



PARAOXONASE

TANIMA, ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME REHBERİ



2013



KAPSAM

1. GENEL BAKIŞ
2. PARAOXONASE ENZİMİ
3. PARAOXONASE'IN HASTALIKLARLA İLİŞKİSİ
4. PARAOXONASE ÖLÇÜMÜ
5. REL ASSAY PARAOXONASE TEST KITI
 - 5.1. Kit Bileşenleri
 - 5.2. Testin Reaksiyon İlkesi
 - 5.3. Kullanılacak Numuneler
 - 5.3.1.Yumuşak Dokudan Homojenat Hazırlama Prosedürü
 - 5.4. Hayvan Deneyi
 - 5.5. Saklama
 - 5.5.1.Numunelerin Saklanması
 - 5.5.2.Kit'in Saklanması
 - 5.6. Uyarı Ve Önlemler
6. MANUEL ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ
 - 6.1. Çalışma Adımları
 - 6.2. Hesaplama
 - 6.3. Açıklamalar
7. OTOMATİK ANALİZÖRDE ÇALIŞMA
 - 7.1. Reaksiyon Kinetikleri Ve Performans
 - 7.2. Testin %Cv Değerleri
8. PARAOXONASE TESTİ DEĞERLENDİRMESİ
9. PON1 192 Q/R POLİMORFİZM (FENOTİPLEME)
 - 9.1. Fenotipleme Çalışması
10. KAYNAKÇA



1. GENEL BAKIŞ

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

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

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

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

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

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

Ateroskleroz; koroner arterlerde çok yavaş gelişen ve ancak uzun yıllar geçtikten sonra değişik derecelerde kalıcı darlıklara neden olan bir hastalıktır. KAH'nın patogenezesinden yalnız başına ateroskleroz sorumlu değildir. Ani olarak gelişen dinamik koroner olayların da (koroner arter spazmi, koroner arter trombozu) önemli rol oynadıkları anlaşılmaktadır. Kalıcı olsun dinamik olsun, olayların başlama noktası koroner arterlerde bölgesel olarak gelişen damar endotel fonksiyon bozukluğu ve/veya endotel zedelenmesidir (1).



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

2. PARAOXONASE ENZİMİ

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

Paraoksonaz aktivitesi çevresel faktörlerden etkilenebilmekte ve popülasyonlara göre farklılık göstermektedir (16-20). Literatür taraması sırasında, farklı ülkelerde ve çeşitli hastalıklarda serum PON1 aktivitelerinin araştırıldığı görülmektedir.

3. PARAOXONASE'IN HASTALIKLARLA İLİŞKİSİ

Hipergliseminin oksidatif stres ve ateroskleroza zemin hazırladığı düşünülürse, DM'li olgularda serum PON1'in rolü ortaya çıkar. PON1 192RR ve PON1 55LL genotipleri IDDM'li (independent Diabetes mellitus) olgularda daha sık izlenmiştir. Ancak yapılan bir çalışmada DM, hiperkolesterolemi, böbrek yetmezliği gibi KAH ile ilişkisi olduğu bilinen hastalıklarda düşük serum PON1 aktivitesinin genotipten bağımsız olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Diyabetik retinopati ve hipertansiyon gelişen olgularda izlenen düşük serum PON1 aktivitesi, lipid peroksidasyonuna artmış yatkınlıktan kaynaklanmaktadır (22).

Lipid peroksidasyonu ve oksidatif hasar etkisi ile gelişen nöronal dejenerasyon izlenen Alzheimer hastalığının ateroskleroz ile ilişkisi bilindiğinden PON1 polimorfizmi ile ilişkisi incelenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamamıştır (23). Hepatit C enfeksiyonlu hasta grubunda yapılan bir çalışmada paraoksonaz aktivitesi düşük bulunmuş ve bunlarda PON1 192RR polimorfizminin daha yüksek olduğu tespit edilmiş (24). Düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlara yüksek miktarda C ve E vitamini verilmesiyle PON1'in polimorfizm de ve doğum ağırlığında değişiklikler saptanmıştır.(25).



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

Ateroskleroz riski bulunan üremik renal transplantlı olgularda düşük PON1/HDL ve PON1/apoAI oranları izlenerek bu olgularda HDL'nin antioksidan kapasitesinin azaldığı düşünülmüştür. Sporadik idiyopatik Parkinson olgularında PON1 ile metabolize olan çevresel nörotoksinlerin yaşla birlikte nörodejenerasyondan sorumlu tutulabileceği ve B allelin Parkinson hastalığına genetik yatkınlık oluşturabileceği ileri sürülmüştür.(26). Hiperhomosisteinemili autism olan çocuklarda paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktiviteleri düşük bulunmuş ve bunlarda metilasyon reaksiyonlarındaki bozukluğa bağlı olarak nörotransmitterlerin yapısının bozulabileceği bildirilmiştir (27). Lipid oksidasyonuna predispozan bir hastalık olduğu öne sürülen hipertroidili hastalarda paroksonaz aktivitesi düşük bulunmuştur (28).

Antikardiolipin antikoları pozitif bulunan bir grup hastada mmLDL'ye karşı otoantikoların arttığı, PON1 aktivitesinin belirgin olarak düştüğü ve arteriyel tromboz geliştirme riski yüksek olan R genotipinin de artma eğiliminde olduğu izlenmiştir (29). Sistemik amiloidozda düşük PON1 aktivitesi bildirilmiştir.

Plazma lipoprotein düzeylerinin normalden farklı olduğu balık gözü sendromunda HDL kolesterol'ün plazma konsantrasyonunun %90 oranında, PON1 aktivitesinin ise %89 düzeyinde azaldığı gösterilmiştir. Diğer yandan bir başka lipoprotein metabolizma hastalığı olan Tangier hastalığında ise PON1 enzim aktivitesi tayin edilememiştir (30,31). Pilor stenozlu infantlar yüksek PON1 aktivitesine sahiptirler. Pilor stenozu operasyonla düzeltildikten bir hafta sonra enteral beslenmenin başladığı zamana kadar yükseklik devam eder (32). Van Lenten ve arkadaşları enflamasyonlu tavşan modellerinde akut faz olarak HDL, amiloid A ve seruloplazminin arttığını diğer taraftan apo A1 ve PON1'in ise dramatik olarak azaldığını göstermişlerdir (33).

Bazı deneysel çalışmalarda serum PON1 aktivitesinde değişikliklere rastlanmıştır; yapılan bir çalışmada inflamatuvar cevabın bir parçası olarak düşünülmekte ve ilginç olarak PON1 aktivitesinin kronik olarak azalmasının, sadece aterosklerozu artırmakla kalmayıp, aynı zamanda akut inflamatuvar şartlara göre daha fazla vücutta kuvvetten düşmeye neden olduğu görülmüştür (34).

Sigara gibi çevresel faktörlerin PON1 aktivitesini ve konsantrasyonunu baskılayarak enzimin etkinliğini değiştirebilir. PON1'in paraoksanase aktivitesinin hormon replasman tedavileri ile arttığı gösterilmiştir (21).

Paraoksonaz enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunduğu prostat kanserli bir çalışmada PON1 geninin 102. kodon'unda yeni bir polimorfizm bulunduğunu ve bu polimorfizm 102'de İzolösinin Valin ile yer değiştirmesiyle meydana geldiğini, bu polimorfizm'in prostat kanserinin nedenlerinden biri olabileceğini ileri sürülmektedir (35).



4. PARAOXONASE ÖLÇÜMÜ

Paraoxonase enzim aktivitesi ölçümü için geçmiş yıllarda çeşitli yöntemler geliştirilmeye çalışılmışsa da pek bir başarı elde edilememiştir. Furlong (54,55) ve Mackness' in (56) metotları en çok kullanılan metotlar olmasına rağmen uygulanadaki zorluklar, ve analitik hatalardan dolayı yetersiz kalmıştır. Substrat olarak kullanılan paraoxonun çözelti hazırlanmasındaki zorluklar, spontane hidrolizi ve çok fazla derecede toksik olmasından dolayı kullanımı ile ilgili ciddi handikaplar vardır.

Tüm bu sıkıntılardan dolayı yeni, güvenilir, hızlı, standart ve otomatik bir kite olan ihtiyaçlar için Rel Assay Paraoxonase Kiti 2007 de Dünya bilim insanlarının kullanımına sunuldu.

Rel Assay Paraoxonase Test Kiti gerek manual gerekse otomatik olarak kullanılabilmesi açısından oldukça büyük bir yenilik getirmiştir. Ayrıca kitin likit olması, kullanıma hazır olması ve uzun ömürlü olmasından dolayı tüm dünyada ciddi bir talep görmesini sağlamıştır.

Rel Assay Paraoxonase kiti ile ölçüm yapmak için bir spektrofotometre veya plate reader veya otomatik biyokimya analizörü kullanabilirsiniz. Ayrıca eğer isterseniz numunelerinizi Rel Assay Laboratuvarına göndererek Paraoxonase Enzim aktivitesi tayinini ölçtürebilirsiniz. Bu işlem için support@relassay.com adresine yazabilir veya +90 342 230 37 52 nolu telefonu arayabilirsiniz.

5. REL ASSAY PARAOXONASE TEST KITI

5.1. Kit Bileşenleri

Tüm reaktifler kullanıma hazırdır.

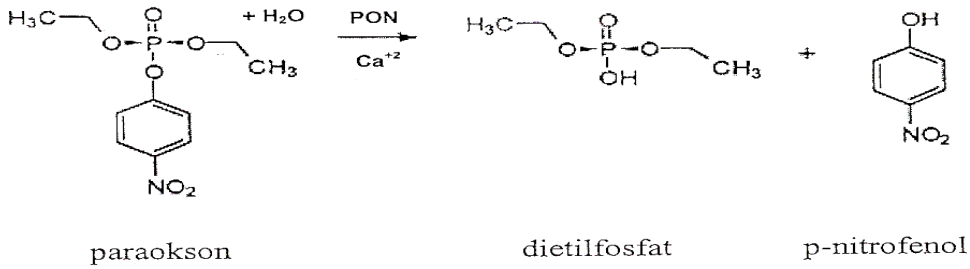
- | | | |
|--------------|---------------|---------------------|
| • Reaktif 1 | (Tampon) | :50 ml |
| • Reaktif 2 | (Substrat) | :5ml |
| • Kalibratör | (Lyophilized) | :1 vial (Opsiyonel) |

Normal şartlarda kit içerisinde Kalibratör bulunmamaktadır. Kit faktörle çalıştığından dolayı kalibratör kullanmadan aşağıda belirtilecek olan çalışma prosedürlerinde verilen faktör değerini kullanarak ölçüm yapabilirsiniz. Fakat yine de kalibratör isterseniz insan serumundan üretilmiş Rel Assay paraoxonase kalibratörünü siparişle birlikte belirtmeniz gerekmektedir. Liyofilize olarak elinize ulaşan bu materyali şişe üzerinde belirtilen hacimde deiyonize su ilave ederek hazırlayıp güvenle kullanabilirsiniz.



5.2. Testin Reaksiyon İlkesi

Örnekteki paraoksonaz enzimi reaksiyon ortamındaki paraokson substratını hidroliz eder ve açığa çıkan ürünün absorbans artışı, absorbans spektrumuna uygun dalga boyunda kinetik olarak izlenir. Nonenzimatik hidroliz değeri, örnek değerinden çıkarılarak enzimatik aktiviteye ait net değerler hesaplanır. Sonuçlar dakikada bir mikromolar substratın hidrolizine eşit olan Ünite/Litre cinsinden ifade edilir.



5.3. Kullanılacak Numuneler

Serum, heparinli plazma, semen plazması hiçbir işleme tabi tutulmadan direkt olarak kullanılacak numune çeşitleridir. Hücre kültürü ve çeşitli dokular da numune olarak kullanılabilir. Fakat bunlar homojenize edilmelidirler. Bu prosedür aşağıda gösterildiği gibidir. Hemolizli, lipemik ve hiperbilirubinemi serumlardan ve kalsiyum bağlayan antikoagülan kullanılan plazmalardan kaçınılmalıdır.

Araştırmalarda sıkça kullanılan Karaciğer, böbrek, beyin vb. gibi yumuşak dokular numune olarak kullanılacaksa aşağıdaki prosedür takip edilerek homojenat hazırlanabilir.

5.3.1. Yumuşak Dokulardan Homojenat Hazırlama Prosedürü

- 1 gr taze doku alınır.
- 9 ml Working Solution* eklenir.
- Mekanik homojenizatör (blender) ile ezilir.
- Yoksa havanda ezilir
- 3000 rpm de 5 dk. santrifuge edilir.
- Süpernatant serum gibi çalışılır.

*Working Solution:

140 mmol/L KCl (Deiyonize su içinde) veya 50 mmol/L. pH:7.40 Fosfat Tamponu (Eğer laboratuvarınızda mevcut değilse relassay@relassay.com adresine yazarak veya +90 342 230 37 52 nolu telefonu arayarak sipariş edebilirsiniz.)



5.4. Hayvan Deneyi

Memeli türleri arasında geniş bir dağılıma sahip olan Paraoxonase proteinleri; kuşlar, balıklar ve eklembacaklılar gibi omurgasız hayvanlarda mevcut değildir.

Memeli hayvanlarda birçok dokuda özellikle karaciğer, böbrek, ince barsak ve plazmada bulunur. Memeli hayvanların serumları ve dokuları ile çalışma yapılabilir. Günümüzde paraoxonase deneyleri için en çok sıçanlar kullanılmaktadır.

Çalışmalarda hayvanların serumları, kalsiyum bağlamayan antikoagülan kullanılarak elde edilmiş plazmaları veya dokuları numune olarak kullanılabilir.

Rel Assay Paraoxonase kiti ile hayvan deneylerinde güvenle kullanılabilir.

5.5. Saklama

5.5.1. Numunelerin Saklanması

Paraoxonase Enzim aktivitesi ölçülecek olan numuneler;

Serum/Plazma	2-8°C	24 Saat
Serum/Plazma	-20°C	3 Ay
Serum/Plazma	-80°C	1 Yıl

Süre ile saklanabilir.

5.5.2. Kit'in Saklanması

Kit 2-8°C de saklanmalıdır. Dondurulmamalıdır. Reaktiflerin ağzı kapatılmalı, ışıktan ve nemden korunmalıdır. Bu şartlarda ürün üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir. Kitin ağzı açılıp bir miktar kullanıldıktan sonra da yukarıda belirtilen şartlarda saklandığında yine son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.

5.6. Uyarı ve Önlemler

- Reaktifleri kullanarak çalışırken eldiven ve maske kullanınız.
- Reaktifleri solumayınız.
- Reaktifleri cildinize temas ettirmeyiniz.
- Herhangi bir temas durumunda bol su ile yıkayınız.
- Reaktifleri herhangi bir soluma veya yutma durumunda acilen bir hekime başvurunuz.



6. MANUEL ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ

Numune^A Hacmi	25 µL^B
Reagent 1^C Hacmi	500 µL
Reagent 2^D Hacmi	25 µL
Dalga Boyu	412 nm^E veya buna en yakın uygun dalga boyu.
Okuma Yöntemi	Kinetik (rate-up) çalışma

6.1. Çalışma Adımları

- Spektro küvetine 500 µL Reagent 1 konulur.
- Üzerine 25 µL numune eklenir karıştırılır.
- Bunun da üzerine 25 µL Reagent 2 eklenir ve karıştırılır. Tam ekleme anında bir kronometre de zaman başlatılır.
- Hızlı bir şekilde spektrofotometrede 412 nm. de ABS^F alınmaya başlanır.
- 30. ve 150. saniyelerde ABS alınır.
- Bu işlem tüm numuneler için uygulanır.
- Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

6.2. Hesaplama

$$\text{Sonuç (U/L)} = [(150. \text{ Saniye ABS} - 30. \text{ Saniye ABS}) / 2] \times 1202,84^G$$

6.3. Açıklamalar

A - Numune	:Serum, Heparinli Plazma, Semen Plazması, Hücre Kültürü ve doku homojenatı
B - µL	:Mikrolitre
C - Reagent 1	:Paraoxonase kit kutusu içinde, büyük şişedeki reaktif sıvı
D - Reagent 2	:Paraoxonase kit kutusu içinde, küçük şişedeki reaktif sıvı
E - nm	:Nanometre; spektrofotometrede ayarlanacak olan dalgaboyunun birimi
F - ABS	:”Absorbans”. Spektrofotometrede okunan değerin birimi
G – 1202,84	: Işık yonun 1 cm kabul edildiği faktör. Eğer Işık yolu 1 cm den farklı ise hesaplamada kullanılacak olan yeni faktör; 1202,84’ün ışık yolunun cm cinsinden değerine bölünerek elde edilir.



7. OTOMATİK ANALİZÖRDE ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ

Otomatik Analizörlere aşağıdaki veriler girilerek aplikasyon yapılabilir. Otomatik cihazların menüleri birbirlerinden farklılıklar gösterebilirler. Her cihazın kendisine ait bir algoritması vardır. Fakat aşağıdaki veriler her cihaz için ortak olarak kullanılacak parametreler ve bunların değerleridir. Bunların haricinde cihazda tanımlanması gereken değerleri; cihazın firmasında bulunan aplikasyon sorumlusu personelden temin edebilirsiniz.

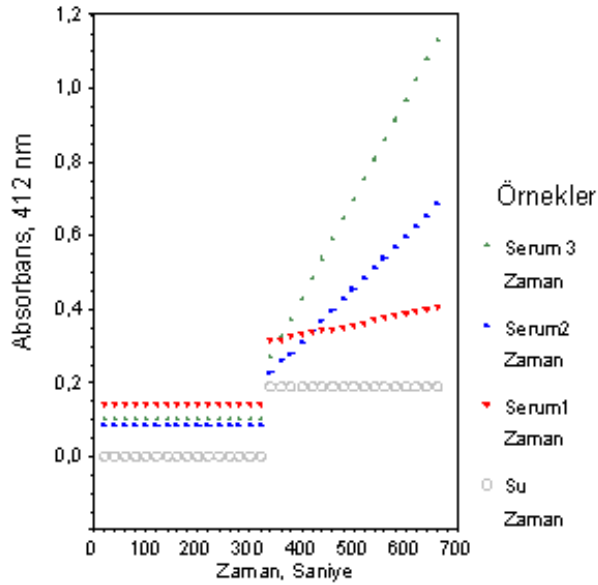
Firmamızda birçok cihazın aplikasyon bilgileri mevcuttur. Bu bilgiler için support@relassay.com adresine yazabilir veya +90 342 230 37 52 nolu telefonu arayıp destek alabilirsiniz.

İki Reaktif alan, 412 nm veya buna yakın bir dalgaboyuna sahip, kinetik okuma modu olan açık sistem biyokimya otoanalizörlerinin tümünde çalışılabilirsiniz.

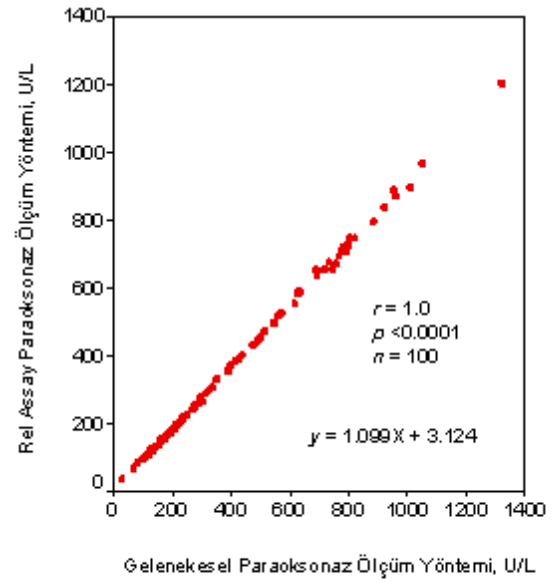
Reagent 1 Hacmi	500 mL
Numune Hacmi	25 mL
Reagent 2 Hacmi	25 mL
Dalga Boyu	412 nm.
Ölçüm Yöntemi	Kinetik
Kalibrasyon Tipi	Faktör (1202,84)
Birim	U/L



7.1. Reaksiyon Kinetikleri ve Performans



Sekil 1. Yüksek, orta ve düşük paraoksonaz aktivite düzeylerine sahip serumlar ile suyun otomatik analizörde zaman – absorbans değişkenli, Rel Assay Paraoksonaz testinin reaksiyon kinetikleri.



Sekil 2. Rel Assay paraoksonaz ölçüm yöntemiyle geleneksel paraoksonaz ölçüm yönteminin karşılaştırılması ve korelasyon grafiği.

7.2. Testin %CV Değerleri

Serum Havuzları	Paraoksonase Testi %CV	Stimulated Paraoksonase Testi %CV
Yüksek Aktiviteli	4,1	4,9
Orta Aktiviteli	1,7	1,1
Düşük Aktiviteli	1,5	1,5



8. PARAOXONASE TESTİ DEĞERLENDİRMESİ

Paraoxonase enzim aktivitesini etkileyen iki farklı genetik faktör vardır. Paraoxonase'ın 55. ve 192. aminoasitinin çeşidi aktivite üzerinde etkilidir.

PON1'in 55. pozisyonda lösin (L genotip) yerine metionin (M genotip) gelmesinin aktivite üzerine etkisinin çok az olduğu belirtilmiştir (39). Ancak 192. pozisyondaki arjinin yerine glutamin gelmesi aktiviteyi en az 8 kat azaltmaktadır. Dolayısı ile Paraoxonase enziminin 192. Aminoasitinin Arjinin (R)veya Glutamin (Q) olması aktiviteyi ciddi manada etkilemektedir. Bu da bireyler arasında Paraoxonase enzim aktivitesi ile ilişkili hastalıklara karşı dirençli veya duyarlı olma özelliklerini belirlemektedir. 192. Aleli RR olduğunda Aktivite yüksek, QR olduğunda aktivite orta ve QQ olduğunda aktivite düşük olur.

Türk popülasyonuna ait sağlıklı bireylerden alınan numuneler üzerinde yapılmış olan çalışmamızda aşağıdaki verilere ulaşılmıştır. Bu değerler ırka, yaşa, beslenme şekline, kronik hastalıklara ve sigara kullanımına bağımlı olarak değişiklik gösterebilmektedir.

Gruplar	Değerler (U/L)	Popülasyondaki Dağılım
Düşük Aktiviteli Grup	<200	%46
Orta Aktiviteli Grup	200-400	%44
Yüksek Aktiviteli Grup	>400	%10

- Bu çalışma bilimsel veriler ışığında uluslararası literatürlere uygun olarak hazırlanmıştır.
- Bu çalışma Türkiye'de yapılmış olup Türk popülasyonunun numuneleri kullanılmıştır.
- Bu çalışmada 20-60 yaş sağlıklı bireylerden alınan numuneler kullanılmıştır.
- Unutulmamalıdır ki her laboratuvar kendi referans aralığını kendi belirler. Bu çalışma sadece üreticinin kendisi için hazırladığı örnek bir çalışmadır. Üretici firma bu verilerin kullanımından doğacak herhangi problemde sorumluluk kabul etmez.



9. PON1 192 QR POLİMORFİZM (FENOTİPLEME)

Paraoksonaz ve arilesteraz her ne kadar iki ayrı enzim olarak algılanırsada, yapılan çalışmalar ve araştırmalar göstermiştir ki; İnsan serumunda tek gen ürünü enzim hem arilesteraz hem de paraoksonaz aktivitesine sahip olduğu işlenmiştir. Hatta bu enzimin laktonaz aktivitesine de sahip olduğunu gösteren yayınlarda mevcuttur (40). İnsanda 7. kromozomun uzun kolunda q-21.3 ve q-22.1 arasında tanımlanabilen paraoksonaz gen ailesinin PON1, PON2 ve PON3 şeklinde 3 üyesi bulunur. Gelişimsel açıdan bakıldığında, gen duplikasyonu sonucu oluşarak yapısal benzerlik gösteren genlerdir. PON1, PON2 ve PON3 genlerinin memeliler arasında; nükleotid seviyesinde benzerlikleri %81-90 iken aminoasit seviyesindeki benzerlikleri %79-90 dır. PON1'de 106. kodonda (lizin) bulunurken, PON2 ve PON3'te lizin bulunmamaktadır. Yıllarca PON1 ile yapılan çalışmalarda, insan serum kapasitesi, ksenobiotikleri hidrolize etmesi ve aterosklerosis arasındaki ilişki araştırılmıştır. PON2 ve PON3, hakkında yapılan araştırmaların azlığı nedeniyle PON1 kadar iyi anlaşılamamışlardır. PON1 ve PON3 genlerinin ürünü plazma da yer alırken, PON2'nin hücre içi yerleşimli olduğu söylenmektedir (41,42). Son yıllarda yapılan bazı araştırmalarda PON2 ve PON3 gen ailesinin PON1'in HTLase aktivitesine katkıda bulunduğunu ve PON2 ve PON3' ün KAH da en az PON1 kadar kıymetli olduğunu rapor etmişlerdir (43). Fakat bizler PON1 den bahsederken aslında PON1'in paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesinden bahsediyoruz. PON1 de 2 aminoasit polimorfizmi vardır. Bunlardan biri 55. pozisyonda metionin ile lösin (M/L) aminoasitlerinin yer değişmesiyle, diğeri 192. pozisyonundaki arginin ve glutamin aminoasitlerinin yer değiştirmesinden [R/Q(bazı kaynaklarda Q yerine A genotip, R yerine B genotip kullanılmaktadır)] meydana gelir. PON1 promotor bölgesinde bu polimorfizmlerden başka bilinen beş tane daha polimorfizm bulunur. Populasyonlardaki polimorfik dağılım bireyler arasında farklılığa neden olur. Polimorfizm arilesteraz aktivitesini etkilemez, arilesteraz aktivitesi PON1 aktivitesindeki değişikliklerden bağımsız, esas olarak protein konsantrasyonunun göstergesi olarak kabul edilebilir. Yani Paraoksonaz; aktivite polimorfizmi göstermeyen arilesteraz aktivitesine de sahiptir (44). PON1'in 55. pozisyonda lösin (L genotip) yerine metionin (M genotip) gelmesinin aktivite üzerine etkisinin çok az olduğu belirtilmiştir (39). Ancak 192. pozisyonundaki arjinin yerine glutamin gelmesi aktiviteyi en az 8 kat azaltmaktadır. Paraoksonaz enzim aktivitesindeki polimorfizm, PON1₁₉₂R izoformu, paraoksonu PON1₁₉₂Q formundan daha hızlı hidroliz ederken, PON1Q192 izoformu diazokson, somon'u daha hızlı hidroliz eder (45).

Paraoksonaz allozimlerin kantitatif ve kalitatif olarak farklı olduklarının keşfi ile fenotipleme metodları geliştirilmiştir. 1984'te La Du BN ve ark. dual substrat metodu diye adlandırdıkları bu metoda göre (46); İki izoenzimin tuz ve pH'ya farklı yanıtlarına göre iki fenotip tanımlamıştır. Tuza yanıt veren B allozim paraoksone karşı daha yüksek enzim aktivitesine sahiptir. Paraoksonaz aktivitesi 1M (Molarite) NaCl ile stimüle edildiğinde aktivesi artarken, arilesteraz aktivitesinde ise düşme olduğu tespit edilmiştir. Bu analizde trimodal dağılım izlenir. Geniş-düşük aktivite piki "düşük aktiviteli homozigotları-AA", küçük yüksek aktivite piki "heterozigotları-AB", en küçük aktivite piki ise "yüksek aktiviteli homozigotları-BB" temsil eder. En yaygını homozigot-AA (QQ), ikincisi heterozigot-AB (QR), en az olanı homozigot-BB(RR)'dir. Paraoksonaz polimorfik dağılımı büyük interetnik değişkenlik gösterir. Karakaya



ve ark. (47), bu tipte trimodal dağılımı Türk populasyonunda göstermiştir. Ancak bu trimodal dağılımı ilk olarak Mallinckrodt ve ark, tarafından sergilenmiştir (48).

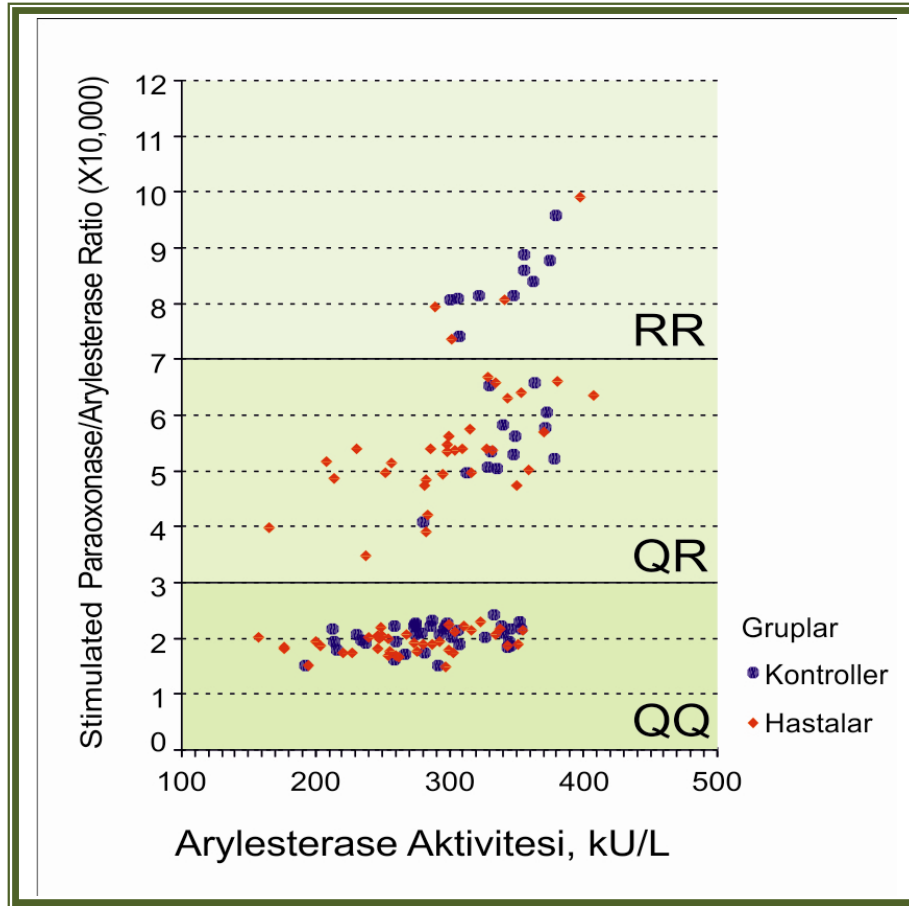
Paraoksonaz için ilgili insan geni ayrıca HUMPONA olarak isimlendirilmektedir. Düşük paraoksonaz aktivitesi hiperkolesterol ve diyabetlilerin de içinde bulunduğu KAH hastalarında görülür. Çünkü bu gruplarda lipid peroksidasyon ürünleri, aterosklerozis'in gelişimini hızlandırır ve insan şilomikronlarında lipid oksidasyon ürünlerini artırır. Ayrıca PON1 aktivitesinin diyet alımıyla yakından ilişkili olduğu söylenmektedir. Diyetle bulunan meyve, çay ve tereyağının PON1 aktivitesi artırdığını ve diyet içeriğindeki karbonhidrat, protein, MUFA, PUFA, E Vitamini, flavonoidler ve Qercetin ile korele olduğunu rapor eden çalışmalar mevcuttur (49) Yüksek seviyedeki PON1'den saflaştırılmış PON1₁₉₂RR ve PON1₅₅LL'nin paraokson hidrolitik aktivitesi en yüksekken, PON1₁₉₂QQ ve PON1₅₅MM de bu aktivite en düşüktür. R allelin kodladığı proteinin paraokson hidroliz aktivitesi Q allele göre sekiz kat yüksektir. Aktivitenin ara basamağı homozigotlardır (50). Substrat spesifitesinin benzer basamakları metil paraokson, klortion-okson gibi diğer oksonlarda ve armin'de gözlenebilir. Diğer yandan paraoksonaz alloenzimlerin oksidasyondan LDL'yi koruma kapasitesi paraokson hidrolitik aktivitesi ile tamamen terstir. Böylece, PON1₅₅MM / PON1₁₉₂QQ alloenzim bulunan bireylerin HDL ve PON1 ile ilişkili olarak en büyük koruma kapasitesine sahip olmalarının yanında, bu alloenzimler diazoxon ve somon ve sarin gibi sinir gazlarını hidroliz etmede de aktif rol üstlenirler (51,52).

Türk populasyonunda oldukça düşük oranda görülen RR alleli; doğu populasyonlarından düşük Avrupa ırkına yakın değerler göstermiştir (53). Düşük aktivite görülen Q alleli Avrupa, Kanada ve Amerika'da yüksek, Avustralya, Aborjin, Zambiya ve Zimbabve'de düşüktür. Avrupa populasyonlarında izlenen %50 civarında düşük aktivite izoformu ve bimodalite Avrupa'dan uzaklaştıkça azalır. Afrika ve doğu ülkelerinde dağılım unimodaldır, bu ırklarda düşük aktiviteli genotip sıklığı az görülür.



9.1. Fenotipleme Çalışması

Paraoxonase enziminin Paraoxon (Paraoxonase) ve fenilasetat (Arylesterase) aktivitelerinin oranı kullanılarak; biraylerin üç fenotip olan QQ, QR ve RR dan hangisine ait olduğu tespit edilebilir. Paraoxonase'ın ikili substratı ile belirlenen fenotipleme, genotip analizleri ile yüksek doğrusalıktadır. PON1 192Q/R Fenotipleme için Rel Assay Stimulated Paraoxonase ve Arylesterase kitlerini kullanarak kolaylıkla, otomatik ve hızlı olarak sonuca ulaşabilirsiniz.



Prostat Hipertrofili Hasta ve Kontrollerde PON1 192/QR Fenotipleme Kategorizasyon Çalışması



10.KAYNAKÇA

1. Ekmekci A. Koroner arter hastalığında ve tedavisinde damar endotel fonksiyonları. **CIBA 1995**, İstanbul.
2. Onat A. Risk factors and cardiovascular disease in Turkey. *Atherosclerosis* 2001; 156:1-10
3. Kültürsoy H. Koroner kalp hastalığı primer ve sekonder korunma. **ARGOS 2001**; T.A.Ş İstanbul
4. Koylan N. Koroner arter hastalığı epidemiyolojisi lipid düşürücü tedavi ile ilgili büyük klinik çalışmalar. *Türk Kardiyoil Dern Arşv* 2000;13:9-20
5. Castelli W P, Wilson P W F, Deny D, Anderson K D. Cardiovascular risk factors in the elderly. *Am J Cardiol.* 1989; 63:12-19
6. Gordan T, Castelli W P, Hjortland M C. Lipoproteins cardiovascular diseases and death. The Framingam Study. *Arch Intem Mad.* 1981; 141: 1128
7. Mahley R W, Innearity T L, Rall S.C, Weisgraber K.H, Plasma lipoproteins, apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research.* 1984; 25: 1277-94
8. Mackness M I, Arrol S, Durrington P N, Paraonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991; 286: 152-154,
9. Hernandez A F, Pla A, Valenzuela A., Gil F, Hougen H P, Villanueva E. Paraonase activity in human pericardial fluid its relationship to coronary artery disease. *Int J Leg Med.* 1993; 105: 321-324
10. Kelso G J, Stuart W D, Richter R J, Furlong C E, Jordan-Starck T C, Harmony J A. Apolipoprotein J is associated with paraonase in human plasma. *Biochemistry* 1994; 33:832-839
11. Mackness M I, Arrol S, Abbott C, Durrington P N. Protection of low density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraonase. *Atherosclerosis* 1993; 104:129-135
12. Mackness M I, Harty D, Bhatnagar D, Winocour P R, Flirli S, Ishola M, Durrington P. Serum paraonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991; 86:193-199
13. Eckerson H W, Wyte C M, La Du B N. The human serum paraonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1983; 35:1126-1138
14. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten R I, Fonarow G C, Cardinez C J, Castellani L W, Brennan M L, Lusis A I, Fogelman A M, La Du B N. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraonase ratio. *J Clin Invest.* 1997; 99:2005-2019
15. Odowara M, Tachi Y, Yamashita K. PON1 polymorphism (Gln 192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin end Metb* 1997; 82:2257-2260
16. Heinecke I W, Lusis A J. Paraonase-gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis? *Am J Hum Genet* 1998; 62:20-24
17. Kao Y L, Donaghue K, Chan A, Knight J, Silink M. A variant of paraonase (PON1) gene is associated with diabetic retinopathy in IDDM. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2589-2592
18. Gan K N, Smolen A, Eckerson H W, La Du B N. Purification of human serum paraonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos.* 1991; 19:100-106
19. Costa L G, Mc Donald B E, Murphy S D, Omenn G S, Richter R J. Serum PON and its influence on Paraon. *Tox and Applied Pharmaeology* 1990; 103:66-76
20. Hegele R A, Connelly P W, Scherer S W, Hanley A J, Harris S R, Tsui L C, Zinman B. Paraonase 2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3373-3377
21. Costa L, Vitalone A, Cole T B, Furlong C E. Modulation paraonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology* 2004
22. James R, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Fuegel P, Gavin MCB. Promoter polymorphism T(-107)C of the paraonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000; 29:390-39
23. Paragh G, Balla P, Katona E, Seres I, Egerhazi A, Degrell I, Serum paraonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2002; 252:63-67
24. Ferre N, Marsilach J, Camps J, Rull A, Coll B, Tous M, Joven J. Genetic association of paraonase-1 polymorphisms and chronic hepatitis C virus infection. *Clinica chimica acta.* 2005; 18:112-118
25. Min J, Park H, Park B, Kim YJ, Park J, Lee H, Ha E, Park E A, Hong Y C. Paraonase gene polymorphism and vitamin levels during pregnancy: relationship with maternal oxidative stres and neonatal birtweights. *Reproductive toxicology* 2006; 147:363-367
26. Clarimon J, Eerola J, Hellstrom O, Tienari PJ, Singleton A, Paraonase 1 (PON1) gene polymorphisms and Parkinson's disease in a Finnish population. *Neurosci Lett* 2004; 367:168-170
27. Paşca S.P, Nemeş B, Vlase L, Gaygi C.E, Dronca E, Miu A.C, Dronca M., High levels of homocysteine and low serum paraonase 1 aylesterase activity in chidren with autism. *Life sciences* 2006; 78:2244-2248
28. Raiszadeh F, Solati M, Etemadi A, Azizi F. Serum paraonase activity before and after treatment of thyrotoxicosis. *Clin Endocr* 2004; 60:75-80
29. Delgado Alves J, Ames PR, Donohue S, Stanyer L, Nourooz-Zadeh J, Ravirajan C, Isenberg DA, Noorouz-Zadeh J. Antibodies to highdensity lipoprotein and β -2 glycoprotein-I are inversely correlated with paraonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2003; 48:284
30. Mackness MI, Mackness B, Arrol S, Wood G, Bhatnagar D, Durrington PN. Presence of paraonase in human interstitial fluid. *FEBS Letters* 1997; 416:377-380.
31. Griffith MK, Virella GT, Stevenson HC, Lopes-Virella MF. Low density lipoprotein metabolism by human macrophages activated with low density lipoprotein immune complexes. A possible mechanism of foam cell formation. *J Exp Med* 1988; 168:1041-1059
32. Szafran Z, Nowak J, Szafran H, Janik A. Esterolytic activity of blood serum in infants with hypertrophic pylonic stenosis. *J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 17:321-324
33. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Staffonini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes proinflammatory during the acute phase response. *J Clin Invest* 1995; 96:2758-2767



34. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91:2488–2496
35. Marchesani M, Hakkarainen A, Tuomainen T P, Kaikkonen J, Pukkala E, Uimari P, Seppalo E, Matikainen M, Kallioniemi O P, Schleutker J, Lehtimäki T, Salonen J T. New paraoxonase 1 polymorphism I102V and the risk of prostate cancer in Finnish men. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:812–818
36. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38:1103–1111
37. Rel Assay Paraoxonase Assay Kit (MEGA TIP SAN VE TIC LTD STI) <http://www.relassay.com/?sf=3&M=4&IDetay35=38>
38. SELEK S. Harran University Faculty of Medicine, Sanliurfa, Turkey.
39. Mackness M, Durrington P, Mackness B. Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15:399–404.
40. suchocka Z, swatowska J, pachecka J, suchocka P; RP-HPLC determination of Paraoxonase activity in human blood serum; *J of pharmaceutical and biomedical analysis* 2006; 42:113–119
41. Lipincott W. Paraoxonase a cardioprotective enzyme: continuing issues, *Curr Opin Lipidol* 2004; 15:261–267
42. Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, Suissa A, Aviram M; Paraoxonases 1, 2 and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2; *Free Radical biology* 2005; 39:336–344
43. Yang X, Gao Y, Zhou J, Zhen Y, Yang Y, Wang J, Song L, Liu Y, Xu H, Chen Z, Hui R; Plasma homocysteine thiolactone adducts associated with risk of coronary heart disease; *C Chimica acta* 2006; 364: 230–234
44. Gülcü F, Gürsu F; The standardization of paraoxonase and arylesterase Activity Measurements; *Turkish J Biochem* 2003; 28:45–49
45. Aviram M, Davies J. A, Paraoxonase 1 and atherosclerosis: Is the gene or the protein more important? *Free Radical Biology* 2004; 37:1317–1323
46. La Du BN, Eckerson HW. The polymorphic paraoxonase/arylesterase isozymes of human serum. *Fed Proc* 1984; 43:2338–2341
47. Karakaya A., Suzen S., Sardas, S, Karakaya AE, Vural N. Analysis of the serum paraoxonase/arylesterase polymorphism in a Turkish population. *Pharmacogenetics* 1991; 1:58–61
48. Mallinckrodt M, Geldmacher V, Hommel G, Dumbach J. On the genetics of the human serum paraoxonase. *Hum Genet* 1979; 50:313–326
49. Kleemola P, Freese R, Jauhiainen M, Pahlman R, Altfhan G, Mutanen M; Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis* 2002; 160:425–432
50. Ombres D, Pannitteri G, Montali A, Candeloro A, Seccareccia F, Campagna F, Cantini R, Campa P P, Ricci G, Arca M. The Gln-Arg192 Polymorphism of Human Paraoxonase Gene Is Not Associated With Coronary Artery Disease in Italian Patients. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:1611–1616
51. Garin MCB, James RW, Dussoix P, Blanchè H, Passa P, Froguel P, Ruiz J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme: a possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 1997; 99:62–64.
52. Agachan B, Ergen H A, Karaali Z E, Isbir T, PON1 55 and 192 Polymorphism and Its Effects to Oxidant-Antioxidant System in Turkish Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Physiol Res* 2005; 54:287–293
53. Karakaya A, Ibis S, Kural T, Kose SK, Karakaya A.E, Serum paraoxonase activity and phenotype distribution in Turkish subjects with coronary heart disease and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Chem Biol Interact* 1999; 118:193–200
54. Furlong C E, Li W F, Brophy VH, Jarvik G P, Richter R J, Shih D M, Lusis A L, Costa L G: The PON1 gene and detoxication. *Neurotoxicology* 2000; 21:581–587
55. Furlong CE, Richter RJ., Seidel S L, Motulsky AG. Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon. *Am J Hum Genet* 1998; 43:230–238
56. Mackness M I, Arrol S, Durrington P N, Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991; 286: 152–154,