43	Meme Kanseri	68	124	46.5	3,68	20,88	BB
9	E	59	Akciğer Kanseri	91	142	23.5	24,56	24,56	AA
10	E	49	Akciğer Kanseri	123	88	23.2	33,56	77,38	AB
11	E	70	*	131	117.3	114.9	17,19	44,82	AB
12	E	73	*	87	61	23.5	11,05	11,05	AA
13	E	78	Akciğer Kanseri	230	193	51.4	21,7	42,75	AB
14	K	72	*	195	104	51.8	20,06	23,33	AA
15	E	26	*	206	96	61.7	27,02	45,85	AB
16	E	54	Akciğer Kanseri	171	141	30.6	14,74	18,42	AA
17	E	38	*	71	104	40	18,42	38,07	AB
18	E	76	Pankreas Kanseri	132	78	27.7	3,68	29,92	BB
19	E	56	Omurilik Kanseri	128	131	44.7	11,05	11,05	AA
20	K	53	Metastastik meme Kanseri	118	93	67.2	11,05	17,19	AA
21	E	46	Karaciğer Kanseri	131	59	71.3	12,28	13,51	AA

	Cinsi yet	Yaş	Kanser Türü	CH OL (mg/dl)	TG (mg/dl)	HD L (mg/dl)	Bazal Aktive (U)	Tuzla uyarılmış Aktivite (U)	Fenotip
22	K	37	*	116	126	42.9	13,51	18,42	AA
23	E	51	Kolon Kanseri	176	99	52.6	13,51	17,19	AA
24	K	*	Metastastik	94	88	32.6	4,91	54,03	BB
25	E	*	Akciğer	142	70	47.1	22,11	46,67	AB
26	E	*	Mide Kanseri	136	119	39.7	6,14	8,6	AA
27	E	75	Akciğer Kanseri	179	137	25.2	9,82	15,96	AB
28	E	*	*	96	57	73.1	8,6	8,6	AA
29	K	*	*	133	138	46	4,3	6,14	AA
30	E	*	Akciğer Kanseri+ Beyin Metastaz	163	72	65.9	7,37	9,8	AA
31	E	79	Akciğer Kanseri	131	163	32.1	6,96	9,82	AA
32	K	30	Meme Kanseri	196	59	84.5	6,14	24,56	BB
33	E		Akciğer Kanseri	191	150	51.4	7,37	19,65	AB
34	E	50	Akciğer Kanseri	146	68	43.4	1,22	3,68	BB
35	K	64	Endom Kanseri	122	169	17.1	7,37	15,96	AB
36	E	44	Non-Hodging Lenfoma	123	69	56.4	3,68	15,96	BB
37	K	*	Akciğer Kanseri	217	55	45.9	14,73	22,11	AA
38	E	*	Akciğer Kanseri	192	182	58.9	6,14	23,33	BB
39	E	*	Karaciğer Met.+ Primeri	152	116	38.1	15,96	20,9	AA
40	K	*	Over Kanseri	282	283	41.6	6,14	24,56	BB
41	K	48	Meme Kanseri	179	207	38.3	7,37	14,73	AB
42	E	*	Metastastik	135	74	41.3	22,11	46,66	AB

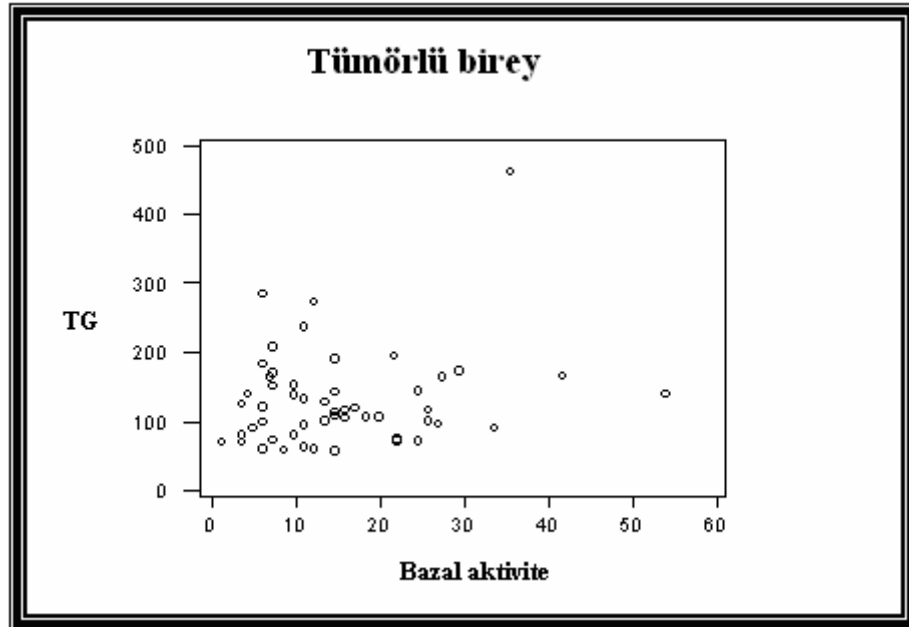
	Cinsi yet	Yaş	Kanser Türü	CH OL (mg/dl)	TG (mg/dl)	HD L (mg/dl)	Bazal Aktive (U)	Tuzla uyarılmış Aktivite (U)	Fenotip
43		*	Kolon Kanseri	238	165		41,75	47,89	AA
44	E	54	Rektum Kanseri	248	151	67.8	9,82	24,56	AB
45	E	50	Akciğer Kanseri	107	235	36	11,05	13,51	AA
46	E	39	Testis Embriyonel Kanseri	211	78	36.3	9,82	25,79	AB
47	E	66	Non-Hodging Lenfoma	118	272	53	12,28	12,28	AA
48	K		Mide Kanseri	184	114	45.6	25,79	29,47	AA
49	K	75	Mide Kanseri+ KC Met.	124	99	58,2	25,79	31,93	AA
50	E	47	Akciğer Kanseri	64	171	62	29,47	31,93	AA
51	E	68	Kolon Kanseri	158	107	49.1	14,74	35,61	AB
52	E	55	Akciğer Kanseri	122	112	56	14,73	14,73	AA
53	K	49	Meme Kanseri	113	103	48	15,96	17,19	AA
54	K	37	Non-Hodging Lenfoma Kanseri	*	73	*	25,79	30,70	AA
55	E	44	Rektum Kanseri	91	64	47	24,56	45,44	AB
56	K	*	Over Kanseri	137	447	19,1	9,82	17,19	AB
57	E	*	Akciğer Kanseri+ Kemik Met.	148	132	44,3	15,96	36,8	AB
58	E	68	Baş Boyun Kanseri	39	127	77	23,33	23,33	AA

	Cinsi yet	Yaş	Kanser Türü	CH OL (mg/dl)	TG (mg/dl)	HD L (mg/dl)	Bazal Aktive (U)	Tuzla uyarılmış Aktivite (U)	Fenotip
59	E	57	Hepatocellular Kanseri	133	54	40	25,79	25,79	AA
60	K	56	Rektum Kanseri+ Kemik Met.	152	135	70,8	19,65	24,56	AA
61	E	55	Non-Hodging Lenfoma	198	109	47,6	40,53	49,12	AA
62	E	71	Prostat Kanseri	120	74	26,5	8,6	11,05	AA
63	E	68	Akciğer Kanseri	133	102	34,1	25,79	29,47	AA
64	K	55	Mesane Kanseri	124	80	29,5	30,7	35,61	AA
65	E	74	Akciğer Kanseri	194	94	42,7	44,21	49,12	AA
66	E	50	Akciğer Kanseri	145	127	11,2	4,91	38,07	BB
67	E	47	Akciğer Kanseri	76	71	21,3	42,98	47,88	AA
68	K	37	Non-Hodging Lenfoma	158	169	27,4	23,33	27,02	AA
69	E	56	Akciğer Kanseri+ Beyin Met.	161	133	46	27,01	28,25	AA
70	K	*	Mide Kanseri	134	156	27	19,65	42,88	AB
71	K	50	Rektum Kanseri	174	71	35,8	14,74	24,56	AB
72	E	48	Non-Hodging Lenfoma Kanseri	143	107	25,3	20,88	28,25	AA
73	K	78	Metastastik Kanseri	152	77	23,3	31,93	46,66	AA

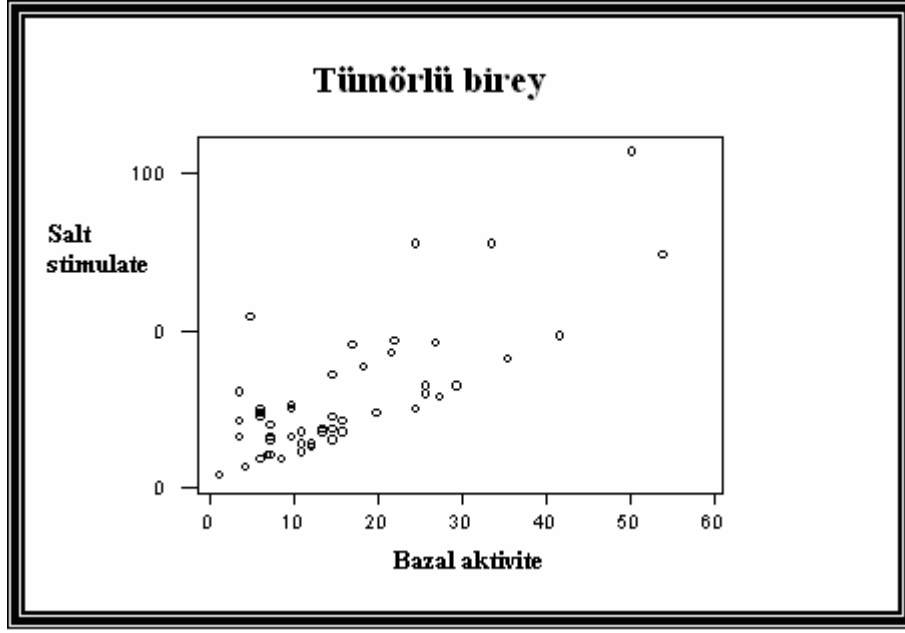
	Cinsi yet	Ya ş	Kanser Türü	CH OL (mg/ dl)	TG (mg/ dl)	HD L (mg/ dl)	Bazal Aktiv e (U)	Tuzla uyarılmı ş Aktivite (U)	Fenoti p
74	E	41	Testis Kanseri	125	199	17,6	50,35	50,35	AA
75	E	56	Akciğer Kanseri	132	267	14,3	14,74	35,61	AB
76	E	43	*	245	119	19,5	13,51	33,16	AB
77	E	30	Kolon Kanseri	117	48	25,7	24,56	41,75	AB
78	E	31	Cilt Kanseri+ Met.	181	119	28,5	19,65	27,02	AA
79	E	55	İntraabdo minal Kitle	102	118	13,7	22,10	33,16	AA
80	K	28	Kolon Kanseri	103	135	31,8	7,37	54,03	BB
81	E		Cilt Kanseri	82	98	17,1	14,73	34,39	AB
82	E	69	*	95	115	14,8	24,56	58,95	AB



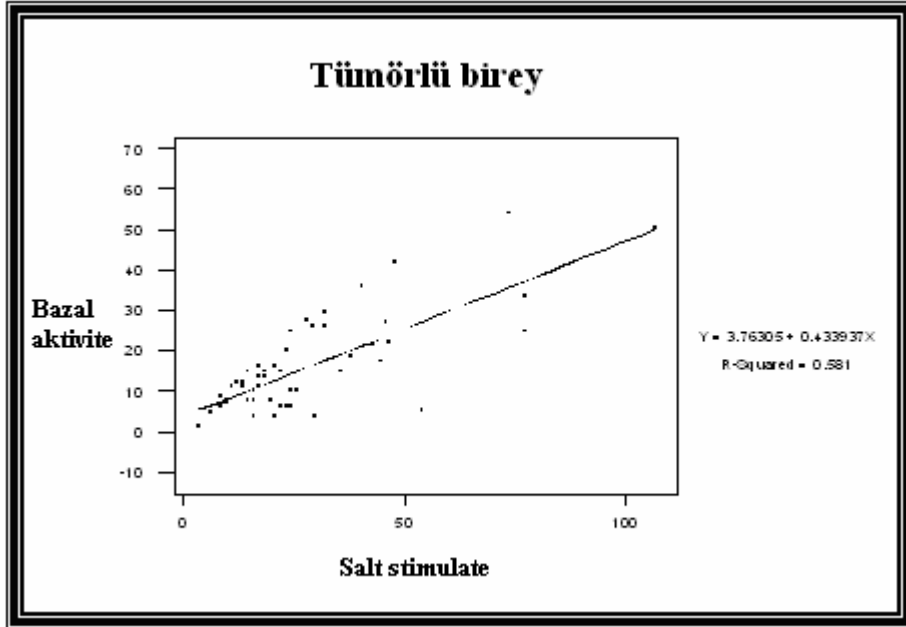
Şekil 3.4 Tümörlü grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve kolesterol değerinin karşılaştırılmalı grafiği



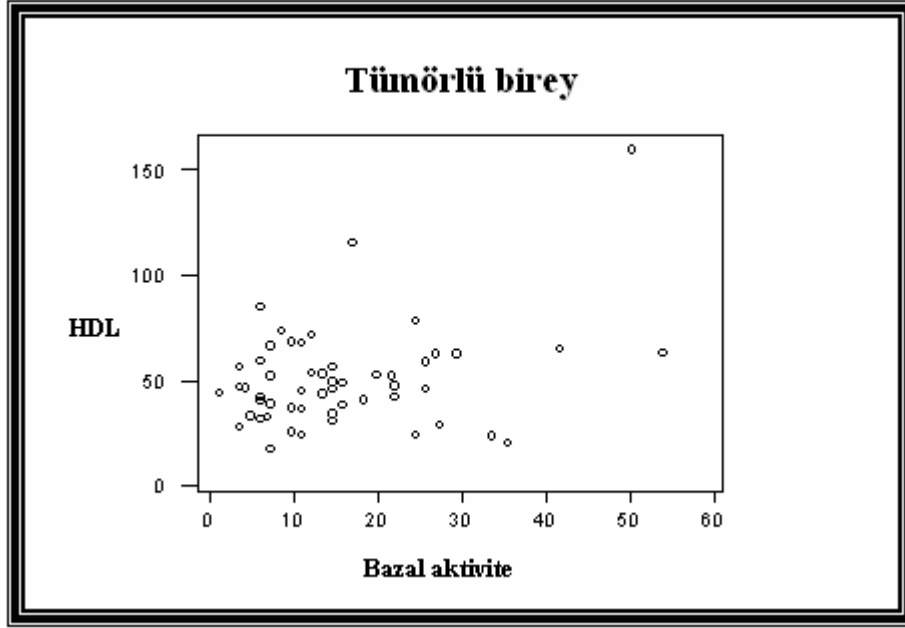
Şekil 3.5 Tümörlü grubunda paraoksonaz enzimi bazal PON aktivite ve trigliserit değerinin karşılaştırılmalı grafiği



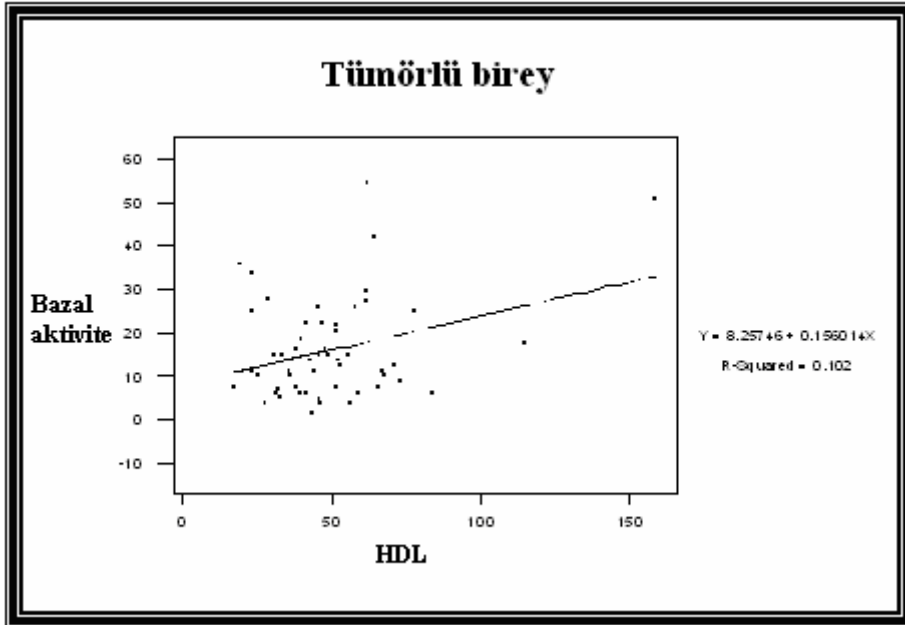
Şekil 3.6 Tümörlü grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve tuzla uyarılmış paraoksonaz aktivitesinin karşılaştırılmalı grafiği



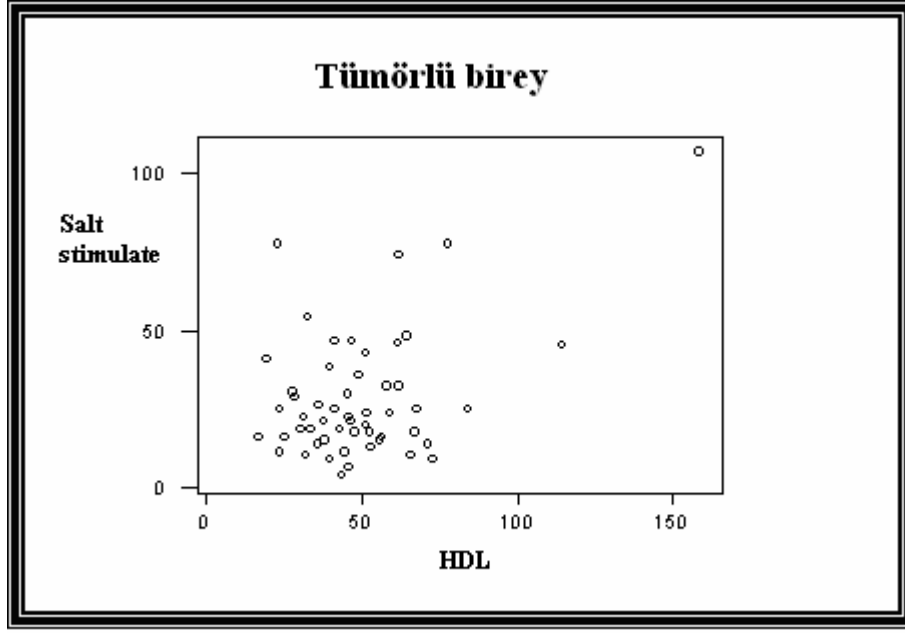
Şekil 3.7 Tümörlü grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve tuzla uyarılmış aktivitelerinin istatistiksel korelasyon grafiği



Şekil 3.8. Tümörlü grubunda paraoksonaz enzimi bazal PON aktivite ve HDL değerinin karşılaştırılmalı grafiği



Şekil 3.9 Tümörlü grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve HDL değerinin istatistiksel korelasyon Grafiği



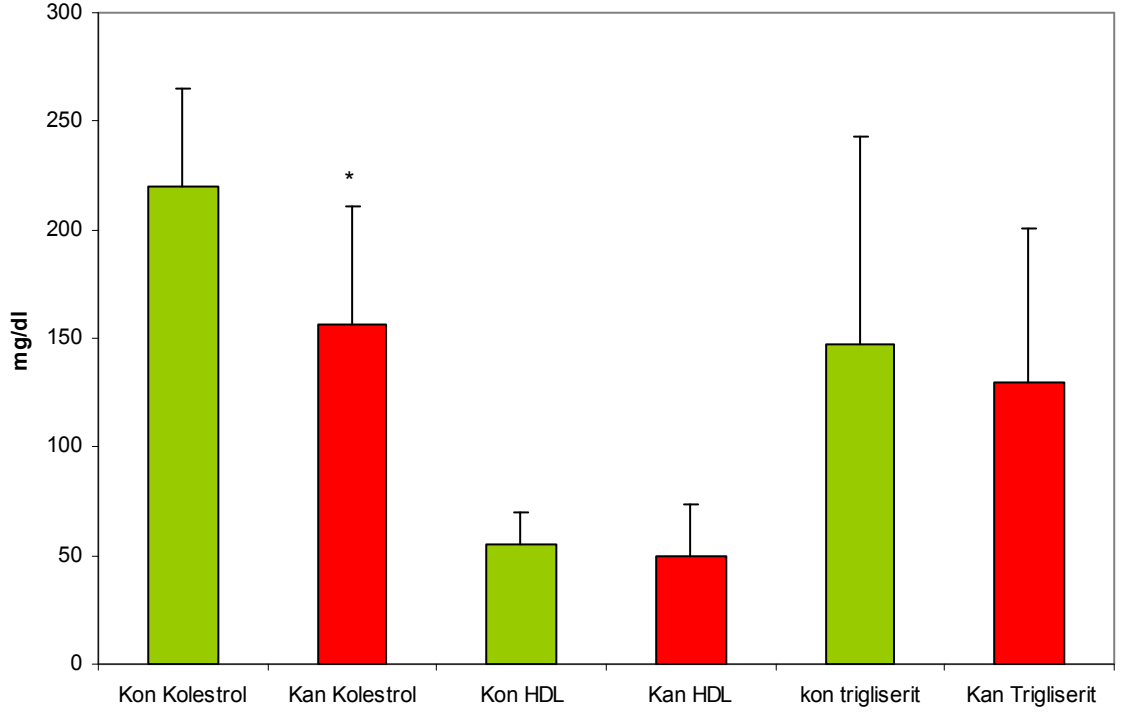
Şekil 3.10 Kontrol grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve tuzla uyarılmış PON aktivitelerinin karşılaştırılmalı grafiği

3.3. Kontrol ve Tümörlü Bireylerin Karşılaştırmalı Analizi

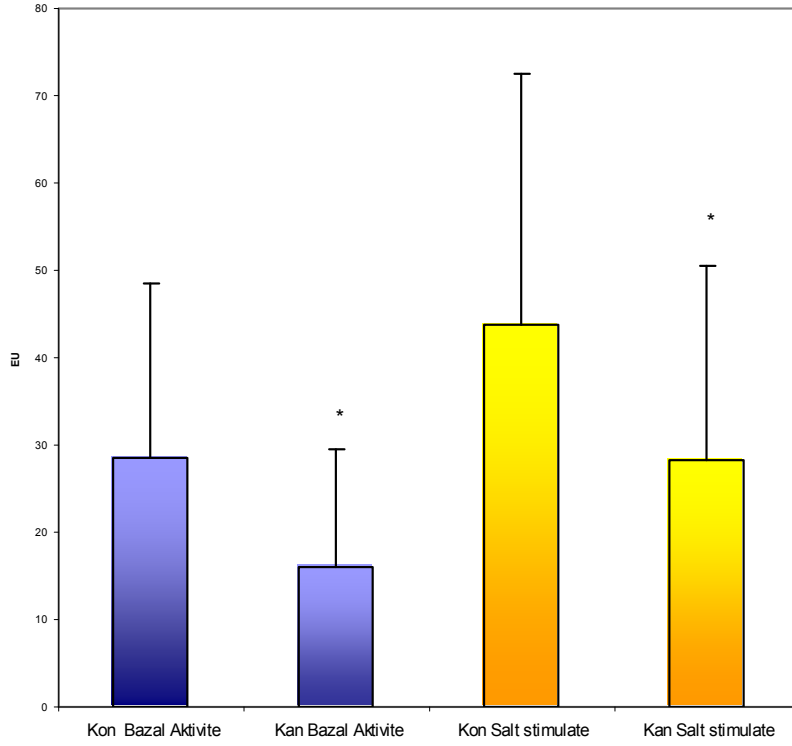
Konrol grupları ve farklı tümör tiplerine sahip bireyler istatistiki olarak ANOVA kullanılarak analiz edildiğinde çizelge 3.4'deki sonuçlar elde edilmiştir. Tüm sağlıklı bireylerde ve kanserli bireylerde tüm lipit değerlerinin, bazal ve tuz uyarılmış paraoksonaz aktivitesinin ortalama, standart sapma, minimum, maximum ve p değerleri belirlenmiştir. 0.005'den küçük değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir. p değerlerine bakılarak tümörlü bireylerde kontrol gruplarına göre bazal aktivite, tuzla uyarılmış paraoksonaz aktivitesi istatistiki olarak anlamlı olarak azalmıştır (çizelge 3.4, şekil 3.12). Lipit parametrelerinden kolesterol düzeyinde de kanserli hastalarda anlamlı bir azalış bulunmuştur (çizelge 3.4 ve şekil 3.11). Ayrıca yukarıda anlatıldığı sağlıklı bireylerde ve kanser hastalarda bazal ve tuz ile uyarılmış paraoksonaz aktivitesi kullanılarak yapılan yukarıdaki hesaplama sonucu genotip tayini yapılmıştır. Buna göre Kontrol grubu nun %50 AA, %26 AB ve %24BB fenotipi belirlenmesine karşın, Kanserli hastalarda %65 AA, % 4 AB ve % 31 BB olarak belirlenmiştir (şekil 3.13.).

Çizelge 3.4 Kontrol ve hasta gruplarda ölçülen serum paraoksonaz enzim aktivitesi ve lipit parametrelerinin istatistiksel değerlendirilmesi

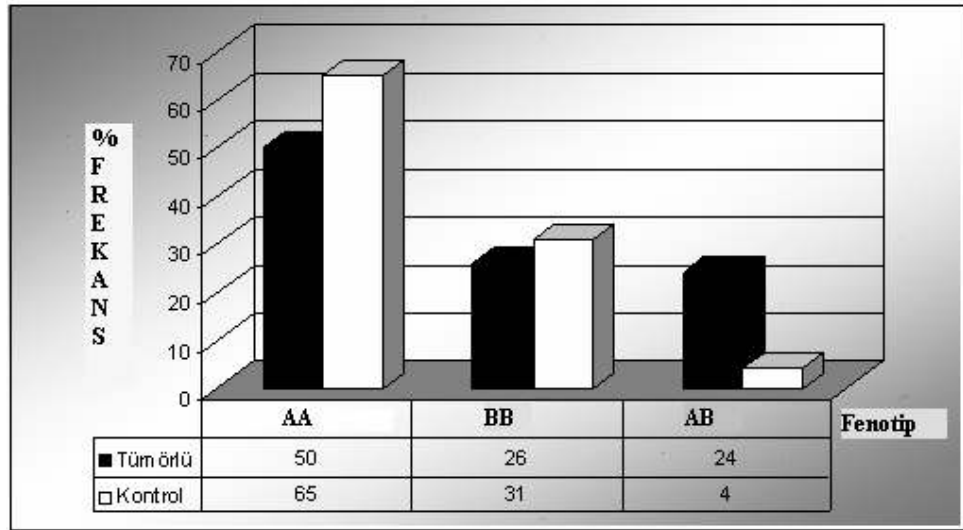
		Ort.	Standart Sapma	Minimum	Maximum	Pdeğeri (Kon X Kan)
K O N T R O L	Bazal PON Aktivite	28,59 U	±20,01	9,21	122,80	-
	Tuzla uyarılmış PON Aktivite	43,66 U	±28,91	13,51	152,28	-
	Kolestrol	220,17	±45,21	146,00	364,00	-
	Trigliserit	147,1	±95,7	44,00	454,00	-
	HDL	55,39	±14,57	30,80	89,40	-
	LDL	135,93	±41,11	62,70	264,50	-
H A S T A	Bazal PON Aktivite	16,03	±13,51	1,22	54,04	0 *
	Tuzla uyarılmış PON Aktivite	28,27	±22,11	3,68	106,84	0,001 *
	Kolestrol	156,15	±54,29	64,00	298,00	0 *
	Trigliserit	129,97	±70,39	55,00	460,00	0,285
	HDL	49,82	±23,75	17,10	159,00	0,188



Şekil 3.11 Kontrol ve hasta gruplarda lipit değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği. * değeri ANAVO analizi sonucu p değerinin 0,005'ten küçük olduğu anlamlı değerleri göstermektedir.



Şekil 3.12 Kontrol ve hasta gruplarda paraoksonaz aktivitelerinin karşılaştırılmalı grafiği. * değeri ANAVO analizi sonucu p değerinin 0,005'ten küçük olduğu anlamlı değerleri göstermektedir.

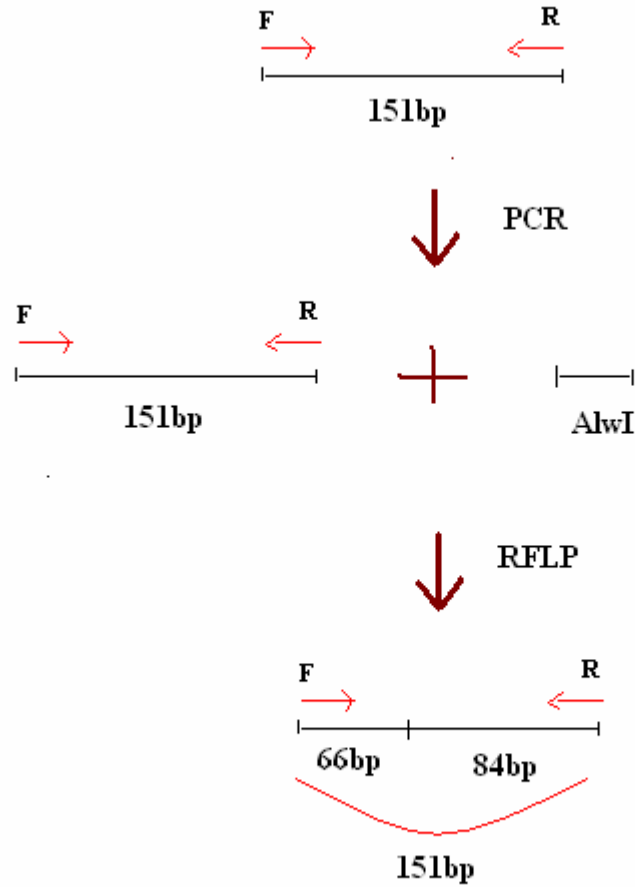


Şekil 3.13 PON1 192Q/R (A/B) fenotiplerinin kontrol ve hasta gruplarındaki dağılımları

3.4. Sağlıklı ve Tümörlü Bireylerde Fenotip Belirlenmesi

3.4.1. PCR-RFLP Stratejisi

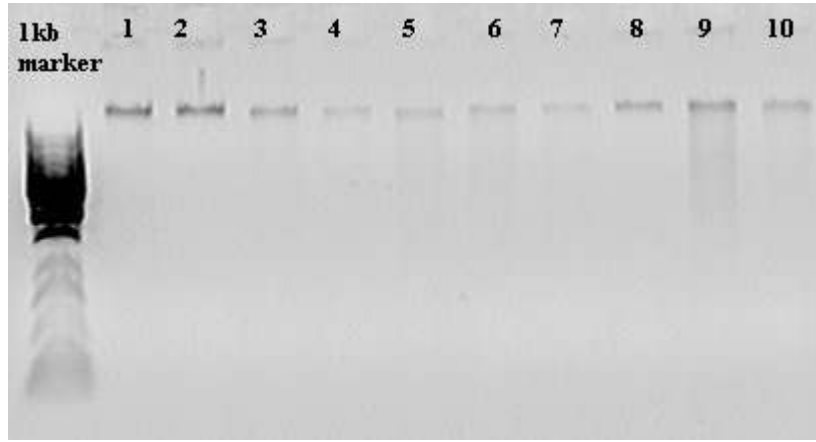
Paraoksonaz enzim aktivitesinden elde edilen fenotiplerin genotipteki durumunu doğrulamak için PCR-RFLP analizi yapıldı. Buna göre Paraksonaz 1 geninin + tat /+ ve + gat /+ arasına düşen 151 bplık bir bölge PCR ile genomik DNA'dan amplifiğe edildi. Elde edilen ürün fenol kloroform ve etanol presipitasyonu ile yıkandıktan sonra AlwI restriksiyon enzimiyle kesilerek elde edilen bantların varlığına göre genotiplemeye gidildi (şekil 3.14).



Şekil 3.14 PCR-RFLP stratejisi (QQ- 151bp, QR- 151bp, 66bp, 84bp, RR- 66bp, 84bp)

3.4.2. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA bölüm 2.2.4.1.'de belirtildiği gibi EDTA'lı tüplere alınmış kandan izole edildi. İzole edilen genomik DNA'lar %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (şekil 3.15). DNA konsantrasyonları spektroskopik yöntemler kullanılarak belirlendi.



Şekil 3.15 İzole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. (1kb marker, 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 farklı bireylere ait genomik DNA'lar)

3.4.3. Polimeraz Zincir reaksiyonu (PCR)

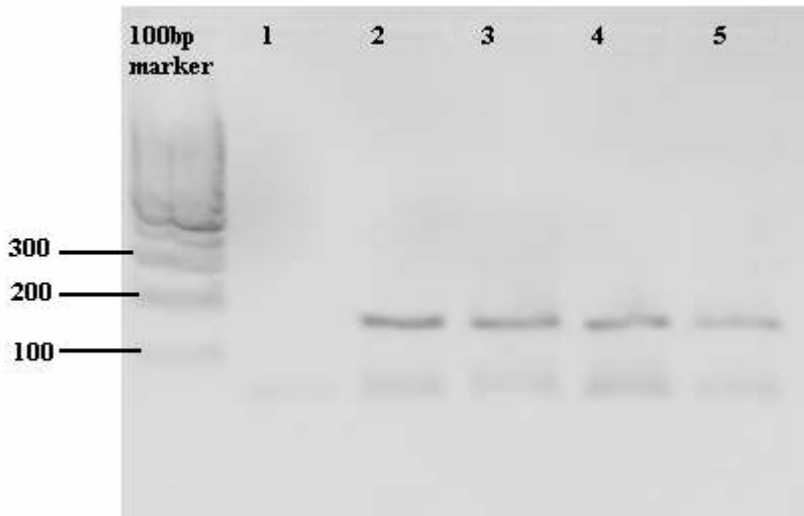
İzole edilen genomik DNA'lar bölüm 2.2.4.2.'de anlatıldığı gibi PON 192 forward ve reverse primerleri kullanılarak PCR yapıldı (çizelge 3.5 ve 3.6). %2'lik jelde yürütüldü (şekil 3.16).

Çizelge 3.5. PON 192_Forward

Dizi	Konsantrasyon	Moleküler Ağırlık	Uzunluk	% GC İçerik	TM
5'-TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G-3'	49 pmol/μl	6812 g/mol	22-mer	% 50	60.3 °C

Çizelge 3.6. PON 192_Reverse

Dizi	Konsantrasyon	Moleküler Ağırlık	Uzunluk	% GC İçerik	TM
5'-CCT TCT GCC ACC ACT CGA AC-3'	56 pmol/μl	5958 g/mol	20-mer	% 60	61.4 °C



Şekil 3.16 PCR amplifikasyonu yapılan DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü (1-negatif kontrol, 2-2. ,3-4. , 4-5. ,5-6. sağlıklı bireylere ait DNA'lar)

3.4.3.1 PCR optimizasyonu

3.4.3.1.1. DNA konsantrasyon optimizasyonu

Kandan izole edilen iki farklı bireye ait genomik DNA'lar farklı DNA konsantrasyonları elde etmek amacıyla 1/2, 1/4 ve 1/8 oranlarında sulandırıldı. Optimize edilen DNA'lar negatif kontrolde kullanılarak PCR yapıldı. PCR sonuçları %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Sulandırılmayan DNA'larda sulandırılan DNA'lara oranla daha net bant elde edildi (şekil 3.17).



1-Sulandırmadan
2- 1/2 oranında sul.
3-1/4 oranında sul.
4-1/8 oranında sul.

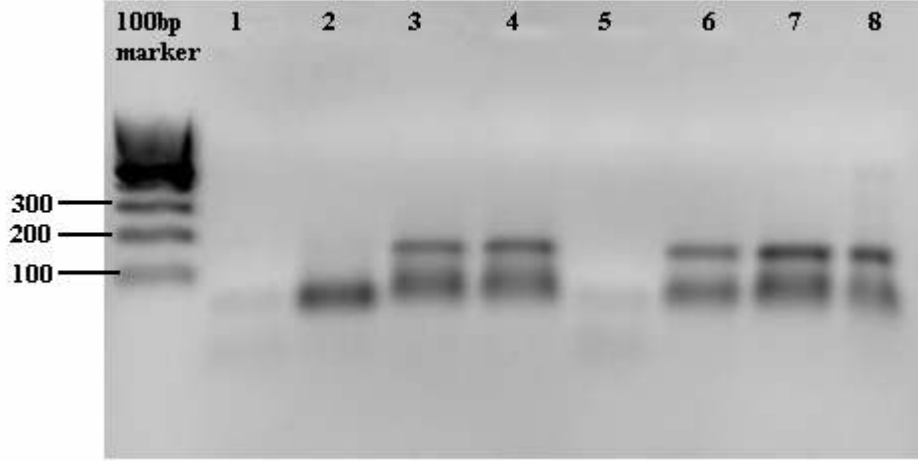
5-Sulandırmadan
6- 1/2 oranında sul.
7-1/4 oranında sul.
8-1/8 oranında sul.

Şekil 3.17 Farklı DNA konsantrasyonları kullanılarak yapılan PCR'ın agaroz jel elektroforez görüntüsü

3.4 .3.1.2. MgCl₂ optimizasyonu

Farklı MgCl₂ konsantrasyonları kullanılarak, izole edilen genomik DNA'lar PCR yapıldı. PCR esnasında sırasıyla 1mM, 2mM, 4mM ve 6mM olmak üzere dört farklı MgCl₂ konsantrasyonu kullanılarak PCR yapıldı. PCR sonuçları %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. MgCl₂

konsantrasyonu arttıkça düşük konsantrasyona oranla daha net bantlar elde edildi(şekil 3.18)



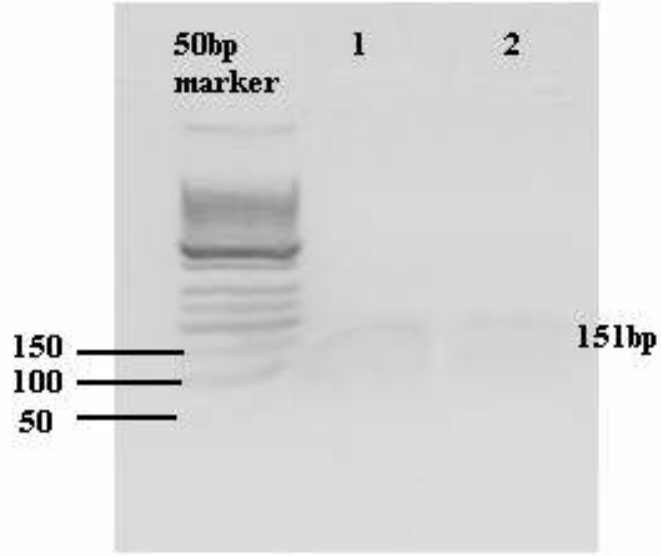
1- 1mM MgCl₂
2- 2mM MgCl₂
3- 4mM MgCl₂
4- 6mM MgCl₂

5- 1mM MgCl₂
6- 2mM MgCl₂
7- 4mM MgCl₂
8- 6mM MgCl₂

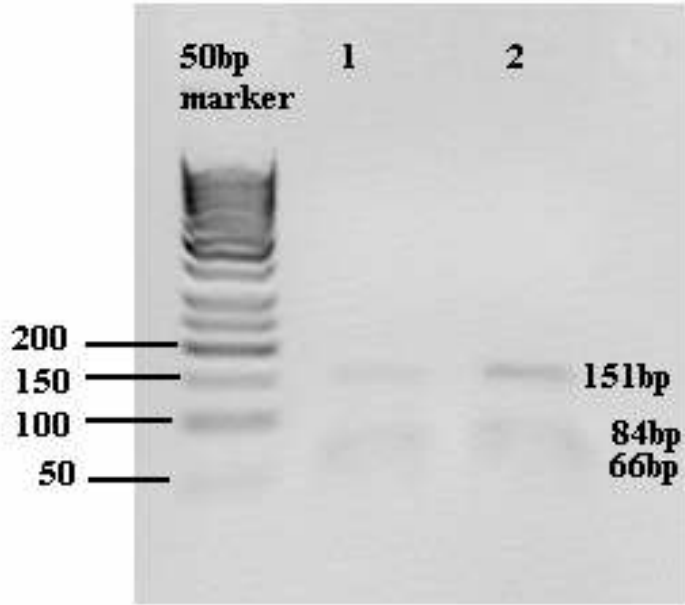
Şekil 3.18 Farklı MgCl₂ konsantrasyonları kullanılarak yapılan PCR'ın agaroz jel elektroforez görüntüsü

3.4.4. Restriksiyon Endonükleaz İle Kesim (RFLP)

PCR sonrası, tüpte bulunan DNA dışındaki diğer bileşenleri uzaklaştırmak için etanol presipitasyonu ile yıkama yapıldı. Yıkanan DNA'lar AlwI Restriksiyon enzimi kullanılarak kesim işkemi yapıldı ve %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek parça büyüklüğüne göre polimorfizmler belirlendi (Şekil 3.19 ve Şekil 3.20).



Şekil 3.19 RFLP yapılan DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü (QQ)



Şekil 3.20 RFLP yapılan DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü (QR)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Arterioskleroz, dünyanın pek çok ülkesinde ölüm ve yaşam kısıtlanmasının en önemli nedenidir. Arteriosklerozu başlatan ve ilerlemesine yol açan biyokimyasal ve hücrel olaylar tümüyle açıklanabilmiş değildir. Yaş, cinsiyet, sigara içimi, ailede iskemik kalp hastalığı öyküsü, hiperkolesterolemi, diyabetes mellitus ve hipertansiyon gibi endojen ve eksojen faktörlerin herbiri arteriosklerozu belirgin olarak artırmaktadır. Ancak bu faktörler olguların sadece bir bölümünü açıklayabilmektedir. Bireylerin arterioskleroz ile ilgili kesin riskini belirleyebilmek için konuyla ilgili başka faktörler de araştırılmaktadır [100]. Bu faktörlerden biri de arterioskleroz gelişim sürecinde LDL oksidasyonu üzerinde HDL'nin koruyucu etkisinden sorumlu paraoksonaz enzimidir.

Paraoksonaz polimorfik dağılımı büyük interetnik değişim göstermektedir. Türk popülasyonunda RR allel oldukça düşük bir oranda bulunmuştur. Trimodal dağılım için QQ, QR ve RR allellerinin frekansı sırasıyla % 48.6, % 41.0 ve % 10.4 olarak tespit edilmiştir. Düşük aktivite gösteren Q allel Avrupa, Kanada ve Amerika'da yüksek, Avusturalya, Aborigin ve Zambiya'da düşüktür [2].

PON1 enziminin aktivitesi polimorfizme bağlı olarak oldukça değişim göstermektedir. Söz konusu enzimin organizmada fizyolojik fonksiyonu tam olarak açıklanamamasına rağmen, klinik yayınlarda PON1 enzim aktivitesi ile çeşitli hastalıklar arasında ilişkinin belirlenmesine yönelik pek çok çalışmaya rastlanmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarda özellikle incelenen hastalıklar ile PON1 polimorfizmi arasında bir bağlantı olup olmadığı araştırılmıştır. Paraoksonaz gen polimorfizmi ile aterosklerotik hastalık riski arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaların çoğunda birbiriyle çelişen sonuçlar elde edilmiştir.

Ko ve arkadaşları, Tayvan'da Çinliler arasında yaptıkları çalışmada insan paraoksonaz geninin Gln-Arg 191 polimorfizmiyle KAH arasında istatistiksel olarak

anlamli ilişkiye rastlanmamıştır [101]. Japon populasyonunda yapılan çalışmalarda; Suehiro ve arkadaşları [102], 134 MI veya angina pectoris hastalarında PON1 192 Gln/Arg genotipi, Sanghera ve arkadaşları [103], Asyalı Hintliler ve Çinliler arasında PON1 55 Met/Leu polimorfizmi ile KAH arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarda anlamli ilişkiye rastlanmamıştır. Mackness ve arkadaşları, 209 Avrupa, 43 Asyalı Hint kokenine sahip toplam 252 örnekte, serum paraoksonaz PON1 55 ve PON1 192 polimorfizmleriyle paraoksonaz aktivitesi ve konsantrasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, iki populasyon arasında PON1 192 gen polimorfizmiyle istatistiksel olarak anlamli bir fark bulunmadığı ve bununla birlikte insüline bağımlı olmayan diyabetik hastalarındaki düşük PON aktivitesine de sebep olamayacağı belirtilmiştir [104]. Japon toplumunda tip 2 diabet hastalarında yapılan bir çalışmada, PON1 enziminin Q192R polimorfizmi ile hastalık arasında önemli bir bağıntı olmadığı tespit edilmiştir [54]. Karakaya ve arkadaşları, KAH sahip örneklerde serum paraoksonaz aktivite, fenotip dağılımı ile serum lipit seviyeleri ve lipoproteinlerin arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında, KAH ile kontrol grubu arasında paraoksonaz genotip dağılımı açısından anlamli bir fark olmadığını, paraoksonaz aktivitesinin düşüklüğünün KAH için risk faktörü olabileceği belirtmişlerdir [105]. Aynacıoğlu ve arkadaşları Türk populasyonunda 96 KAH ve 105 kontrol grubu örnek ile yaptıkları çalışmada Gln/Arg polimorfizmi ile KAH arasında anlamli ilişkiye rastlanmamışlardır [106].

Japonlar arasında yapılan çalışmalarda, Zama ve arkadaşları, 75 KAH hastası ve 115 EKG sonucunda normal görünen kontrol grubunda yaptıkları çalışmada, KAH ile PON polimorfizmi arasında anlamli ilişki gözlemişlerdir [107]. Kuremoto ve arkadaşları, populasyonda insan paraoksonazın R/R genotipinin lipoprotein oksidasyonuna ve KAH hastalığına karşı daha koruyucu olduğu belirtmiş ve Japon populasyonunda PON1 genotipinin lipoprotein modifikasyonunda tanımlanmasının lipoprotein oksidasyonuna karşı koruma etkileri yoluyla aterosklerosisin patogenezinde önemli rol oynayabileceği düşünülmüştür [108]. Paraoksonaz enziminin 192. kodonda Q alleli bulunduran kişilerde Parkinson hastalığı olma riskinin istatistiksel olarak ($p < 0.005$) yüksek olduğu tespit edilmiştir [55]. Alzheimer hastalarında yapılan bir çalışmada, PON1 geninin 192. polimorfizmi R allel görülme sıklığı kontrol grubuna göre oldukça düşük bulunmuştur [56].

Dilek Yavuz ve ark.'larının hipertiroidli kişilerde yaptığı çalışmada kontrol grubuna göre hipertiroidli kişilerde paraoksonaz enzim aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir [96]. Tip1 diyabetik grupta yapılan diğer bir çalışmada ise endotel fonksiyonu ve PON aktivitesi arasında pozitif korelasyon ($r=0.40$, $p<0.05$) olduğu belirlenmiştir [97].

Paraoksonaz aktivitesinin romatizmal kireçlenme ile bir ilişkisi tespit edilmiştir. Kireçlenme görülen romatizma hastalarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum paraoksonaz aktivitesinde önemli bir azalma olduğu belirlenmiştir [27].

Marja Marchesani ve ark.'larının Finlandiya popülasyonunda 835 sağlıklı ve 1569 kanserli bireylerin kan ve serumlarını kullanarak prostat kanseri üzerine yaptıkları bir çalışmada, PON1 I-102-V polimorfizmi incelenmiştir. PON1 I-102-V allelinde RR fenotipinin 6 kat daha fazla olduğu ve bu sonucun prostat kanseri riskini arttırdığı tespit edilmiştir [6].

Bizde çalışmamızda; HDL'ye bağlı olarak bulunan ve arteroskleroz gelişim sürecinde LDL'nin oksidasyonunu önleyen paraoksonaz enziminin 192. kodondaki (Gln/Arg) gen polimorfizmini inceledik. Türk popülasyonu üzerinde yapılan çalışmada lipit değerleri belirli 79 sağlıklı ve 82 tümörlü bireye ait kan ve serum örnekleri kullanılmıştır. Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesinden farklı tümörlere sahip, yaşları 28-104 arasında değişen 26 kadın ve 26-79 arasında değişen 56 erkek hasta çalışmamızda PON 192 polimorfizmi belirlemek amacıyla çalışmamıza dahil edilmiştir. Ağırıklı olarak akciğer kanseri olmak üzere çok farklı tümör tipine sahip hastalar üzerinden çalışma yürütülmüştür. Tümörlü ve sağlıklı bireylerin paraoksonaz aktivitesi ölçülerek fenotipleri belirlenmiş ve PCR-RFLP yapılarak bu sonuçlar desteklenmiştir.

Çalışmamız sonucunda; tümörlü hastalar ve sağlıklı bireylerde trimodal dağılıma göre belirlenen fenotip oranlarına göre anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. PON enzim aktivitesi, bazal ve tuzla uyarılmış aktivite (salt stimulate) değerleri ölçülerek ANOVA programı ile değerlendirme yapılmıştır. Tüm sağlıklı bireylerde

ve kanserli, bireylerde tüm lipit değerlerinin, basal ve tuz uyarılmış paraoksonaz aktivitesinin ortalama, standart sapma, minimum, maximum ve p değerine belirlenmiştir. 0.005'den küçük değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir. p değerlerine bakılarak tümörlü bireylerde kontrol gruplarına göre bazal aktivite, tuzla uyarılmış paraoksonaz aktivitesi istatistiki olarak anlamlı olarak azalmıştır.

Paraoksonaz aktivite ölçüm sonuçlarına göre, kontrol grubunu kendi içinde değerlendirdiğimizde, kontrol grubunda bazal aktivite genellikle 0-50 U ve kolesterol 200-250mg/dl, bazal paraoksonaz aktivite 0-50U ve tuz ile uyarılmış aktivite 50-100 U, bazal aktivite 0-50U arasında ve trigliserit 100-300mg/dl değerleri arasında yoğunlaştığı görülmektedir.

Tümörlü bireyler kendi içinde değerlendirildiğinde, bazal aktivite 0-30U arasında ve kolesterol değerleri 0-200mg/dl arasında genellikle yoğunlaştığı görülmektedir. Kanser hastalarının trigliserit düzeyinin 0-250mg/dl ve bazal aktivitenin 0-30U arasında değiştiği belirlenmiştir. Tuzla uyarılmış paraoksonazın 0-40U ile ve bazal aktivite 0-30U arasında odaklandığı da görülebilir. Ayrıca kanserli hastalarda görülen bazal aktivite ile tuzla uyarılmış aktiveler arasında pozitif bir korelasyon görülmektedir ($R=0,581$). HDL ve bazal aktivite arasında beklenildiği gibi doğru orantı bir korelasyon da görülmektedir ($R=0,102$). Hastaların tuzla uyarılmış aktiveleri 0-50 U arasında değiştiği, HDL lerinde 0-60mg/dl arasında değiştiği görülmektedir.

Bununla birlikte PCR ve RFLP teknikleri kullanılarak da agaroz jel elektroforezi görüntüleri elde edilmiştir. Bunların sonucu olarak, tümörlü bireylerde QQ, QR, RR allellerinin frekansları sırasıyla %50, %26 ve % 24, sağlıklı bireylerde % 65, %31, %4 ($p<0,001$) olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre tümörlü bireylerde kontrol grubuna oranla RR allellerinin frekansı anlamlı derecede yüksektir.

Çalışmamızda, HDL'ye bağlı olarak bulunan ve lipit peroksidleri hidroliz eden bir antioksidant enzim olarak tanınan paraoksonaz enzim aktivitesi lipit profilleri karşılaştırıldığında, tümörlü bireylerde en fazla HDL de olmak üzere trigliserit ve

kolestrol değerlerinde orta dereceli pozitif bir korelasyon bulunmuştur. HDL nin paraoksonaz enzim aktivitesi arasındaki göstermiş olduğu pozitif korelasyon, bu enzimin HDL ye bağlı olmasından kaynaklanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. M. Ferit Gürsu, M.Ö., Funda Gülcü, "Koroner Kalp Hastaları İle Etiyolojik Risk Faktörlerini Taşıyan Bireylerde Paraoksonaz Aktiviteleri ve Fenotiplerinin Araştırılması". *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 17(4) (2003) 237-244..
2. E. Azarsız, E.Y.S., "Paraoksonaz ve Klinik Önemi". *Türk Biyokimya Dergisi*, 25 (3) ,(2000),109-119
3. P.N. Durrington, B.M., M.I. Mackness, "Paraoxonase and Atherosclerosis". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 21, (2001), 473-480
4. Carey J. Ng, D.M.S., Susan Y. Hama, Natividad Villa, Mohamad Navab, Srinivasa T. Reddy, "The Paraoxonase Gene Family and Atherosclerosis". *Free Radical Biology & Medicine*, 38, (2005), 153– 163
5. Michael I. Mackness, B.M., Paul N. Durrington, "Paraoxonase and coronary heart disease". *Atherosclerosis Supplements*, 3, (2000), 49-55
6. Marja Marchesani, A.H., Tomi-Pekka Tuomainen, Jari Kaikkonen, Eero Pukkala, Pekka Uimari, Eija Seppä-la, Mika Matikainen, Olli-P. Kallioniemi, Johanna Schleutker, Terho Lehtimäki, Jukka T. Salonen, "New Paraoxonase 1 Polymorphism I102V and the Risk of Prostate Cancer in Finnish Men". *Journal of the National Cancer Institute*, 95(11), (2003), 812-818
7. Uriel, A., "Characterisation des cholinesterases et d'autres esterases carboxylique apres electrophorese et immunoelectrophorese en gelose, I; applications a l'etude des esterases du serum humain normal". *Am Insit Pasteur*, (1961),101-104
8. Michael I. Mackness , B., Paul N. Durrington, Philip W. Connelly and Robert A. Hegele, "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins". *Current Opinion in Lipidology*, 7, (1996), 69-76
9. Erdem, M.S.T.İ. "ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü (Stemi) Hastalarda İnsan Paraoksonase Geni Met-Leu/55 Polimorfizmi." Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, İstanbul, (2004)
10. Mackness B., D.P.N., Mackness M.I, "Human Serum Paraoxonase". *Gene Pharmacy*, 31(3) ,(1998), 329-36

11. Kirsty S. Robertson, Emma Hawe,¹ George J. Miller, Philippa J. Talmud, Steve E. Humphries, "Human Paraoxonase Gene Cluster Polymorphisms As Predictors of Coronary Heart Disease Risk in The Prospective Northwick Park Heart Study II". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1639, (2003), 203–212,
12. I. Draganov , B.N.L.D., "Pharmacogenetics of Paraoxonases: A Brief Review". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 369, (2004), 78–88
13. Liang, H.-L.L.D.-P.L.C.-C., "Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases." *J Mol Med*, 81, (2003), 766–779
14. Bert N. La Du, M.A., Scott Billecke, Mohamad Navab, Sergio Primo-Parmo, Robert C. Sorenson, Theodore J. Standiford, "On The Physiological Role(s) of The Paraoxonases". *Chemico-Biological Interactions*, (1999), 379–388
15. Michal Harel, A.A., Leonid Gaidukov, Boris Brumshtein, Olga Kherkxonsky, Ran Meged, Hay Dvir, Raimond B G Ravelli, Andrew McCarthy, Lilly Toker, Israel Silman, Joel L Susman, Dan S Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes". *Nature Structural & Molecular Biology*, (2004), 412-419
16. Bharti Mackness, P.N.D., Michael I. Mackness, "The Paraoxonase Gene Family and Coronary Heart Disease". *Current Opinion in Lipidology*, 13, (2002), 357-362
17. Gan, K.N., Smolen A., Eckerson HW., La Du BN., "Purification of Human Serum Paraoksonase/Arylesterase, Evidence for One Esterase Catalyzing Both Activities". *Drug Metab. Dispos.*, 19 (1) , (1991), 100-6
18. Jawad, Z., Paoli, M., "Noval Sequences Propel Familiar Folds". *Structure*, 10, (2002), 447-454
19. Kuo C.L. & La Du, B.N., Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity. *Drug Metab. Dispos.*, 26, (1998), 653-60
20. Scharff, E.I., Koepke, J., Fritzch, G., Lucke, C.&Ruterjans, H., "Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*". *Structure*, 9, (2001), 493-502
21. Fokine, A.e.a., "Direct Phasing at Low Resolution of A Protein Copurified With Human Paraoxonase (PON1)". *Acta Crystallogr. D.*, 59, (2003), 2083-87
22. Josse, D.e.a., "Oligometric States of The Detergent-Solubilized Human Serum Paraoxonase (PON1)". *J. Biol. Chem.*, 277, (2002), 33386-97

23. Du, I.D.B.N.L., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review." *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 369, (2004), 78–88
24. Ahoroni, A.e.a., "Directed Evolution of Mammalian Paraoxonases PON1 and PON3 for Bacterial Expression and Catalytic Specialization". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, (2004), 482-487
25. Josse, D.e.a., "Identification of Residues Essential For Human Paraoxonases (PON1) Arylesterase/Organophosphatase Activities". *Biochemistry*, 38, (1999), 2816-25
26. Jonas, A., "Lecithin cholesterol Acyltransferase". *Biochim. Biophys. Acta*, 1529, (2000), 245-256
27. Sinan, M.S.T.S., "İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin (PON1) Expressiyonu, Saflaştırılması ve Bazı İlaçların Enzim Üzerine Etkilerinin Araştırılması." Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, (2005).
28. Lucio G. Costa, T.B.C., Gail P. Jarvik, and and C.E. Furlong, "Functional Genomics of the paraoxonase (PON1) Polymorphisms: Effects on Pesticide Sensitivity, Cardiovascular Disease, and Drug Metabolism". *Annu. Rev. Med.*, 54,(2003), 371–92
29. Geldmacher, M., Hommel, G., Dumbach,J., "On The Genetics of The Human Paraoxonase". *Hum. Genet.*, 50(3) , (1979), 313-326
30. Playfer, J., Eze, LC., Bullen, MF., Evans, AP, "Genetic Polimorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity". *J. Med. Genet.*, 13, (1976), 337-342
31. Humbert, R., Adler, DA., Disteché, CM., Hasset, C., Omiecinski, CJ., Furlong, CE., "The Molecular Basis of The Human Serum Paraoxonase Activity Polymorphism". *Nat. Genet.*, 3(1) , (1993), 73-76
32. Michael Aviram, E.H., Jacob Vaya, Saeed Mahmood, Simcha Milo, Aaron Hoffman, Scott Billicke, Dragomir Draganov, Mira Rosenblat, "Human Serum Paraoxonases (PON1) Q and R Selectively Decrease Lipid Peroxides in Human Coronary and Carotid Atherosclerotic Lesions". *Circulation*, 101, (2000), 2510-2517
33. Aynacıoğlu, A., Cascorbi., Mrozkiewicz, PM., Nacak, M., Tapanyığıt, EE., Roots, I., "Paraoxonase 1 Mutations in A Turkish Population". *Toxicology and Applied Pharmacology*, 157, (1999), 174-177
34. Eckerson, H., Romson, J., Wyte, C.,La Du, BN., "The Human Serum Paraoxonase Polymorphism: *İdentification of Phenotypes by Their Response to Salts*". *Am J Hum. Genet.*, 35(2) ,(1983), 214-227

35. Brophy VH, J.R., Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE, "Effects of 5' Regulatory-Region Polymorphisms on Paraoxonase-Gene (PON1) Expression". *Am J Hum. Genet.*, 68, (2001), 1428–1436
36. JAMES, S.P.D.a.R.W., "Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1." *Clinical Science*, 107, (2004), 435–447
37. Leviev, I., James, R. W., "Promoter Polymorphisms of the Human Paraoxonase PON1 Gene and Serum Paraoxonase Activities and Concentrations". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20, (2000), 516-521
38. Deakin, S., Leviev, I., Brulhart Meynet, M. C., James, R. W., "Paraoxonase-1 Promoter Haplotypes and Serum Paraoxonase: A Predominant Role in vivo for Polymorphic Position -107 Implicating The Transcription Factor Sp1". *Biochem. J.*, (2003), 377.
39. Deakin, S., Leviev, I., Guernier, S. and James, R. W., "Simvastatin Modulates Expression of The PON1 Gene and Increases Serum Paraoxonase: A Role for Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2". *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, 23, (2003), 2083–2089
40. Gou'edard, C., Koum-Besson, N., Barouki, R., Morel, Y., "Opposite Regulation of The Human Paraoxonase-1 Gene PON-1 by Fenofibrate and Statins". *Mol. Pharmacol.*, 63, (2003), 945–956
41. Osei-Hyiaman D, H.L., Mengbai F, Zhiyin R, Zhiming Z, Kano K, "Coronary artery disease risk in Chinese type 2 diabetics: is there a role for paraxonase 1 gene (Q192R) polymorphism?" *Eur J Endocrinol*, 144, (2001), 639-644
42. Ito T, Y.H., Yoshimura M, Nakamura S, Nakayama M, Shimasaki Y, Harada E, Mizuno Y, Kawano H, Ogawa H, "Paraoxonase Gene Gln192Arg (Q192R) Polymorphism Is Associated With Coronary Artery Spasm". *Hum Genet*, 110, (2002), 89-94.
43. Zhang Z, Z.L., Yepes M, Jiang Q, Li Q, Arniego P, Coleman TA, Lawrence DA, Chopp M, "Adjuvant Treatment With Neuroserpin Increases The Therapeutic Window for Tissue-Type Plasminogen Activator Administration in A Rat Model of Embolic Stroke". *Circulation*, 106, (2002), 740-745
44. Cherry N, M.M., Durrington P, Povey A, Dippnall M, Smith T, Mackness B, "Paraoxonase (PON1) Polymorphisms in Farmers Attributing Ill Health to Sheep Dip". *Lancet*, 359, (2002), 763-764
45. J, W., "Paraoxonase polymorphisms and organophosphates." *Lancet*, 360, (2002), 802-803

46. Allebrandt KV, S.R., Chautard-Freire-Maia EA, "Variability of The Paraoxonase Gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians". *Toxicology and Applied Pharmacology*, 180, (2002), 151-156
47. Hegele, R.A., "Paraoxonase Genes and Disease". *Ann. Med*, 31, (1999),217-224
48. Leus FR, Z.M., Kastelein JJ, Voorbij HA, "PON2 Gene Variants Are Associated With Clinical Manifestations of Cardiovascular Disease in Familial Hypercholesterolemia Patients". *Atherosclerosis*, 154, (2001),641-49
49. Voetsch B, B.K., Damasceno BP, Siqueira LH, Loscalzo, J, "Paraoxonase 192 Gln!Arg polymorphism: an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults". *Stroke*, 33, (2002), 1459-1464
50. Yamada M, S.N., Itoh Y, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H, "No association of paraoxonase genotype or atherosclerosis with cerebral amyloid angiopathy". *Stroke*, 33, (2002), 896-900
51. Arca M, O.D., Montali A, Campagna F, Mangieri E, Tanzilli G, Campa PP, Ricci G, Verna R, Pannitteri G, "PON1 L55M Polymorphism Is Not A Predictor of Coronary Atherosclerosis Either Alone or in Combination With Q192R Polymorphism in An Italian Population". *Eur J Clin Invest*, 32, (2002), 9-15
52. Sangvanich P, M.B., Gaskell SJ, Durrington P, Mackness M, "The effect of high-density lipoproteins on the formation of lipid/protein conjugates during in vitro oxidation of low-density lipoprotein". *Biochem Biophys Res Commun*, 300, (2003), 501-506
53. Malin R, K.J., Janatuinen T, Laaksonen R, Vesalainen R, Nuutila P, Jokela H, Laakso J, Jaakkola O, Solakivi T, Lehtimaki T, "Paraoxonase gene polymorphisms and coronary reactivity in young healthy men". *J Mol Med*, 79, (2001), 449-458
54. Ikeda T, O.H., Hasegawa G, Nakamura N, Yoshikawa T, Imamura Y, Koizumi K, Kinoshita S, "Paraoxonase Gene Polymorphisms And PlasmaOoxidized Low-Density Lipoprotein Level As Possible Risk Factors For Exudative Age-Related Macular Degeneration". *Am J Ophthalmol*, 132, (2001), 191-195
55. Konda I, Y.M., "Genetic Polymorphism of Paraoxonase 1 (PON1) and Susceptibility to Parkinson's Disease". *Brain Res*, 806, (1998), 271-273
56. Scacchi R, G.G., Martini MC, Broggio E, Vilardo T, Corbo RM, "Different pattern of association of paraoxonase Gln192-Arg polymorphism with sporadic late-onset Alzheimer's disease and coronary artery disease". *Neurosci Lett*, 339, (1998), 17-20

57. Lund-Katz, S., Liu, L.J., Thuahnai, S.T.& Philips, M.C., "High Density Lipoprotein Structure". *Front. Biosci.*, 8, (1998), D1044-D1054
58. Navab, M.e.a., "High density associated enzymes:their role in vascular biology". *Curr. Opin. Lipidol*, 9, (1998), 449-456
59. Borhani, D.W., Rogers, "Crystal Structure Oftruncated Human Apolipoprotein A-I Suggests A Lipid Bound Conformation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, (1997), 12291-96
60. Blatter Garin, M.-C., Abbot, C., Messmer, S., Mackness, M. I., Durrington, P., Pometta, D., James, R. W., "Quantification of Human Serum Paraoxonase by Enzyme Linked Immunoassay: Population Differences in Protein Concentrations". *Biochem. J.*, 304, (1994), 549–554
61. Feingold, K.R., Memon, R. A., Moser, A. H., Grunfeld, C., "Paraoxonase Activity in The Serum and Hepatic mRNA Levels Decrease During The Acute Phase Response". *Atherosclerosis*, 139, (1998), 307-315
62. Van Lenten, B.J., Wagner, A. C., Nayak, D. P., Hama, S, Navab, M., Fogelman, A. M., "High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection". *Circulation*, 103(2001), 2283-88
63. Cabana, V.G., Reardon, C. A., Feng, N., Neath, S., Lukens, J., Getz, G. S., "Serum Paraoxonase: Effect of The Apolipoprotein Composition of HDL and The Acute Phase Response". *J. Lipid Res.*, 44, (2003), 780-792
64. Martoglio, B.D., B., "Signal sequences: more than just greasy peptides". *Trends Cell Biol.*, 8, (1998), 41041–41045
65. Hassett, C., Richter, R. J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J. J., Omiecinski, C. J., Furlong, C., "Characterisation of cDNA Clones Encoding Rabbit and Human Serum Paraoxonase: The Mature Protein Retains Its Signal Sequence". *Biochemistry*, 30, (1991), 10141– 10149
66. Deakin, S., Leviev, I., Gomasaschi, M., Calabresi, L., Franceschini, G., James, R. W., "Enzymatically Active Paraoxonase- 1 Is Located at The External Membrane of Producing Cells and Released by A High Affinity, Saturable, Desorption Mechanism". *J. Biol. Chem.*, 277, (2002), 4301– 4308
67. Sorenson, R.C.B., C. L.; Aviram, M.; Hsu, C.; Billecke, S.; La Du, B. N., "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, (1999), 2214– 2225

68. Oda, M.N.B., J. K.; Berger, T.; Forte, T. M., "Cysteine substitutions in apolipoprotein A-I primary structure modulate paraoxonase activity". *Biochemistry*, 40, (2001), 1710– 1718
69. La Du B. N., A.M., Billecke S.,Navab M.,Primo Parmo S.,Sorenson R.C.,Standiford T.J, "On the Physiological Role(s) of The Paraoxonase". *Chemice-Biological Interactions*, 119-120, (1999), 379-388
70. Lucio G. Costaa, T.B.C., Annabella Vitalone, Clement E. Furlong, "Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity." *Clinica Chimica Acta*, 352, (2005), 37–47
71. Joanne Hughes, A.C., Carol Courage, "A Review of The Effects of Low-Level Exposure to Organophosphate Pesticides on Fetal and Childhood Health". *Institute for Environment and Health*, , (2002), 1-72
72. BN, L.D., "Human Serum Paraoxonase/Arylesterase. In: Kalow W (ed) Genetic Factors Influencing The Metabolism of Foreign Compounds.(International encyclopedia of pharmacology and therapeutics)". *Pergamon Press, New York*, , (2002), 51-91
73. Sorenson RC, P.-P.S., Camper SA, La Du BN, "The genetic mapping and gene structure of mouse paraoxonase/arylesterase". *Genomics*, 30, (1995a), 431-38
74. Michael I.Mackness , B., Paul N.Durrington, Philip W.Connelly and Robert A.Hegele, "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins". *Current Opinion in Lipidology*, 7,(1996), 69-76
75. H, J., Calcium-Dependent Human Serum Homocysteine Thiolactone Hydrolase.A Protective Mechanism Against Protein N-homocysteinylaton". *J Biol Chem*, 275, (2000), 3957-62
76. Billecke S, D.D., Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, La Du BN, "Human Serum Paraoxonase (PON1) Isozymes Q and R Hydrolyze Lactones and Cyclic Carbonate Esters". *Drug Metab. Dispos.*, 28, (2000), 1335-42
77. M.I. Mackness, S.A., B. Mackness, P.N. Durrington,, "Alloenzymes of Paraoxonase and Effectiveness of High-density Lipoproteins in Protecting Low-density Lipoprotein Against Lipid Peroxidation." *Lancet*, 349, (1997), 851-852
78. Ildiko Seres, G.P., Elaine Deschene, Tamas Fulop Jr., Abdelouahed Khalil, "Study of Factors Influencing The Decreased HDL Associated PON1 Activity With Aging". *Experimental Gerontology*, 39, (2004), 59-66

79. James, R.W., Leviev, I. and Righetti, A., "Smoking Is Associated With Reduced Serum Paraoxonase Activity And Concentration in Coronary Artery Disease Patients". *Circulation*, 101, (2000), 2252-57
80. Van der Gaag, M.S., van Tol, A., Scheek, L. M. et al., "Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men". *Atherosclerosis*, 147, (1999), 405-10
81. Primo-Parmo, S.L.S., R. C.; Teiber, J.; La Du, B. N, "The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family". *Genomics*, 33, (1996), 498-507
82. Ng, C.J., Wadleigh, D. J., Gangopadhyay, A., Hama, S., Grijalva, V. R., Navab, M., Fogelman, A. M., Reddy, S. T., " Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell mediated oxidative modification of low density lipoprotein". *J. Biol. Chem.*, 276, (2001), 44444-49
83. Hegele, R.A., Harris, S. B., Connelly, P. W., Hanley, A. J., Tsui, L. C., Zinman, B., Scherer, S. W., "Genetic Variation in Paraoxonase- 2 Is Associated With Variation in Plasma Lipoproteins in Canadian Oji-Cree". *Clin. Genet.*, 54, (1998), 394-99
84. Chen, Q., Reis, S. E., Kammerer, C. M., McNamara, D. M., Holubkov, R., Sharaf, B. L., Sopko, G., Pauly, D. F., Merz, C. N., Kamboh, M. I, "Association Between The Severity of Angiographic Coronary Artery Disease and Paraoxonase Gene Polymorphisms in The National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study". *Am. J. Hum. Genet.*, 72 , (2003), 13-22
85. Shi, J.Z., S., Tang, M, Liu, X., Li, T., Han, H., Wang, Y., Guo, Y., Zhao, J., Li, H., Ma, C, "Possible association between Cys311Ser polymorphism of paraoxonase 2 gene and late-onset Alzheimer's disease in Chinese". *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 120, (2004), 201-204
86. Yamada, Y.A., F.; Niino, N.; Miki, T.; Shimokata, H., "Association of polymorphisms of paraoxonase 1 and 2 genes, alone or in combination, with bone mineral density in community-dwelling Japanese". *J. Hum. Genet.*, 48 , (2003), 469-475
87. Rosenblat, M., Draganov, D., Watson, C. E., Bisgaier, C. L., La Du, B. N., Aviram, M., "Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 23, (2003), 468- 474
88. Campo, S., Sardo, A. M., Campo, G. M., Avenoso, A., Castaldo, M., D'Ascola, A., Giunta, E., Calatroni, A., Saitta, A., "Identification of

- Paraoxonase 3 Gene (PON3) Missense Mutations in A Population of Southern Italy". *Mutat. Res.*, 546, (2004), 75-80
89. Srinivasa T. Reddy, D.J.W., Victor Grijalva, Carey Ng, Susan Hama, Aditya Gangopadhyay, Diana M. Shih, Aldons J. Lulis, Mohamad Navab, Alan M. Fogelman, "Human Paraoxonase-3 Is an HDL-Associated Enzyme With Biological Activity Similar to Paraoxonase-1 Protein but Is Not Regulated by Oxidized Lipids". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 21, (2001), 542-547
90. Brennan ML, A.M., Shih DM, et al., "Increased Atherosclerosis in Myeloperoxidase-Deficient mice". *J Clin Invest*, 107, (2001), 419-30
91. www.kardiyo.net.
92. <http://hastarehberi.com/kardiyoloji/kalp3/arteriyoskleroz.htm>.
93. www.ahmetalpman.com.
94. James R, L.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*, 29, (2000).
95. Paragh G, B.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.*, 252(2), (2002), 63-67
96. Dilek Yavuz , Y.i.A., Meral Yüksel, Hasan Aydın, Oğuzhan Deyneli, Sema Akalın, "S002-Hipertiroidide Serum Paraoksonaz Aktivitesi Azalmaktadır". *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism.*, 7(1) , (2003).
97. Dilek Yavuz, O.D., Meral Yüksel, Ahmet Toprak, Hasan Aydın, Sema Akalın, "P022-TiP 1 Diyabetik Hastalarda Serum Paraoksonaz Aktivitesinin Endotel Fonksiyonu ile İlişkisi". *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, 7(1) , (2003).
98. Nicole Helbecque, D.C., Vale´rie Codron, Claudine Berr, Philippe Amouyel, "Paraoxonase 1 gene polymorphisms and dementia in humans". *Neuroscience Letters*, 358, (2004), 41-44
99. Juretic, D., "Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study." *Croat Med J.* 42(2) , (2001), 146-50
100. Çamur, M.S.T.N.K., "Koroner Ateroskleroz ve Myokard İnfarktüsünde Ortalama Trombosit Hacminin Öngörüsül Değeri." Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 3. İç Hastalıkları Kliniği, İstanbul, (2004).
101. Ko YL, K.Y., Wang SM, Hsu LA, Chang CJ, Chu PH, Cheng NJ, Chen WJ, Chiang CW, Lee YS., "The Gln-Arg 191 polymorphism of the human

- paraoxonase gene is not associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan." *Atherosclerosis*, 141 (2), (1998), 259-64
102. Suehiro T, I.Y., Ohsaki F, Arie K, Kumon Y, Hashimoto K., "Relationships between polymorphisms of the human serum paraoxonase gene and insulin sensitivity in Japanese patients with type 2 diabetes." *Diabetes Res Clin Pract.*, 60(2), (2003), 79-85,
 103. Sanghera DK, S.N., Kamboh MI., "The codon 55 polymorphism in the paraoxonase 1 gene is not associated with the risk of coronary heart disease in Asian Indians and Chinese." *Atherosclerosis*, 136(2), (1998), 217-23
 104. Mackness B, M.M., Arrol S, Turkie W, Durrington PN., "Effect of the serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification" *FEBS Lett*, 423, (1998), 57-60
 105. Karakaya A, I.S., Kural T, Kose SK, Karakaya AE., "Serum paraoxonase activity and phenotype distribution in Turkish subjects with coronary heart disease and its relationship to serum lipids and lipoproteins." *Chem Biol Interact.*, 118(3) , (1999), 193-200
 106. Aynacioglu AS, K.Y., "The human paraoxonase Gln-Arg192 (Q/R) polymorphism in turkish patients with coronary artery disease.", *Int J Cardiol.*, 74(1) , (2000), 33-37
 107. Zama T, M.M., Matsubara Y, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, Watanabe G, Ishikawa K, Ikeda Y. A, "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.*, 17(12) , (1997), 3565-9
 108. Kuremoto K, W.Y., Ohmura H, Shimada K, Mokuno H, Daida H., "R/R genotype of human paraoxonase (PON1) is more protective against lipoprotein oxidation and coronary artery disease in Japanese subjects." *Atheroscler Thromb.*, 10(2), (2003), 85-92