

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

165172

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

SERUM PARAOKSONAZ (PON) AKTİVİTESİ ve
BUNUN PON1 POLİMORFİZMİ ve SERUM HDL DÜZEYİ İLE
İLİŞKİSİ

KAĞAN KILINÇ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 24.01.2005

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 18.02.2005

Tez Danışmanı

: Prof. Dr. Asım ÖREM

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Muhlise ALVUR

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. E. Edip KEHA

Jüri üyesi

: Prof. Dr. Ercüment OVALI

Enstitü Müdürü

: Prof. Dr. Orhan DEĞER

Şubat 2005

TRABZON

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

KISALTMALAR

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Lipoproteinler	3
2.1.1. Şilomikronlar (ŞM) :	4
2.1.2. Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (VLDL)	4
2.1.3. Ara Yoğunluklu Lipoproteinler (IDL)	4
2.1.4. Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDL)	4
2.1.5. Lipoprotein(a)	4
2.1.6.Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (HDL)	4
2.1.7.Apolipoproteinler (apoproteinler)	6
2.2. Serbest Radikaller ve Oksidan Sistemler	7
2.2.1. Lipid Peroksidasyonu	8
2.2.2.Oksidan Antioksidan Denge	10
2.2.3. LDL Oksidasyonu	11
2.2.3.1. LDL'nin Oksidasyon Mekanizması	11
2.2.3.2. oLDL Şekilleri	12
2.2.3.3. oLDL'nin Ateroskleroz'daki Rolü	13
2.3. Koroner Arter Hastalığı (KAH)	14
2.3.1.Ateroskleroz	15
2.3.1.1.Etyopatogenez	15
2.3.2.HDL ve Ateroskleroz	17
2.3.2.1.Ters Yönde Kolesterol Taşınımı	18
2.3.2.2.HDL ve Endotel Fonksiyonları	19
2.4. Paraoksonaz (PON1)	20
2.4.1.Paraoksonaz Geni	21
2.4.2.Paraoksonaz Proteini	21
2.4.3.Paraoksonazın Fonksiyonları	22
2.4.4.Paraoksonazın Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	23
2.4.5.Paraoksonaz ve Klinik Önemi	23

2.4.6. PON Polimorfizmi ve KAH ile İlişkisi	26
3. MATERYAL ve METOD	27
3.1. Materyal	27
3.1.1 Kullanılan Cihaz ve Aletler	27
3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	28
3.2. Metodlar	29
3.2.1. Deneyin Planlanması ve Numunelerin Toplanması	29
3.2.2.Otoanalizörlerde Tayini Yapılan Parametreler	29
3.2.3.Paraoksonaz Enzim Aktivitesinin Tayini	30
3.2.4.Okside LDL Antikoru (oLAB) Tayini	31
3.2.4.1.ELISA Uygulaması	31
3.2.5.PON1 Gln192Arg Gen Polimorfizminin Tespiti	32
3.2.5.1.DNA İzolasyonu	32
3.2.5.2.DNA Konsantrasyonunun Spektrofotometre ile Tayini :	35
3.2.5.3Paraoksonaz Gen Bölgesinin	
PCR (Polimeraz Zincir reaksiyonu) ile Amplifikasyonu	35
3.2.5.4.RFLP	37
3.2.5.5.Elektroforez	38
3.3. İstatistiksel Analizler	40
4. BULGULAR	41
4.1. Sağlıklı Grupta Ortalama Değerler ve Dağılımları	
ve Anlamlılıkları	41
4.2. Kontrol ve KAH Gruplarında Ortalama Değerler	
Dağılımları ve Anlamlılıkları	46
5. TARTIŞMA	57
5.1. Metotların Tartışması	57
5.1.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	57
5.1.2.PON Aktivitesinin Belirlenmesi	57
5.1.3.PON Gen Polimorfizminin Tayini	57
5.1.4.oLAB Tayini	58

5.2.Bulguların Tartışması

58

6. Sonuç ve Öneriler

65

7. Özet

66

8. Summary

67

9. Kaynaklar

68

Özgeçmiş

vi



ÖNSÖZ

Bu çalışmada;

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Asım Örem'e teşekkür ederim. Bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen anabilim dalımızın diğer öğretim elemanları Sayın Prof. Dr. Orhan Değer'e, Sayın Prof. Dr. Edip Keha'ya, Sayın Prof. Dr. Ekin Önder'e, Sayın Doc. Dr. S.Caner Karahan'a ve özellikle deneysel tecrübeleriyle büyük katkısı olan Sayın Yrd. Doc. Dr. Birgül Vanizor Kural'a,

Hasta grubunun oluşturulmasında büyük katkıları olan Kardiyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Yrd. Doc. Dr. Cihan Örem ve Uzm. Dr. İsmet Durmuş'a, istatistiksel yardımları için Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Sayın Murat Topbaş'a ve benzer çalışmalarındaki deneyimleri ve literatür desteği ile yardımcı olan Dr. Zeynep Göker'e,

Her türlü teknik destek ve yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlileri arkadaşlarıma, sekreterimiz Meral Köse'ye,

Tüm Biyokimya Araştırma ve Klinik Biyokimya Rutin Laboratuvarı personeline,

Teknik destek ve bilgilerini her zaman yanımda bulduğum Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri, araştırma görevlileri ve çalışanlarına ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Tez çalışmalarımda her zaman yanımda olan sevgili eşime ve kızıma, eğitimim için her türlü fedakarlığı yapmaktan kaçınmayan sevgili anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Bu tez K.T.Ü. Araştırma Fonu tarafından 2001.114.001.14 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Kağan KILINÇ

KISALTMALAR

ABCA1	: ABC cassette transporter reseptör protein 1
CETP	: Kolesterol ester transfer protein
IDL	: Ara yoğunluklu lipoprotein
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
KAH	: Koroner arter hastalığı
LCAT	: Lesitin kolesterol açıl transferaz
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MDA	: Malondialdehit
oLDL	: Okside LDL
oLab	: Okside LDL antikor
PAF AH	: Platelet aktive edici faktör asetil hidrolaz
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PON	: Paraoksonaz
PUFA	: Poliansatüre yağ asitleri
QQ	: Homozigot Glutamin genotipi
RR	: Homozigot Arjinin genotipi
RFLP	: Restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi
SR BI	: Scavenger reseptör sınıf B tip I
ŞM	: Şilomikron
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Lipoproteinler

Lipidlerin sulu ortamdaki çözünürlükleri son derece düşük olduğundan plazmadaki kolesterol, trigliserit, kolesterol esteri ve fosfolipidler lipoproteinler tarafından taşınır. Elektroforetik hareketliliklerine, lipid ve apolipoprotein içeriklerine ve yoğunluklarına göre sınıflandırmada 6 lipoprotein tanımlanmıştır.

- Şilomikronlar (ŞM)
- Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL)
- Düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL)
- Ara yoğunluklu lipoproteinler (IDL)
- Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) ve
- Lipoprotein (a) [Lp(a)]

Lipoproteinlerin protein içeriğini başlıca apolipoproteinler (apoprotein) ve enzimler meydana getirir. Apolipoproteinler geniş bir sınıf oluşturmaktadırlar ve reseptör ligandından enzim aktivatörlüğüne kadar çeşitli görevlerden sorumludurlar. Genel bir lipoprotein molekülünün yapısı, dışta bir fosfolipid tabakası, bu tabaka arasında yerleşmiş serbest kolesterol, ve bu tabakayı çevreleyen apoproteinlerden ibarettir. Küresel yapının çekirdeğinde ise apolar lipidler yani trigliseritler ve kolesterol esterleri bulunur.

Tablo 1 : Lipoproteinler ve Genel Özellikleri

Sınıfı	Yoğunluğu (g/mL)	Çapı (nm)	Flotasyon hızı (Sf)	Lipid ve protein (p) İçeriği (%)				Apolipoproteinleri
				P	TK	TG	FL	
ŞM	<0.95	75-200(0)	<400	1-2	4	85	8	B48,AI,AIV,
VLDL	0.95-1.006	30-80(preβ)	20-400	8	23	55	15	B100,E,CI,CII,CIII
IDL	1.006-1.019	25-35 (β)	12-20	10	35	28	26	B100, E
LDL	1.019-1.063	18-25 (β)	0-12	18	65	8	13	B100
HDL	1.063-1.210	5-12 (α)		50	25	5	20	AI,AII,CI,CII,CIII, E
Lp(a)	1.055-1.085	15-20		21	66	8	26	apo(a), B100

TK :Total kolesterol, TG : Trigliserit, FL : fosfolipid

2.1.1. Şilomikronlar (ŞM) :

Çapı en büyük ve trigliserit içeriği en fazla olan lipoproteindir. Genel olarak kısa ömürlüdürler. Lipoprotein lipazın (LPL) trigliseritleri hidrolizine bağlı olarak meydana gelen ŞM kalıntıları, kolesterol esteri içeriği bakımından daha zengindir. Lenf dolaşımı üzerinden sistemik dolaşıma ve karaciğere gelerek katabolize edilir. Barsaklarda sentez edilen ŞM'lar 12 saatlik bir açlıktan sonra dolaşımda bulunmazlar.

2.1.2. Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (VLDL) :

Karaciğerde sentezlenerek dolaşıma verilen VLDL'nin trigliserit içeriği, dolaşımda LPL, ve hepatik lipaz (HTGL) enzimlerince hidrolize edilerek kolesterol esterlerinden zengin VLDL kalıntıları oluşur. VLDL bu enzimatik reaksiyonlar sonucunda ara yoğunluklu lipoproteinlere (IDL) dönüşür.

2.1.3. Ara Yoğunluklu Lipoproteinler (IDL) :

VLDL'nin %50 veya daha fazlası lipolitik enzimlerce IDL'ye dönüştürülür. Normal koşullarda plazmada düşük konsantrasyonlarda bulunur. Lipoliz sonucu trigliserit bakımından fakirleşir.

2.1.4. Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDL) :

Plazmanın başlıca kolesterol taşıyıcı molekülüdür. Plazma kolesterolünün yaklaşık %60-70'i LDL'de bulunmaktadır. Eser miktarda apoE dışında protein içeriğinin %95'ni apoB100 oluşturur. LDL'nin hemen hemen tümü VLDL'nin lipolizi sonucunda oluşur. Yapısındaki fosfolipid ve çoklu doymamış yağ asidi içeriği bakımından oksidasyona duyarlıdır. En küçük ve en yoğun LDL oksidasyona karşı en hassas türüdür ve aterosjenik bir molekül olarak bilinir.

2.1.5. Lipoprotein(a) :

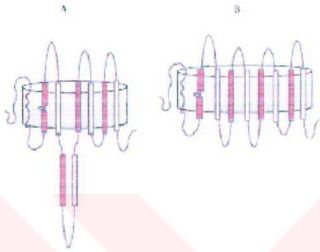
Lipid bileşimi bakımından LDL'ye benzeyen Lp(a), apo(a) denen 514 kD ağırlığında yüksek glikolize bir protein içerir. Serum Lp(a) düzeyinin yaşa bağlı olarak değişmediği tespit edilmiştir. Aterosjenik bir lipoprotein olup intimada aterosklerotik plak oluşumunda rolü olduğu bilinmektedir.

2.1.6. Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (HDL) :

Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) benzer molekül yoğunlukları ($1.063 < d < 1.21 \text{ g/mL}$) ve hacimleri (5-17 nm çap) ile karakterize edilen serum lipoprotein fraksiyonlarıdır. İçeriğindeki başlıca protein Apo AI'dir. Apo AI ilk tanımlanan ve karakterize edilen apolipoproteinlerden biridir. Protein içeriğinin yaklaşık %70'ni oluşturan Apo A I'i %20 oranında apoA II izler. Bunlara ek olarak apo AIV, apo J (clusterin), paraoksonaz (PON), haptoglobulin, lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) gibi çeşitli proteinler de HDL

ile ilişkilidir. HDL'nin ateroskleroza karşı koruyucu role sahip olduğu bilinmektedir ve bu proteinlerin HDL'nin fonksiyonlarında önemli rolleri vardır (5)

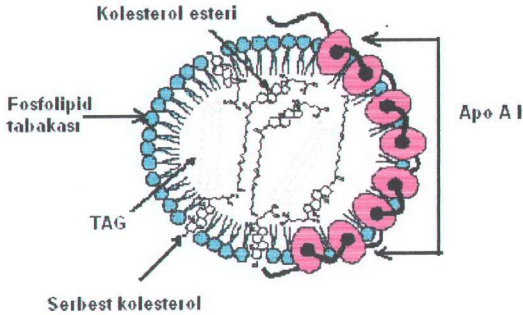
HDL'nin başlıca sentezi karaciğer ve barsak kaynaklıdır. Bununla birlikte dolaşımda da apo AI kaynaklı sentezi gerçekleşebilir. Yeni sentezlenen HDL, apo AI proteini ve bunun etrafını çevrelediği az miktardaki fosfolipitten ibarettir. Disk biçimli bu yapı pre β HDL olarak adlandırılır. Yeni sentezlenen HDL'nin kolesterol afinitesi yüksektir.



Şekil 1 : HDL'nin öncül yapısında Apo AI ile fosfolipid ikili tabakasının durumunu gösteren iki model. İkili Fosfolipid tabakası tarafından biçimlendirilen diske (kemer modeli), Apo AI'nin amfipatik α helikal domainleri fosfolipid açıl zincirlerine paralel yerleşimlidir. Küçük diskoidal yapıda tüm heliksler bu yerleşimi göstermez ve buna bağlı olarak lipid etkileşimleri zayıf olurken (A), daha geniş disklerde Apo AI'nin tüm domainleri lipidlerle etkileşim halindedir (6).

HDL dolaşımında ekstrahepatik dokulardan serbest kolesterol ve fosfolipid alır disk biçimli yapıdan küreselleşen bir yapıya dönüşür. Almış olduğu kolesterol, lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) enzimince esterleştirilir. Dolaşımdaki etkileşim sırasında kolesterolü ihtiyacı olan diğer dokulara götürür. Ters yönde kolesterol taşınımı denen bu yolda aynı zamanda apo CI, CII, CIII, ve apoE'nin de diğer lipoproteinlere dağıtımını yapar. Hepatik lipaz, LPL kolesterol ester transfer protein (CETP), fosfolipid transfer protein (PLPT) gibi enzimlerce lipid ve protein içeriği sürekli değiştirilir. Bu içerik değişimi HDL alt sınıflarının oluşmasına yol açar.

Yeni sentezlenen öncü HDL (pre β HDL), fosfolipid, ester kolesterolü ve apolipoprotein AII katılımı ile HDL₃'e dönüşür. Enzimlerin etkisi ve lipid ve protein alışverişi ile HDL₂ oluşur. Olgun HDL ise (α HDL) kolesterol ester ve fosfolipid içeriği zengin olup HDL'nin son basamağını oluşturur ve zayıf kolesterol alıcısıdır. Hidrofobik kolesterol esteri ve trigliseridler çekirdekte yer alırken fosfolipidler ve serbest kolesterol molekülün dış tarafında ağırlıklı olarak bulunur (şekil 2).



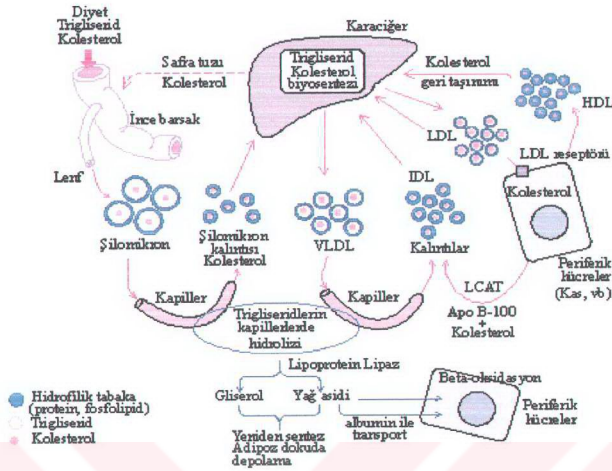
Şekil 2 : Olgun HDL (α HDL)

Hidrofobik kolesterol esterleri ve trigliseridler çekirdekte yer alırken fosfolipidler ve serbest kolesterol molekülün dış tarafında ağırlıklı olarak bulunur (7).

2.1.7. Apolipoproteinler (Apoproteinler)

Lipoproteinlerin yapısında bulunan apolipoproteinler, lipoproteinlerin yapısal şekillerinin oluşturulması, değişik hücre yüzey reseptörlerine veya enzimlere bağlanmasını sağlayan reseptör ligandı, ve/veya enzim aktivatörü olarak fonksiyon görürler. Molekül büyüklükleri çok farklı olabilir. Apo AI, A IV ve apo B 48 dışında diğer tüm apoproteinler karaciğer kaynaklıdır. Lipoproteinler birden fazla apoprotein içerebilirler.

Apo AI HDL ile birlikte anti aterosjenik kabul edilir. Apo B100 LDL'nin yapısal proteini olup LDL oksidasyonunda hedef moleküllerden biridir. Apo AIV HDL'nin kolesterol transportunda rol oynar. Apo C II LPL kofaktörü, apo E ise LDL ve ŞM kalıntı reseptör ligandı ve lokal lipid dağılımında fonksiyon yapar. Lipoprotein metabolizması şekil 3'de özetlenmiştir.



Şekil 3. Lipoprotein metabolizmasının özeti :

2.2. Serbest Radikaller ve Oksidan Sistemler

Okside ajanların başında serbest radikal denen ve üzerinde eşlenmemiş elektron taşıyan atom veya moleküller gelmektedir. Bu tanıma en fazla reaktif oksijen türleri uymaktadır. Süperoksit ($\cdot O$) ve hidroksi radikali ($\cdot OH$) en kuvvetli serbest radikaller olarak bilinirler. Demir (Fe) ve bakır (Cu) gibi bazı geçiş metal iyonları da serbest radikal olabilir. Serbest radikaller yalnızca lipidleri okside etmekle kalmayıp aynı zamanda proteinler, karbonhidratlar ve DNA üzerinde de hasara yol açarlar. Proteinlerin peptid bağlarının hidrolizi, disülfid bağı oluşumu ve çapraz bağlanma ile üç boyutlu yapısını boyutlu yapılarını ve dolayısı ile fonksiyonlarını değiştirirler. DNA üzerindeki hasarı ise mutasyon oluşturmak sureti ile gerçekleştirebilir.

Serbest radikallerin vücutta çok geniş bir etki alanı vardır. Akciğer ve solunum sistemi (kistik fibroz), kalp ve kardiyovasküler sistem (ateroskleroz), barsaklar (Crohn hastalığı), karaciğer (hepatit, sentez bozuklukları), pankreas (diabet), testisler (infertilite), genel vücut sistemleri (immün yetmezlik) serbest radikallerin rol aldığı patolojik olaylardır.

Serbest radikallerin koroner arter hastalığındaki başlıca etkileri lipid peroksidasyonudur. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) reaktif oksijen türlerinin başlıca hedefidir (8-10).

Tablo 2 : Bazı Oksidan ve Antioksidanlar (10,11).

OKSİDAN	ANTIOKSİDAN
Reaktif oksijen türevleri Süperoksit radikali ($O^{\cdot-}$) Hidroksil radikali ($\cdot OH$) Hidrojen peroksit (H_2O_2) Azot dioksit ($NO_2^{\cdot}$)	İntraselüler Antioksidanlar Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) Glutatyon redüktaz Katalaz Süperoksit dismutaz(SOD)
Hipokloröz asit (HOCl)	Membran Antioksidanları Vit E (α tokoferol) Vit A (β karoten) likopen Koenzim Q
Bazı geçiş metal iyonları $Cu^{+1}, Cu^{+2}, Fe^{+2}$	Ekstraselüler Antioksidanlar Transferrin Albumin Serulaplazmin Askorbik asit Glukoz PAF- AH
Serbest radikal kaynağı bazı enzimler Monoamin oksidaz Ksantin oksidaz Siklooksijenaz	
Serbest radikal kaynağı bazı proteinler Hemoglobin Flavoproteinler	

2.2.1. Lipid Peroksidasyonu

Lipoproteinlerin ve biyolojik membranların yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri ve kolesterol, çoğunlukla biyolojik sistemlerin ürünü olarak meydana gelen oksitleyici ajanların tesirine maruz kalarak doğal (biyolojik olarak fonksiyonel) yapılarını kaybederler ve lipid peroksitlerine dönüştürler. Lipid peroksidasyonu enzim gerektirmeyen ve ileri safhalarında yeni serbest radikal oluşumunu ve/veya ara lipid hidroperoksit ürünlerinin meydana gelmesi ile karakterizedir.

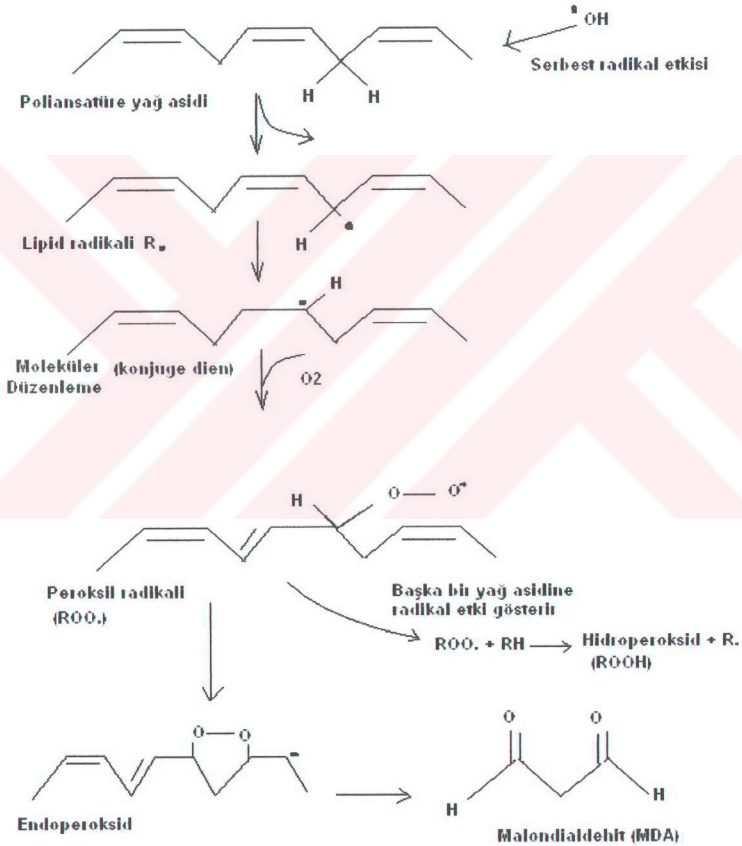
Lipid peroksidasyonunun başlangıç aşaması bir PUFA'nın metilen karbon hidrojeninin bir serbest radikalin saldırısı ile başlar (şekil4).



Bu aşamadan sonra lipid radikalinde oksijen molekülünün de etkisi ile yapı farklılaşması olur ve bir moleküler düzenleme gerçekleşir (konjuge dien oluşumu). Bu reaksiyonun ilerleme fazına karşılık gelir.



Bu hali ile oksidan özellik kazanan lipid molekülü, diğer yağ asitlerine etki ederek lipid peroksitlerin oluşumunu sağlar (12,13).



Şekil 4 : Lipid peroksidasyonu

Monohidroperoksitlerden şekillenen zincirlerin kesimi sonucunda başlıca iki grup molekül meydana gelir:

Hidrokarbonlar ve kısa zincirli aldehitler.

Daha az karakterize olmakla beraber epoksi ürünler, alkoller ve keton grupları oluşur. Yine ara ürün olarak hidroksi aldehitler, dikarboksilik asitler meydana gelir.

Lipid peroksidasyonunu sonunda yan ürün olarak malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (4 HNE) gibi son derece toksik moleküller meydana gelir. MDA, sitotoksikite, mutajenite, membran yıkımı ve enzim modifikasyonuna yol açar. Son derece reaktif bir aldehit olup proteinlerin serbest amino grupları, özellikle fosfolipidler ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek bu etkilerini gösterir. Doku hasarının iyi bir belirteci olmasından dolayı lipid peroksidasyonunun ölçümünde yaygın biçimde kullanılır (13, 14).

Yoğun lipid peroksidasyonunun etkileri şu şekilde sıralanabilir:

- Membran akışkanlığında azalma olur
- Membran potansiyelinde azalma olur.
- Rüptürden dolayı hücre bileşenlerinin salınımı gerçekleşir.
- Toksik peroksit son ürünleri meydana gelir.
- Doku hasarından dolayı antioksidanlar hücre dışına sızar (15).

2.2.2.Oksidan Antioksidan Denge

Oksijenli solunum yapan organizmalarda metabolizmanın bir sonucu olarak serbest radikaller denen reaktif atom veya bileşikler meydana gelir. Normal metabolizmada çoğunlukla yıkıcı etkilere sahip olan bu radikallerin bertaraf edilmesi için antioksidan savunma sistemleri mevcuttur. Hücre içinde oluşan detoksifikasyon işlemleri genellikle enzimler tarafından gerçekleştirilir. Süperoksid dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH) bu enzimlerden bazılarıdır. Antioksidan sistemin enzimatik olmayan kısmını ise bazı vitaminler (Vit E, Vit C), ferritin, transferin ve haptoglobulin gibi spesifik proteinler oluşturur. Normal şartlarda antioksidan ve oksidan sistem arasında bir denge vardır. Bazı durumlarda oksidatif stresin artması dengenin oksidan tarafa kaymasına yol açar. Bu durum antioksidan sistemin yetersiz olması ya da oksidan özelliğın artması sebebiyle meydana gelebilir (14).

2.2.3. LDL Oksidasyonu

LDL oksidasyonunun, LDL'nin yapısında bulunan PUFA'ların serbest radikaller tarafından oksidasyona uğratılması ile meydana gelmektedir. Antioksidan sistemin etkin olmasından dolayı dolaşımında LDL oksidasyonunun çok az olduğu ve derhal ortamdan uzaklaştırıldığı kabul edilir. Oksidasyon sonucunda meydana gelen okside LDL (oLDL), farklı moleküler yapıya ve fizyolojik özelliklere sahiptir.

LDL oksidasyonun başlaması ile ilgili çeşitli mekanizmalar ortaya konmuştur. Bunlar

- Hücrelerden serbest radikal salınımı
- Hücre membranında oluşan lipid peroksidlerin LDL'ye transferi
- Metal iyonlarının katalizlediği lipid peroksidasyonu
- Membrana bağlı enzimlerin LDL'ye doğrudan etkisi şeklinde sıralanabilir.

LDL oksidasyonunda etkili olan bazı faktörler vardır. Substrat özelliği, ortamın antioksidan içeriği ve partikül büyüklüğü LDL'nin özelliklerine bağlı faktörlerdir. Fosfolipidler PUFA bakımından zengin olup oksidasyona hassastırlar. LDL'nin fosfolipid içeriği özellikle fosfatidilkolin (PC) bakımından zengindir. PC'de daha çok palmitat (18:1), linoleat (18:2) ve araşidonat (20:4) bulunmaktadır. PUFA'ların oksidasyona yakınlığı LDL'nin de oksidasyonunu kolaylaştırmaktadır (14-16).

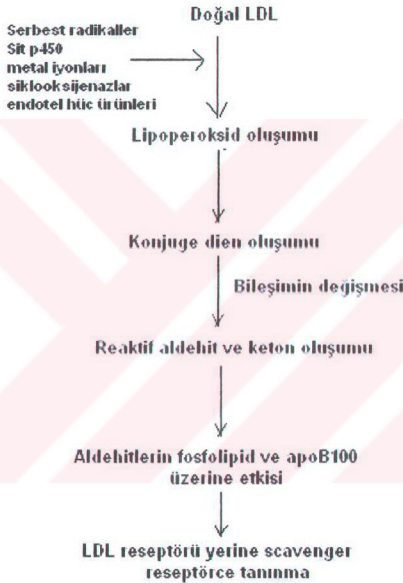
LDL'nin antioksidan içeriğinin azalması oksidan etkiye zaafı artırır. Çoğunlukla, α tokoferol, likopen, ubiñinol-10 gibi antioksidanların oksidan çevrede çabuk biçimde tüketilmesi ile lipid peroksidasyonu başlar. Küçük ve yoğun LDL alt sınıflarının oksidasyona daha duyarlı oldukları gösterilmiştir.

LDL'nin oksidasyonunda kendi özellikleri dışında etkili olan diğer faktörler arasında, hücresel prooksidan kapasitede değişiklikler, ekstraselüler ortamda artmış metal iyonları konsantrasyonu, ekstraselüler antioksidan konsantrasyonu, HDL konsantrasyonu ve LDL'nin subendotelyal bölgede bulunma süresi olarak sıralanabilir.

2.2.3.1. LDL'nin Oksidasyon Mekanizması

LDL'nin antioksidansız kalması ve serbest radikal saldırısına uğraması ile oksidasyon başlar. Lipid içeriğindeki PUFA'lar peroksidasyona uğrar. Meydana gelen lipid radikali konjuge dien oluşumu ile moleküler değişim gösterir. Oksijen molekülü ile reaksiyona girerek lipid peroksil radikali meydana gelir. Bunu lipid hidroperoksidlerinin oluşumu takip eder ve

sonuçta aldehitler, hidrokarbonlar ve hidroperoksitler meydana gelir. LDL'nin yapısındaki ApoB100 ise özellikle MDA'nın etkisi ile üç boyutlu yapısını kaybeder ve küçük parçalara ayrılır. MDA apoB100'ün lizin molekülleri ile hızlı bir şekilde reaksiyona girer. Pozitif yüklü lizin molekülleri, negatif yüklü MDA ile schiff bazı tepkimesini verir. ApoB100'ün bu lizin kalıntıları, doğal LDL'nin reseptör aracılıklı endositozunda önemli role sahiptir. Modifiye olmuş LDL özellikle makrofajlar tarafından çöpçü (scavenger) reseptörleri aracılığı ile alınır. Ancak oLDL bu şekli ile normal metabolizmasını göstermez ve makrofajlarca metabolize edilemez. (16), (şekil 5).



Şekil 5 : LDL oksidasyonunun basamakları (17)

2.2.3.2. oLDL Şekilleri

LDL'nin oksidasyon derecesine bağlı olarak tiplendirmeleri yapılmıştır.

Doğal LDL, yapısında lipid peroksit ve aldehit içermez. LDL reseptörleri aracılığı ile temizlenir.

Hafif Modifiye LDL (MM LDL), biyolojik olarak fonksiyoneldir ancak PUFA ve antioksidan içeriği azalmıştır. Lipid hidroperoksit oluşumunun başlangıç evresindedir.

Orta derecede okside LDL 'de PUFA ve antioksidan miktarları iyice azalmış, apoB100 parçalanmış ve lizolesitinler oluşmaya başlamıştır.

İleri derecede oLDL 'de ise antioksidanlar tükenmiş, aldehit ve ketonlar oluşmuştur. LDL reseptörleri yerine Makrofajlar tarafından çöppü reseptörlerce tanınır ve dahil edilir.

oLDL yapısal olduğu kadar normal fizyolojik özellikleri de değişir. Pek çok hücre için sitotoksik özellik kazanmıştır. Endotel hücreleri ile etkileşimi sonunda Mitojenik kemotaktik protein 1 (MCP-1), adhezyon molekülleri, monosit büyüme faktörleri aterosklerozda rol oynayan gibi pek çok biyoaktif faktörün salınımını uyarır. Aynı zamanda antijenik özellik gösterir. Yapısındaki modifiye apoB100, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA ve 4-HNE hümmoral immün cevaba neden olur. Yapılan çeşitli çalışmalarda bu moleküllerin epitoplarına karşı güçlü cevaplar veren antikorlar tespit edilmiştir (18,19).

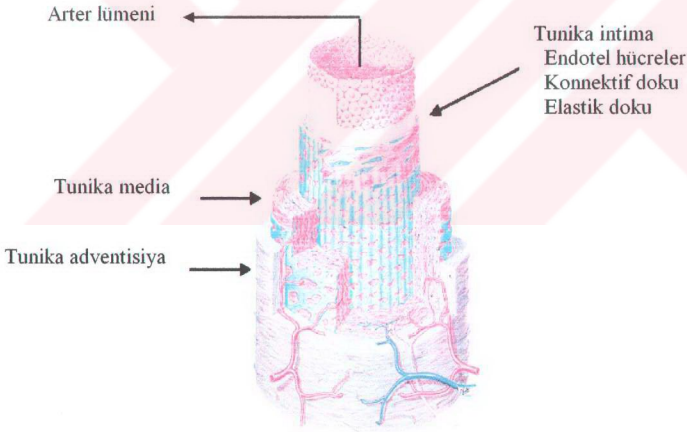
2.2.3.3. oLDL'nin Ateroskleroz'daki Rolü

Endotel disfonksiyonunun ateroskleroz başlangıcında önemli bir etken olduğu kabul edilmektedir. Subendotelyal alanda LDL, endotel, düz kas hücreleri ve makrofajların etkisi ile oksidasyona uğrar. Endotel hücrelerinin çeşitli kemotaktik ve büyüme faktörlerini salgılaması, düz kas hücrelerinin tiyol oto oksidasyonu sonucu serbest radikaller üretmesi ve makrofajların interlökin salgılaması ve intimada birikmesi LDL oksidasyonunu artırır. Okside LDL'nin intimada birikimi ve lipid peroksid ürünleri endotelden LDL alınımını artırır. oLDL makrofajların çöppü reseptörleri tarafından alınır ancak metabolize edilemez ve serbest ve ester kolesterolü birikir. Sonuçta lipid içeriği zengin büyük köpük hücreleri oluşmaya başlar. Arter duvarı kalınlaşır ve kolesterol seviyeleri patolojik değere ulaşarak aterom plakları meydana gelir. Damar lümeni tıkanır. Hidrolitik enzimlerin etkisi ile tromboz gelişebilir (20).

2.3. Koroner Arter Hastalığı (KAH)

Koroner Arter Hastalığı (sinonimleri, Koroner Kalp Hastalığı [KKH], Aterosklerotik Kalp Hastalığı [ASKH]) büyük ve orta büyüklükteki müküler arterleri tutan, yaygın bir hastalıktır. Dünya’da ölüm nedenleri arasında en önde gelmektedir. KAH Avrupa’da, 45 yaş üstü erkeklerde ve 65 yaş üstü kadınlarda ölüm nedeni olarak birinci sırada yer almaktadır. Son zamanlarda Batı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri’nde KAH mortalitesinde azalma olmakla beraber mutlak ölüm oranında bir azalma görülmemiştir.

Bu hastalık, başlıca endotel disfonksiyonu, vasküler inflamasyon, ve damar duvarının intiması içinde lipid, kalsiyum ve kolesterolün yapılanması ile karakterizedir. Bu yapılanmanın sonucunda lipid plaklarının biçimlenmesi, vasküler remodeling, akut ve kronik luminal obstruksiyon, kan akışında anormallikler ve hedef organların oksijen miktarında azalma meydana gelebilir.



Şekil 6: Müküler bir arterin yapısı. Lümeni çevreleyen en iç tabaka intimadır. Burada endotel hücreleri ve hemen altında konnektif ve elastik doku elemanları uzanır. Daha altta tonustan sorumlu düz kas hücreleri gelir (21).

2.3.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz kardiyovasküler hastalıkların başlıca sebebidir. Arter duvarında başlayıp lümenin bazen tamamen tıkanması ile sonuçlanabilen bir süreci içerir. Aterosklerotik hastalıkların altında yatan asıl neden aterom plağının oluşumudur. Aterom plaklar, genel olarak yağlı fibröz lezyonları ile eş tutulur. Bu lezyonların oluşumunda pek çok risk faktörünün etkili olduğu bilinmektedir. Hiperkolesterolemi, hipertansiyon, diabetes mellitus ve sigara içimi bu risk faktörlerinin başında gelmektedir. Yaş ve cinsiyet gibi bireysel özelliklerin de aterosklerozda belirgin etkileri olduğu gösterilmiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, aterom plaklarının sadece yağ ve fibröz doku kaynaklı olup, zaman içinde yavaş biçimde ilerleyerek lümende değişiklik yaptığı görüşünün geçersiz olduğunu ortaya koymuştur. Aterom plak oluşumunun son derece karmaşık ve birbirleri ile ilişkili olabilen mekanizmalara sahip olduğu gösterilmiştir (22).

2.3.1.1. Etyopatogenez :

Aterogenezde rol oynayan hücreler endotel, düz kas hücreleri ve makrofajlar olarak sıralanır. Etyopatogenezini açıklamaya yönelik hipotezlerin hepsinde bu üç hücrenin rolü görülür.

Vasküler endotel hücreleri yapısal olarak basit, ancak fonksiyonel olarak oldukça işlevseldir. Hemostaz içerisinde fibrinoliz, kan basıncının ayarlanması, inflamasyon, lipoprotein metabolizması ve anjiogenez gibi biyolojik süreçlerin belirli dengeler içerisinde gerçekleşmesini sağlar. Arter duvarının ilk tabakasını teşkil eder. Tek katlı ince bir tabaka halinde bulunur. Endotel hücreleri aynı zamanda aterogenezde rol oynadığı düşünülen çok sayıda maddenin ve bağ doku elemanının sentezini de gerçekleştirir. Prostaglandin I₂ (PGI₂), pletelet türevli büyüme faktörü (PDGF), interleükin 1(IL-1), tümör nekrozan faktör alfa (TNF-α), mitojenik kemotaktik protein 1 (MCP1) bunlardan bazılarıdır.

Düz kas hücreleri damarın orta tabakasında yer alır ve asıl rolleri tonusu sağlamaktır. Aterosklerozda intima kadar uzanabilirler ve normal fizyolojik davranışlarının dışında çıkarak PDGF gibi mitojenlere cevap verirler.

Makrofajlar fagositoz yeteneği olup ve monositlerden türevlenirler. Endotel hasarını ve/veya oLDL'nin etkisi ile endotel tarafından salınan kemotaktik maddelerin etkisi ile intima çekilir. Monosit koloni stimülen edici faktörün etkisi ile makrofaja dönüşür.

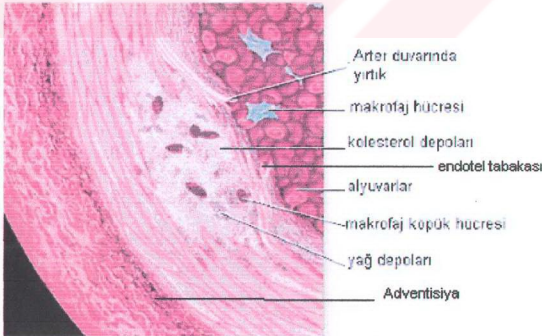
oLDL'nin değişime uğramış apoB100 proteinini tanıyan çöppü reseptörleri ile oLDL'yi alır ve ileri aşamada köpük hücelere dönüşür. Bu üç hücre dışında T-lenfositleri gibi bazı immün sistem hücrelerinin de aterogeneze rolü olabileceğine yönelik bulgular mevcuttur. Özellikle oLDL'nin antijenik etki göstermesi ve bunlara karşı otoantikör oluşumu bu bulguları desteklemektedir.

Ateroskleroza başlatan esas olayın ne olduğu kesin olarak ortaya konmuş değildir. Ancak aterosklozozun etyopatogenezi ile ilgili kabul gören iki hipotez vardır:

- Hasara yanıt hipotezi
- Modifiye lipoprotein hipotezi (22,23).

Hasara yanıt hipotezinde ateroskleroza başlatan sebep endotel disfonksiyonudur. KAH ile ilgili risk faktörlerinin hemen hepsi (sigara, diabet, hipertansiyon yaşlanma....) endotel fonksiyon bozukluğuna sebep olabilir. Seçici geçirgenlik ve antitrombotik özellik kaybolur ve inflamasyon ve bunu takiben proliferasyon aterom plak oluşumuna dek uzanan zincirleme reaksiyonları başlatır.

Modifiye lipoprotein hipotezinde ise LDL oksidasyonu aterogenezi başlatan faktördür. LDL'nin intimada kalış süresi ve oksidasyona uygun ortam bulunması belirleyici etmenlerdir. Artmış oksidatif stres, endotel, düz kas ve makrofajların etkisi, serbest radikal üreten sistemler LDL oksidasyonunu başlatır. Bu hipotezde de sonuçta köpük hücre ve aterom plak meydana gelir(23) ,(şekil 7).



Şekil 7 : Aterosklerotik bir lezyon(24).

Aterogenezin temel basamakları:

1- Endotel disfonksiyonu

- Vazodilatasyonun bozulması, NO sentezinin azalması
- Endotelin düzeyinin artışı, vazokonstriksiyon gelişimi
- Endotel bariyerinin bozulması ve geçirgenliğin artması
- Yüksek kolesterol düzeyinin serbest radikal salgılanmasını arttırması

2- LDL oksidasyonu

- Oksidan – antioksidan dengenin oksidan tarafa kayması
- LDL'nin intimaya geçişinin ve burada kalış süresinin artması
- Endotel düz kas ve makrofaj hücrelerinin oksidatif etkisi
- Mediatörlerin salınımı, adhezyon moleküllerinin(ICAM, VCAM) üretiminin artması büyüme faktörleri ve sitokin salınımının uyarılması
- Monosit göçünün ve makrofaj oluşumunun artması

3- Köpük hücre oluşumu

- Malondialdehitin apoB100'ün yapısını değiştirmesi
- Bu haliyle oLDL'nin makrofaj çöpçü reseptörlerince tanınması
- oLDL'nin fagositozu. Kolesterol çöpçü reseptörlerde down regülasyona neden olmaz. Kolesterol birikmeye başlar
- Köpük hücrelerinin oluşumu

4- Lipid çekirdeğinin oluşumu

- Artmış lipid içeriği köpük hücresinin dışına taşmaya başlar.
- İntima tabakasının bağ dokusu içinde kolesterol, esterol kolesterol ve hücre yıkım ürünleri ile dolu boşluklar meydana gelir.

5- Fibröz kapsül oluşumu

- Kas hücreleri ve bağ dokusu, olgunlaşan aterom plağın lipi çekirdeğinin üzerini örtmesi.
- Büyüme faktörlerinin uyarısı ile medyadan düz kas hücre göçü ve proliferasyonun gerçekleşmesi (25-27).

2.3.2. HDL ve Ateroskleroz

HDL, plazmada LDL'den sonra en fazla kolesterol taşıyan ikinci lipoproteindir. Diğer lipoproteinlerin aksine kolesterol , kolesterol esterleri, fosfolipid ve trigliseritlerin dokular ve lipoproteinler arasında alışverişini sağlayarak ters yönde kolesterol taşınımı denen bir yolla

dokularda lipid birikimini engeller. Aynı zamanda yapısında bulunan platelet aktive edici faktör asetil hidrolaz (PAF-AH), paraoksonaz, likopen, vit E, gibi antioksidanlar sayesinde oksidasyona karşı koruyucu rolü olduğu bilinmektedir. HDL endotel üzerinde geniş etkilere sahip olup endotel hasarının oluşmasını engeller. Bütün bu özellikleri HDL'nin önemli bir anti aterosjenik molekül olmasını mümkün kılar. Koroner arter hastalığı risk faktörleri arasında HDL kolesterolünün (HDL-K) düşüklüğü en önemli risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda HDL-K düşüklüğü ile KAH arasında güçlü bir ilişki ortaya konmuştur (28,29).

2.3.2.1. Ters Yönde Kolesterol Taşınımı

HDL lipid ve protein içeriği bakımından alt tiplere ayrılır. Yeni sentezlenen HDL (pre β 1 HDL), 2 yada 3 adet apoAI ve bunların etrafını çevrelemiş olduğu ince bir fosfolipid tabakasından ibarettir ve bu HDL tipi mükemmel bir kolesterol alıcısıdır. HDL'nin ekstra hepatik dokularda lipid alışverişini sağlayan iki önemli reseptör vardır. Bunlar ATP binding cassette transporter protein 1 (ABCA1) ve çöpçü reseptörü sınıf B tip I (SR-BI)'dir. HDL ABCA1 vasıtası ile ekstrahepatik hücrelerden serbest kolesterol, fosfolipid ve hatta sfingolipid alır. ABCA1 reseptörüne bağlanmasında apoAI rol oynar. SR-BI makrofaj ve makrofaj olmayan periferik hücrelerden HDL'ye serbest kolesterol transferini sağlar. Kaveola gibi bazı özelleşmiş membran yapılarının bu reseptörler bakımından zengin olduğu gösterilmiştir.

HDL'nin almış olduğu serbest kolesterol, LCAT tarafından derhal esterleştirilir. Bununla beraber HDL, ester kolesterolünün bir kısmını ve bazı apolipoproteinlerini apoB içeren lipoproteinlere aktarır ve onlardan trigliserit alır. Bu alışverişte kolesterol ester transfer protein (CETP) rol oynar. Bu alışverişler HDL alt tiplerinin birbirine dönüşümleri de söz konusudur. Bu durum HDL'nin plazma ömrünü uzattığı gibi kolesterol akışının devamı için gereklidir. Örneğin serbest kolesterolün LCAT tarafından esterleştirilmesi dokulardan plazmaya kolesterol akışını artırır. CETP tarafından HDL kolesterol esterinin diğer lipoproteinlere aktarılması HDL nin yüksek kolesterol alıcısı olduğu alt tiplere geri dönüşümünü sağlar.

2.3.2.2. HDL ve Endotel Fonksiyonları

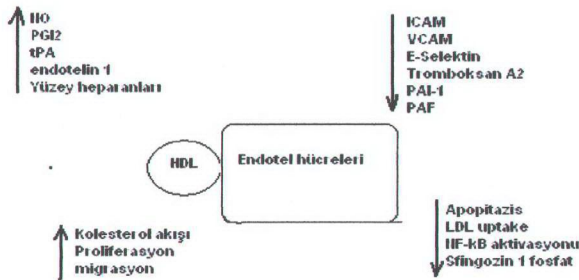
NO (Nitrik oksid) endotel hücre kaynaklı nitrik oksid sentaz (eNOS) enziminin çeşitli uyarılara karşı üretilir. Çok kısa ömürlü olmasına rağmen düz kaslarda guanilat siklaz aktivasyonu yoluyla güçlü vazodilatatif etkiye sahiptir. NO aynı zamanda endotele trombosit agregasyonunu ve lökosit adhezyonunu engeller. Endotel hücresinin LDL gibi aterosjenik ajanlarla karşılaşması disfonksiyona neden olur. HDL zengin antioksidan içeriği ile bu ajanların endotel hücresine etkilerini sınırlar. NO'nun antioksidan özellik kazanmasını engeller (28,29).

PAF (Platelet aktive edici faktör) platelet agregasyonuna ve düz kas kontraksiyonuna neden olur. HDL PAF'ın sentezini inhibe eder. Bunu PAF-AH'tan bağımsız bir mekanizma ile yaptığı düşünülmektedir.

Prostasiklin (PGI₂) NO gibi düz kas dilatasyonuna neden olur. HDL endotelin PGI₂ sentezini düzenler.

Doku plazminojen aktivatör (tPA) ve Doku plazminojen aktivatör inhibitör 1(PAI-1) endotel tarafından fibrinolizisin regülasyonunu sağlamak amacı ile sentezlenir. oLDL birbirlerine oranı önemli olan bu maddelerin konsantrasyonlarını değiştirir. HDL ise tersi bir etki göstererek koruyucu rol oynar.

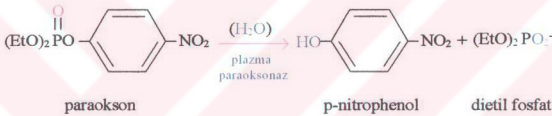
Kolesterol Dengesinin sağlanması endotel hücrelerinin fonksiyonunu sürdürabilmesi ve yapısal bütünlüğünün korunması bakımından gereklidir. Artmış kolesterol içeriği LDL üzerinde ve intimal alanda oksidatif etki yapacaktır. HDL ters yönde kolesterol taşınımı ile fazla kolesterolün endotelde birikmesini engeller (30,31) ,(Şekil 8).



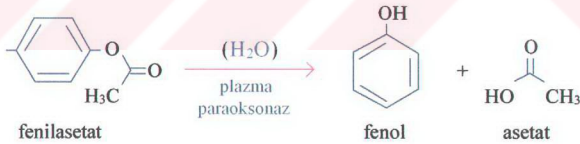
Şekil 8 : HDL ve Endotel üzerine etkileri(30).

2.4. Paraoksonaz (PON1) :

Paraoksonaz (E.C. 3.1.8.1.) ilk kez 1953 yılında Aldridge tarafından tanımlanan ve enzim sınıflamasına dahil edilen bu enzimin, organofosfat insektisidlerinin hidrolizinde görev yaptığı tespit edilmiştir. 1961’de Uriel, paraoksonazın insandaki varlığını ortaya koymuştur. İsmi memeli mikrozomlarda P450 sistemi tarafından paratiyonun biyotransformasyona uğratılması ile meydana gelen paraoksonu hidroliz edebilmesinden almıştır (32). Paraokson stabil bir bileşik olup kolinesterazlara bağlanmak sureti ile onları güçlü bir şekilde inhibe eder. Paraokson bir grup arilesteraz ve/veya paraoksonaz enzimlerince hidrolize edilir. Bu enzimler plazma ve karaciğerde bulunur ve fosfoester anhidrid bağlarını kesmek sureti ile hidrolize eder. Ca^{+2} bağımlı olması bakımından diğer aril esteraz enzimlerinden farklılık gösterir (şekil 9, 10).



Şekil 9. PON1’in paraoksonu hidrolizi (paraoksonaz aktivitesi)



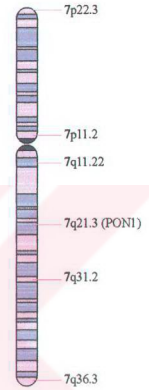
Şekil 10 . PON1’in fenilasetatı hidrolizi (arilesteraz aktivitesi)

Paraoksonaz bir multigen ailesi üyesidir ve PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç gen tanımlanmıştır. Bu üç gen 7. kromozomda birbirlerine bitişik olarak yerleşmişlerdir. Bunlardan sadece PON1 plazmada bulunurken diğer ikisinin ürünleri hücrelidir. PON1 genetik polimorfizm göstermektedir ve bu da enzimin aktivitesine trimodal bir etki olarak yansımaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda polimorfizmin enzim aktivitesinde substrat bağımlı olduğu ve etnik farklılıklara göre değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir (32-35).

Paraoksonazın organofosfat insektisidlerinin detoksifikasyonundaki rolünün yanı sıra daha sonraları antioksidan bir etkiye sahip olabileceği ileri sürülmüş ve bu konuda çalışmalar yapılmıştır. Mackness ve arkadaşları paraoksonazın plazmada HDL ve apoAI ile ilişkili olduğunu ortaya koydular. HDL'nin ters yönde kolesterol taşınımındaki rolü ve antiaterojenik özelliği dikkate alınarak paraoksonazın koroner arter hastalığında muhtemel bir rolü olabileceği düşünülmüş ve bu alanda geniş çalışmalar yapılmıştır.

2.4.1.Paraoksonaz Geni :

Paraoksonaz gen familyası üç genden oluşmaktadır. PON1, PON2 ve PON3. Her üç gen de 7. kromozom üzerinde lokalizedir. PON1 7. kromozomun uzun kolunda, 21. gen bölgesinde (7q21.3) yerleşmiştir (şekil 11).



Şekil 11: 7. kromozomda PON geni

2.4.2.Paraoksonaz Proteini :

PON1, 355 amino asid içeren 43 kDa ağırlığında bir proteindir. Yapısında lösin içeriği fazladır. Sahip olduğu üç sistein kalıntısından 42 ve 352. pozisyonda bulunanlar arasında bir disülfid bağı varken diğeri serbest haldedir ve bu üçüncü sistein rezidüsünün substrat oryantasyonu ve bağlanması için gerekli olduğu ifade edilmektedir (şekil 13). PON1 259, 270. ve 324. pozisyonlardaki aminoasidler üzerinden glikozilasyona uğrar (GlcNAc). Total ağırlığının %15.8'ini karbonhidrat içeriği oluşturur. İzoelektrik noktası 5.1 olan paraoksonazın üç boyutlu yapılanması henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. Enzim iki adet kalsiyum bağlama bölgesine sahiptir ve hidroliz aktivitesi için bunlara gerek duyar. Yine sahip olduğu 5 histidin rezidüsü ile 281. pozisyonundaki triptofanın enzim aktivitesi için gerekli olduğu düşünülmektedir (33).

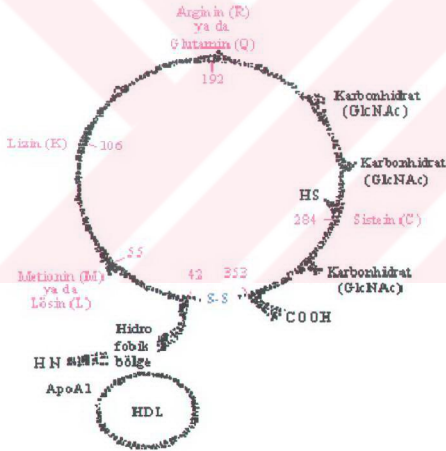
PON1 , PON2 ve PON3'ün kodladıkları aminoasit içeriğinin %65'i benzerdir. PON1 ve PON3 başlıca karaciğerde sentezlenirken PON2 beyin, karaciğer, böbrek ve testislerde ekspresse edilir. PON1 ve PON3'ün HDL ile ilişkili oldukları belirtilirken bu ilişki PON2'de bulunamamıştır (33).

```

1 maklialtll gmglalfrnh qssyqtrlna lrevqpvelp ncnlvkgiet gsedleilpn
61 glafissgk ypgiksfnpn spgkillmdl needptvlel gitgskfdvs sfnpghgistf
121 tdednamyll vvnhdakst velfkfqeee kslhlktir hklpnlndi vavgpehfyg
181 tndhyfldpy lqswemylgl awsyvvyysp sevrvaegf dfanginisp dgkyvyiael
241 lahkihvyek hanwtltplk sldftlvdn isvdpetgdl wvgchpngmk iffydsenpp
301 asevlriqni lteepkvtqv yaengtvlgg stvasvykgk lligtvfhka lycel

```

Şekil 12 : Paraoksonazın aminoasit dizilimi



Şekil 13 : PON1'in yapısı ve HDL ile yapısal ilişkisi

2.4.3. Paraoksonazın Fonksiyonları

PON1'in tespit edilen ilk fonksiyonları toksik organofosfatlı bileşiklerin hidrolizidir. Örneğin sitokrom p450 sisteminde normal metabolizma sonucu olarak meydana gelen

paratyon, paraoksonaz aktivitesi ile paranitrofenol ve dietil fosfata hidroliz olur. Bazı lakton ve aromatik karbonat esterlerinin, statin türü ilaçların hidrolizini de gerçekleştirir(36). PON1'in LDL'nin oksidasyonunu enzimatik olarak engellediği ve anti aterosjenik özellik gösterdiğine dair çalışmalar da mevcuttur (37). oLDL'nin lipid peroksidlerinin hidrolizi ve lizofosfotidil kolinin ortamdan uzaklaştırılmasında rol oynadığına dair sonuçlar gösterilmiştir.

2.4.4. Paraoksonazın Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Serum paraoksonaz aktivitesini belirleyen en önemli unsur, Q192R polimorfizmdir. Bundan başka yaş, cinsiyet, fiziksel aktivite, sigara içimi, vücut kitle indeksi (BMI), enerji durumu besin içeriği (total lipidler, doymuş yağ asitleri, β karotenler, vitamin C gibi) ve serum lipid konsantrasyonları PON 1 aktivitesi üzerinde etki gösterirler. Tip II diyabette ve ailesel hiperkolesterolemide PON1 aktivitesi düşük bulunmuştur (37).

2.4.5. Paraoksonaz ve Klinik Önemi

İnsanda hem paraoksonaz hem de arilesteraz aktivitesine sahip tek enzim olan paraoksonazın büyük bir kısmı Apo AI ve ApoJ içeren HDL'ye bağlı olarak bulunmaktadır. HDL'nin KAH'na karşı koruyucu role sahip olması ve düşük HDL kolesterol düzeylerinin KAH için en önemli risk faktörü sayılması, HDL ile ilişkili PON'un da KAH'da rolü olabileceğini düşündürmüştür. PON1'in KAH'da koruyucu rolü olabileceği ve bunun LDL oksidasyonunu engelleyerek gerçekleştirebileceği düşüncesine dayanılarak ilk çalışmalar Mackness tarafından gerçekleştirilmiştir.

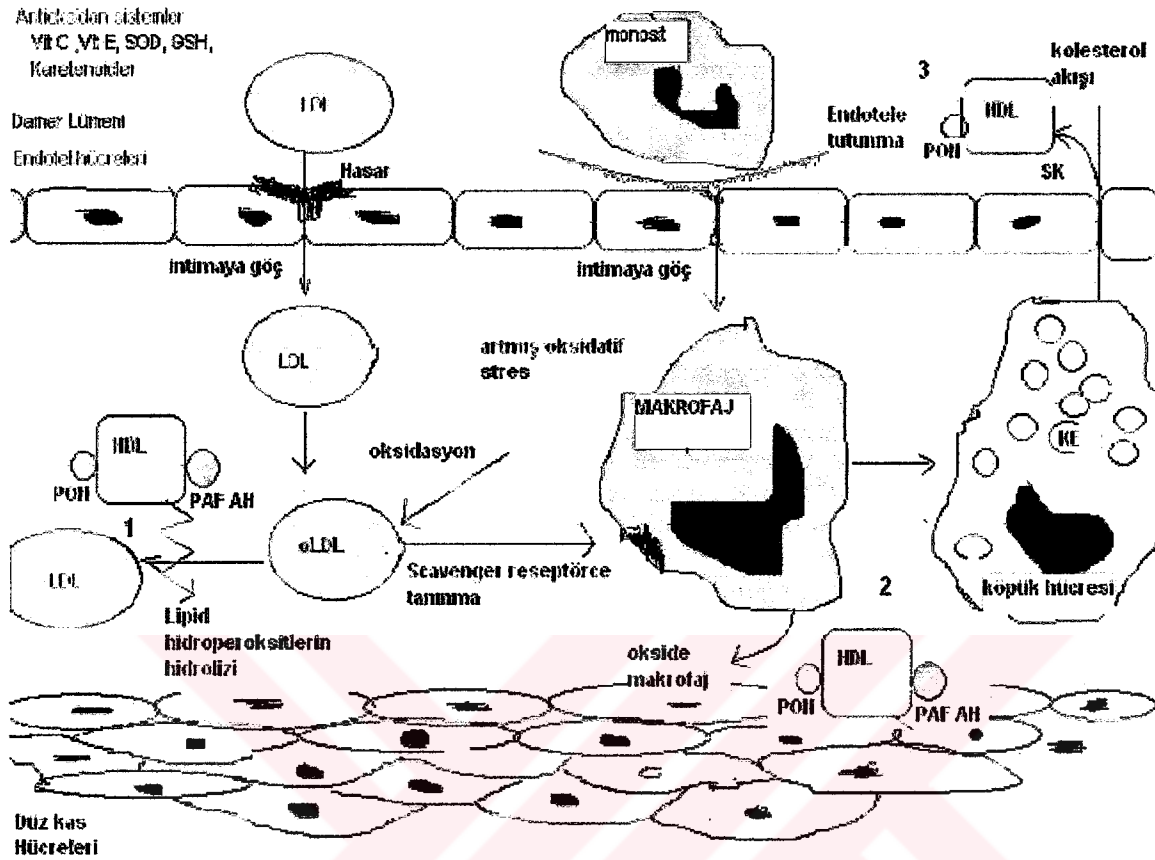
Paraoksonazın HDL ve LDL oksidasyonuna karşı koruyucu rolü gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. İn vitro şartlarda ortama HDL veya saflaştırılmış serum paraoksonazı ilave edildiğinde Cu^{+2} ile indüklenmiş lipoprotein oksidasyonunun inhibe olduğu görülmüş (38); PON1'e spesifik yarışmasız inhibitörler varlığında Cu^{+2} veya serbest radikal üreten sistemler tarafından indüklenen HDL oksidasyonunun arttığı gözlenmiştir. İnfluenza A ile enfekte edilmiş farelerde HDL kolesterol ve apoAI düzeyleri ile paraoksonaz aktivitesinin beraber arttığı görülmüştür. İnflamasyonun KAH için önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir.

Bununla birlikte LDL oksidasyonuna karşı paraoksonazın koruyucu mekanizmasının nasıl işlediği açık değildir. Paraoksonaz peroksidatif role ve fosfatidilkolin izoprostan ve 2. pozisyonlarında (sn-2) C9 ve C5 çekirdek aldehitleri veya asitleri içeren fosfatidilkolinleri

hidroliz yeteneğine sahiptir. Bu şekilde serbest aldehit veya asitlerin ve lizofosfolipidlerin oluşumuna yardımcı olur. Bununla birlikte bunların linoleat veya araşidonat prekürsörlerinin yada hidroperoksi veya hidroksi türevlerinin serbestleşmesini sağlamaz. PON1 aynı zamanda fosfolipaz A2 aktivitesine sahipmiş gibi görünmektedir ki bu makrofajlardan çoklu doymamış yağ asitlerinin ve lizofosfatidilkolinin ayrılması ile sonuçlanır. Bu köpük hücre oluşumunu geciktirir veya engeller (38-40).

PON1'in okside LDL ve bu LDL'nin yapısındaki okside lipidler üzerine antioksidatif etkisinin dolaylı biçimde gerçekleşebileceğini açıklayan çalışmalar da vardır. Örneğin PON1'in endotel hücrelerine monosit adhezyonunu endotelden sentezlenen mitojenik kemotaktik protein 1 (MCP 1) sentezini inhibe ederek durdurduğu gösterilmiştir (41), (şekil14).





Şekil 14 : Aterosklerozda HDL ve Paraoksonazın Koruyucu Rolü. Kan dolaşımındaki antioksidan sistemler varlığında LDL'nin oksidasyonun gerçekleşmediği ya da kalıcı olmadığı belirtilmektedir. Oksidatif stresin arttığı ve oksidan-antioksidan dengenin oksidant tarafa kaydığı durumlarda LDL ve monositler arter duvarını geçerler. LDL ekstraselüler matriks proteoglikanlarına bağlanır ve ortamdaki oksidan ajanlar tarafından okside edilir. oksidasyonun uzunluğu vit E, β karoten , likopen ve flavinoidler ile LDLlipidleri arasındaki dengeye bağlıdır. Yine, makrofajlardaki oksidatif durum hücresel oksijenazlar ile (NADPH oksidaz gibi) antioksidanlar (glutatyon sistem [GSH]) arasındaki dengeye bağlıdır. LDL oksidasyonu geri dönüşümsüz noktaya geldiğinde makrofajların scavenger reseptörlerince tanınır. Ancak LDL içeriği normal yollardan metabolize edilemez ve bu da köpük hücre oluşumuna yol açar. HDL ile ilişkili PON oLDL'deki spesifik lipid peroksidleri hidrolize ederek LDL'yi aterojenik olmayan forma dönüştürür (1). Yüksek oLDL konsantrasyonu PON'u ve diğer antioksidanları inhibe edebilir. Dolayısı ile azalmış oLDL PON aktivitesinin korunmasını sağlar. Artmış oksidatif koşullar makrofajların da oksidasyonuna sebep olabilir. HDL ilişkili PON lipid peroksidlerin hidrolizi ile makrofaj aterojenitesini önler (2). Ters yönde kolesterol taşınımı sağlanarak dolaşımda okside olmayan doğal (nativ) HDL'nin varlığı devam ettirilir ve (3) köpük hücrelerinden HDL aracılıklı kolesterol akışı sağlanır (42).

2.4.6. PON Polimorfizmi ve KAH ile İlişkisi

PON1 gen polimorfizmi ve bunun PON aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili ilk çalışmalar Humbert ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (35) . Bu araştırmacılar çalışmalarında Gln192Arg ve Met155Leu polimorfizminin PON aktivite polimorfizmine sebep olduğunu ve ortaya birbirinden farklı aktiviteye sahip 3 genotipin çıktığını göstermişlerdir. Gln192Arg polimorfizminde iki allelin kombinasyonu ile oluşan bu genotipler

QQ homozigot (Gln/Gln)

OR heterozigot (Gln/Arg)

RR homozigot (Arg/Arg) olarak tanımlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda en düşük PON aktivitesinin QQ genotipinde, en yüksek aktiviteninse RR genotipinde olduğu tespit edilmiş, QR genotipinde ise ortalarında bir aktivite görülmüştür (43,44). Aynı şekilde Met55Leu polimorfizminde en düşük aktivitenin MM genotipinde, en yüksek aktiviteninse LL genotipinde olduğu belirlenmiştir.

PON gen ve aktivite polimorfizmlerinin KAH ile ilişkisine yönelik çeşitli ülkelerde değişik ırklar ve populasyonlar üzerinde pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında gen polimorfizmi ile KAH arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiş (42,43.) ancak çoğunda böyle bir ilişkiye rastlanmamıştır (43-48). PON aktivitesinin KAH ile ilişkisine yönelik çalışmaların sonuçları ise çelişkilidir. PON aktivitesi bireyler arasında 40 kata varan farklılıklar gösterebilmektedir. Mackness ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada koroner arter hastalarına kıyasla sağlıklı grupta PON aktivitesi %20 daha düşük bulunmuştur. İn vitro ortamda okside edilmiş LDL üzerine 192R ve 192Q alleli içeren PON ilave edilmesi ile oksidasyona karşı allellerin aktivitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada R allelinin aktivitesi yüksek bulunmuştur. Yüksek aktiviteli R allelinin KAH ile ilişkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Bazı araştırmacılar (Mackness , Aviram) PON gen polimorfizminden ziyade aktivite polimorfizminin KAH ile ilişkisinin belirlenmesinde daha etkili olabileceğini belirtmektedirler (42). Çalışmamızda başlıca dört nokta amaçlanmıştır. Bunlar :

- 1- İnsan paraoksonaz geninde (HUMPONA) Q192R gen polimorfizminin ve dolayısı ile allel dağılım ve frekanslarının tayini
- 2- Q192R gen polimorfizmi ile enzim aktivitesi arasındaki ilişkinin tespiti
- 3- Q192R gen polimorfizmi ile enzim aktivitesinin KAH ile ilişkili olup olmadığının tespiti
- 4- LDL oksidasyonuna karşı PON1'in koruyucu rolü olup olmadığını belirlemektir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Buz Dolabı	(Arçelik)
Buz makinesi	(Scotsman AF-10)
Cam malzemeler	(Corniks)
Deiyonize Su Cihazı	(Barnstead)
Derin Dondurucu	(-85 °C Ultra /sw Freezer, Naure)
Elektrofez tankı (yatay)	(Orange Scientific GYNODISC)
Elektroforez tarakları	(Orange Scientific GYNODISC)
Eppendorf Tüpleri	(0.2, 0.6, 1.5 mL Oxygene)
Etüv	Memmert
Güç kaynağı	Thermo (EC 240-90)
Hassas terazi	(MP-300, Elektronik Balance, CHYO)
Havalandırma kabini	(Heraus)
Mikrodalga Fırın	(BEKO)
Karıştırıcı	(Autovortex Mixer SA2)
Kuartz küvetler	(SIGMA)
Magnetik karıştırıcı	(IKA Labortechnik)
Nefelometre	(Behring Nephelometer; BN II)
Otoanalizör	(HITACHI, modüler sistem,)
Otoklav	(Medexport)
Otomatik kan sayım cihazı	(Coulter, STKS)
Paloroid Kamera	(Gel Cam)
pH metre	(HANNA Instruments 8416)
Santrifüj	(Labofuge 200, HERAUS)
Sıcaklık ayarlayıcısı	(CPS-Controller, SHIMADZU)
Spektrofotometre	(UV-1601,UV Visible Spectrophotometer, SHIMADZU)
Thermocycler	(T-Personal BIOMETRA)
Transillüminatör	Wilbert
Yarı Otomatik Mikropipetler	(fFinn pipet, Scorex)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Alw I Restriksiyon Endonükleaz	NEB
Alw I Enzim Tamponu	NEB
Amonyum asetat	Sigma
Borik asit	Merck
Deoksi Nükleotid Trifosfatlar (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	Promega
DNA ϕ 174 Hinf I Marker	Promega
Etanol (%98 ve %70'lik)	
Etidyum bromür	Applichem
Etilendiamin Tetra Asetik Asit (disodyum tuzu [Na ₂ EDTA])	AppliChem
Fenil Asetat	Sigma
Kalsiyum Klorür	Merck
Magnezyum Klorür	Promega
Nusieve(GTG) Agaroz	Cambrex
Paraokson	Sigma
Primer I (forward)	Sentez
Primer II (reverse)	Sentez
Proteinaz K	Sigma
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Merck
Sodyum Hidroksit	Merck
Taq DNA Polimeraz	Promega
Taq DNA Tamponu	Promega
Tris Base	Merck
Tris HCl	Ambressco

3.2. Metotlar

3.2.1. Deneyin Planlanması ve Numunelerin Toplanması

Bu çalışma KTÜ Tıp Fakültesi Biyokimya ve Kardiyoloji Anabilim Dallarının ortak çalışmasıdır. Hasta grubu (KAH), Kardiyoloji Anabilim Dalı'na 2000-2003 yılları arasında başvuran ve anjiyoları sonucunda koroner arter hastalığı teşhisi konan 101 hastadan (76 erkek, 25 kadın) oluşturuldu. Hastaların obezite, diyabet, hipertansiyon, pozitif aile hikayesi, yaş, cins, boy, kilo, anjio ve eko bulgularını içeren bir hasta takip ve bilgi formu oluşturuldu. Hastalarda, yaygın tutulum gösteren 3 damardan en az birinin %50 stenoz göstermesi KAH için pozitif vaka olarak değerlendirildi.

Kontrol grubu Trabzon ili ve çevresinde yapılan taramalar ile KTÜ Tıp Fakültesi öğrencileri ve çalışanlarından ve sağlıklı kişi polikliniğine başvuranlar arasından toplam 254 kişiden (152 erkek, 102 kadın) oluşturuldu. Koroner arter hastalığı, hipertansiyon veya diabeti olanlar, sistemik hastalığı olanlar ve bu nedenle sürekli ilaç kullananlar, kontroller sırasında yüksek tansiyon bulgusu gösterenler, obezler, bu gruba dahil edilmedi. Sağlıklı grup oluşturulurken, bazı KAH risk faktörlerinin yaşla ilişkisini tespit edebilmek için geniş bir yaş aralığı oluşturuldu (14 – 80 yaş). Bireylere ait bir takip formu oluşturularak kan alınımından önce bireylerin hikayeleri alındı, tansiyon, bel/kalça, boy ve kilo ölçümleri yapıldı. Bireylere çalışma hakkında bilgi verilerek izinleri alındı. 18 yaşın altında olanların velilerinden yazılı izin alındı. Demografik özellikler dikkate alınarak sağlıklı grup içinden KAH grubuna eş bir kontrol grubu oluşturuldu (90 erkek, 24 kadın).

Bir gecelik (10-12 saatlik) bir açlıktan sonra hasta ve kontrol grubundaki bireylerden biyokimya parametreleri, PON aktivitesi ve oLDL antikor tayini için antikoagülansız, DNA izolasyonu için EDTA'lı tüplere brakial venden yaklaşık 20 mL venöz kan alındı. DNA izolasyonu için alınan tüpler hariç diğer tüpler oda sıcaklığında 3000 rpm'de santrifüj edilerek serum ve plazma elde edildi. Günlük analizler dışında kullanılacak numuneler ependorf tüplere pipetlenerek – 70 °C'de saklandı.

3.2.2. Otoanalizörlerde Tayini Yapılan Parametreler

Serum total kolesterol (TK), trigiserit (TG), HDL-kolesterol (HDL-K), LDL-kolesterol (LDL-K), alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST), glukoz, kan üre azotu

(BUN), ve kreatin, tayinleri Hitachi otoanalizöründe orjinal Roche kitleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Apolipoprotein A I (ApoA I), apolipoprotein B (ApoB), lipoprotein (a) [Lp(a)] tayinleri Dade Behring Nefalometre (BN II Germany) cihazı ile monoklonal immünopresipitasyon prensibine dayanılarak yapıldı.

Tüm otoanalizör çalışmaları günlük kalite kontrol uygulamalarının ardından yapıldı.

3.2.3.Paraoksonaz Enzim Aktivitesinin Tayini

Prensip : Serum paraoksonazı, paraoksonu (O,O-dietil-O-p-nitrofenol fosfat) hidrolize ederek dietil fosfat ve p-nitrofenole ayırır. p-nitrofenolün 405 nm'deki absorbansı PON aktivitesi ile orantılıdır.

Substratın Hazırlanması

100mM Tris HCl (pH : 8: 00)

1 mM CaCl₂

1 mM Paraokson

15,7 g Tris HCL bir miktar distile suda çözüldü. pH : 8.00 'a ayarlandıktan sonra distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Bu çözeltiden bir miktar alınarak içinde 0.027 g CaCl₂ ve 75 µL paraokson çözüldü ve aynı tamponla 250 mL'ye tamamlandı.Bu çözelti numuneler çalışılacağı zaman taze olarak hazırlandı.

Silika küvetler içine 45 µL serum üzerine 855 µL substrat ilave edilerek 25 °C'de 405 nanometre dalga boyunda spektrofotometrede 1., 2., 3. ve 4. dakikalarda kinetik okumaları yapıldı. Delta absorbans alınarak aşağıdaki formülde yerine kondu ve enzim aktiviteleri hesaplandı.

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A}{Dk} \times \frac{Vt \times 10^6}{\epsilon \times l \times Vs}$$

Vt : Toplam reaksiyon hacmi (mL)

Vs: Numune hacmi (mL)

ε : Molar absorptivite katsayısı (405 nm için 18053 M⁻¹ cm⁻¹)

l : ışık yolunun uzunluğu (cm)

3.2.4.Okside LDL Antikoru (oLAb) Tayini

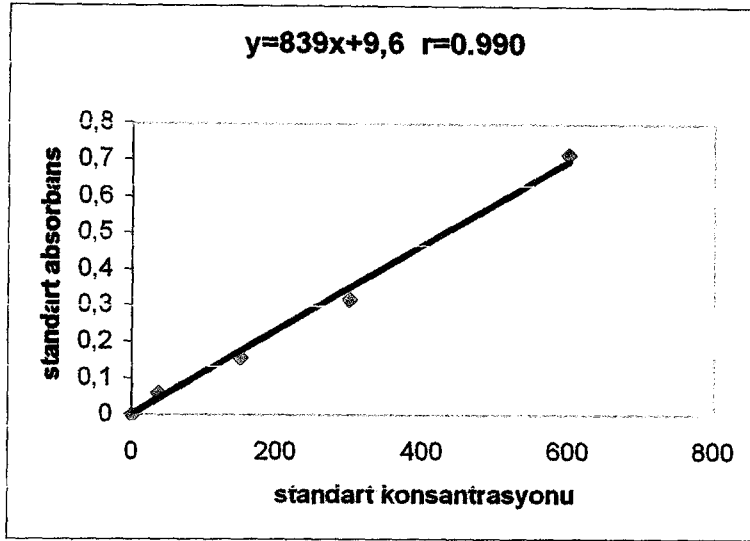
oLAb tayini ELISA yöntemi ile ticari kit kullanılarak yapıldı (Biomedica Avusturya Kat. No BI 20032). Bu metotda oksitleyici ajan olarak Cu^{+2} kullanılmıştır. ELISA pleytindeki mikro kuyucuklar Cu^{+2} ile oksidlenmiş LDL ile kaplanmıştır ve ortama seyreltilmiş serum örnekleri ilave edilir. Eğer serumda antikor varsa antijenine özgül olarak bağlanacaktır. Yıkama adımından sonra spesifik bir peroksidazla konjuge olmuş anti insan IgG antikoru, bağlanmış otoantikorları tespit edecek ve ikinci bir yıkama fazından sonra bu antikorlar dışındaki konjugatlar ortamdan uzaklaştırılacaktır. Kromojenik substratın ortama ilave edilmesi ile oluşan renk şiddeti numunedeki antikor konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bu renk şiddeti bir ELISA okuyucusu tarafından okunur ve konsantrasyon hesaplanır.

3.2.4.1.ELISA Uygulaması

1. İçine 200 μL assay tamponu pipetlenmiş dilüsyon pleytinde (pleyt 1), kendileri için belirlenmiş kuyucuklara 50'şer μL standart, kontrol ve numuneler pipetlendi (ön dilüsyon). İlk iki kuyucuk kör olarak işaretlendi.
2. Bu pleytten ön dilüsyonu yapılan kör, standart, kontrol ve numunelerden 20 'şer μL alınarak antijen kaplı pleytlerin içine 200 μL assay tamponu pipetlenir.
3. Pleyt 2'nin üzeri örtülerek 90 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
4. Pleyt yıkayıcıda 4 kez 300 μL yıkama tamponu ile yıkandı.
5. Bütün kuyucuklara 100 μL HRP işaretli konjugat eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
6. Seyreltik yıkama tamponu ile 4 kez yıkama işlemi yapıldı. Bütün kuyucuklara substrat (tetrametil benzidin [TMB]) eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
7. Reaksiyon durdurma çözeltisi (H_2SO_4) ilave edildi.
8. Elisa okuyucusunda 450 nm dalgaboyunda 650 nm referans filtreye karşı optik dansiteleri okundu.

Sonuçların Hesaplanması :

Elde edilen standart grafik yardımı ile (şekil 15) oLAb miktarı mU/mL cinsinden tayin edildi.



Şekil 15 : oLAb standart Grafiği

PON aktivite ve OLDL tavininde elde edilen varvasvon katsayıları tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3 : Kullanılan metotların varvasvon katsayıları

Parametre	Serum %CV
PON aktivitesi (nmol/mL/dk)	6,7 n= 10
oLAb (mU/mL)	7,8 n= 5

3.2.5.PON1 Gln192Arg Gen Polimorfizminin Tespiti

3.2.5.1.DNA İzolasyonu

DNA İzolasyonunda Kullanılan Cözeltiler

1. Nüklei Lizis Tamponu (pH 8.2)

10 mM Tris Base

400 mM NaCl

2 mM EDTA (disodium tuzlu)

Hazırlanışı:

1.21 g Tris base

23.4 g NaCl

0.74 g Na₂EDTA 800 mL deiyonize suda çözüldü. pH 8.20'ye ayarlandı ve deiyonize su ile 1000 mL'ye tamamlandı. 121 °C'de 1 atm basınçta 30 dakika otoklavlanarak steril edildi.

2. Amonyum asetat (9M)

70 g amonyum asetat bir miktar distile suda çözüldükten sonra 100 mL'ye tamamlandı. +4 °C'de saklandı.

3. Proteinaz K Seyreltme Tamponu (pH 8.0)

0.05 M Tris HCl

1 mM CaCl₂**Hazırlanışı :**

0,788 g Tris HCl

0,011 g CaCl₂ 80 mL deiyonize suda çözüldü, pH : 8.00'a ayarlandı. Deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı. 121 °C'de 1 atm basınçta 30 dakika otoklavlandı. Çözelti +4 °C'de saklandı.

4. Proteinaz K çözeltisi (10 mg/mL)

Buz üzerinde 100 mg proteinaz K, 10 mL Proteinaz K seyreltme tamponunda çözülerek hazırlandı. 1.5 mL'lik ependorf tüplerine 600'er µL pipetlenerek -20 °C'ye kaldırıldı.

5. Tris- EDTA (TE) Tamponu :

10 mM Tris

1 mM EDTA (disodyum tuzlu)

Hazırlanışı :

1 M Tris HCl (pH 7.40)

0.1 M Na₂EDTA (pH 8.00) ayrı hazırlandı.

Hazırlanan çözeltilerden 5'er mL alındı ve son hacim 500 mL'ye tamamlandı. 121 °C'de 1 atm basınçta otoklavlanarak sterilize edildi ve +4 °C'de saklandı

6. % 10'luk(w/v) Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi

10 g sodyum dodesil sülfat deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı. 70 °C'de ısıtılarak çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.

7. Absolu (%96) ve %70'lik Etanol

Tam Kandan DNA İzolasyonu :

Soğuk deiyonize su ile patlatılmış kan hücrelerinin DNA dışındaki diğer bileşenlerinin ve diğer kan elemanlarının yüksek tuz konsantrasyonunda (salting out) ve denatüran ajanların varlığında ortamdan uzaklaştırılması prensibine dayanmaktadır.

Yöntem

1. 8 mL'lik EDTA'lı tüpteki tam kan 50 ml'lik Falkon tüpüne aktarıldı ve üzerine 45 mL'ye tamamlanacak şekilde soğuk distile su ilave edildi.
2. Falkon tüpleri iyice çalkalanarak eritrosit ve lökositlerin parçalanması sağlandı.
3. 2500 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Tekrar su eklenerek işlem tekrar edildi (berrak bir görüntü elde edilene dek işlem tekrarlandı).
4. Pellet üzerine 3 mL nüklei lizis tamponu ilave edildi. 150 µL proteinaz K (10mg/mL) çözeltisi eklendikten sonra 10 saniye vortekslendi.
5. 200 µL SDS(%10'luk) ilave edildi ve yavaşça ters düz edilerek karışması sağlandı.
6. 1 gece boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübe edilen örnek üzerine 1.2 mL amonyum asetat kondu ve birkaç saniye kuvvetlice çalkalandı. Burada numunedeki vizkozite ve görünüm önemlidir. Gerekirse daha fazla amonyum asetat ilave edilebilir.
8. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi ve 9000 rpm'de santrifüj edildi.
9. Süpernatant başka bir steril falkon tüpüne aktarıldı ve üzerine süpernatantın 3 katı kadar -20°C'de bekletilmiş absolu etanol eklendi.
10. Falkon tüpü yavaşça ters düz edilerek DNA'nın presipite olması sağlandı.
11. Presipite DNA alındığı falkon tüpünün kapağı içinde bir pipet yardımıyla %70'lik etanolle yıkandıktan sonra 1.5 mL'lik steril ependorfa alındı.
12. Yüksek devirde quick run edildikten sonra kalan alkol bir pipetle alındı.
13. DNA numunesinin üzerine duruma göre 500 veya 600 µL TE tamponu ilave edildi. Oda sıcaklığında ters düz edildikten sonra 65 °C'de çözülmesi sağlandı ve dondurucuya kaldırıldı.

3.2.5.2. DNA Konsantrasyonunun Spektrofotometre ile Tayini :

İzole DNA örneklerinden 10 µL alındı ve üzerlerine 990 µL distile su kondu (1:100 oranında sulandırıldı). Spektrofotometrik olarak cam kuvvetlerde 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbansları ölçüldü.

$$\mu\text{g/mL DNA konsantrasyonu} = \text{OD}_{260} \times \text{sulandırma katsayısı}(100) \times 50^*$$

OD = optik dansite. 50* : 50 ng/µL'lik konsantrasyon için.

DNA'nın 260 ve 280 nm'deki optik dansitelerinin birbirine oranı ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$), DNA kalitesini göstermektedir. Bu oranın 1,8 olması saflığın iyi olduğunu, 1,8'den büyük olması RNA kontaminasyonunu, küçük olması ise protein kontaminasyonunu gösterir.

Stok DNA çözeltileri 50 ng/µL olacak şekilde sulandırıldı.

3.2.5.3 Paraoksonaz Gen Bölgesinin PCR (Polimeraz Zincir reaksiyonu) ile Amplifikasyonu

İn vitro ortamda sentetik primerler ile sınırlandırılmış DNA'nın hedef gen bölgesinin, hücre içi ortamı taklit ederek, taq polimeraz, MgCl_2 , dNTP, taq DNA tamponu ve deiyonize su varlığında, değişen sıcaklıklarda tekrarlanan döngüler ile çoğaltılması prensibine dayanmaktadır. Bu şekilde hedef gen bölgesi milyonlarca kez çoğaltılabilir.

Primerler

Primer I : OD= 58.8 nmol $M_A = 6,812 \text{ g/mol}$

Primer II : OD= 77.7 nmol $MA = 6.905 \text{ g/mol}$

Sense : 5' TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G 3' (toplam 22 baz)

Antisense : 5' CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC TC 3' (toplam 23baz)

PCR Karışımının Hazırlanması

Bu işlem laminair flow kabin içinde yapıldı. Buz içine yerleştirilmiş bir ependorf tüp içinde aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı.

<u>Madde</u>	<u>Hacim*</u>	<u>Final konsantrasyon</u>
Taq DNA Tamponu** (10x)	2.5 µL	1x taq DNA tamponu
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µL	1.5 mM
dNTP (2.5 mM)	2 µL	200 µM
PON Primer 1+2 (10µM)	1.25 µL	0.5 µM
Taq DNA Polimeraz(5 U/µL)	0.2 µL	1 U
Deiyonize su	15.55 µL	
DNA (50 ng/µL)	<u>2 µL</u>	
Toplam Reaksiyon hacmi	25 µL	

* Bir tek numune içindir.

** 10x taq DNA tamponu içeriği : 100 mM Tris (pH: 9.00), 500 mM KCl, %1 triton X-100

PCR karışımı, içerisine önceden 2 µL (100 ng/µL) DNA konmuş 0.2 mL'lik PCR tüplerine pipetlendi. Tüplerin kapakları dikkatli bir şekilde kapatılarak termocycler (T Personel) cihazına kondu.

PCR Programı

Literatür programları aşağıdaki şekilde optimize edildi.

1. 95 °C 5 dk Ön denatürasyon
2. 94 °C'de 1 dk Denatürasyon
3. 61 °C'de 1 dk Yapışma (Annealing)
4. 72 °C'de 1 dk Uzama (extension)
toplam 47 döngü
5. 72 °C'de 5 dk zincir polimerizasyonunun tamamlanması .
6. 4 °C'de ∞

Meydana gelen PON geninin PCR ürünü 99 bp büyüklüğündedir. Enzim ile kesimden önce PCR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek için PCR ürünlerinin %3'lük agaroz jelde, 90 voltta 25 dakika süre ile elektroforezi yapıldı.

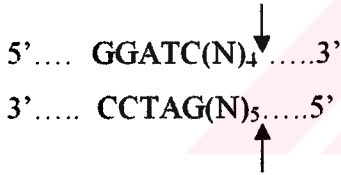
3.2.5.4. RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) Yöntemi ile PON Gln192Arg Gen Polimorfizminin Tespiti

Prensip : PCR ile çoğaltılmış hedef DNA bölgesi üzerinde restriksiyon endonükleazlar tarafından tanınabilen özgün alanlar bulunur. Bu durumda DNA bu enzimlerce kesilerek parçalara ayrılır. Restriksiyon enzimlerinin bu özelliğinden yararlanarak polimorfik özellik gösteren gen bölgelerinin farklı örneklerde ayrımı yapılabilmektedir. Enzimin DNA fragmentini kesip kesmemesine bağlı olarak fragmentin polimorfizmi tanımlanabilmektedir.

Alw I Restriksiyon Endonükleaz :

Bu çalışmada Gln192Arg polimorfizminin tespiti için Alw I enzimi kullanıldı. *Acinetobacter Iwoffii* 'den klonlanmış Alw I geni taşıyan *E coli* straininden elde edilmiş enzim, 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 7.40), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 µg/mL BSA ve %50 gliserol ile takviye edilmiştir. Enzim reaksiyonunda ayrıca 10x NEB tamponu da kullanılır.

Alw I'in tanıma bölgesi :



PCR Ürünlerinin Alw I ile Kesimi

Bu işlem laminair flow kabinde yapıldı Bir ependorf tüp içinde aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı.

<u>Madde</u>	<u>Hacim*</u>	<u>Final konsantrasyon</u>
NEB enzim tamponu**(10x)	2 µL	1x tampon
Alw I (5 U/µL)	1.2 µL	6 U
Deiyonize su	1.8 µL	
PCR ürünü	<u>15 µL</u>	
Toplam Hacim	20 µL	

* Bir tek numune içindir.

* NEB tamponunun içeriği : 50 mM Potasyum asetat, 20 mM Tris asetat, 10 mM Magnezyum asetat, 1 mM dithiothreitol (pH 7.40)

PCR ürünleri enzim ile bu şekilde muamele edilerek bir gece boyunca (12-16 saat) 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda örnekler üzerine 4 µL yükleme tamponu (loading buffer) pipetlendi ve 65 °C'de 15 dakika inkübe edilerek reaksiyon durduruldu. Numunelerin kısa bir santrifüjlemenin ardından elektroforezi yapıldı. Alw I enzimin tanıyıp kestığı DNA fragmentleri 66 ve 33 bp'lik iki parçaya ayrıldı. Bu R fenotipi olarak belirlendi. Enzimin kesmediği fragment ise Q fenotipi olarak kaydedildi.

3.2.5.5.Elektroforez

1XTBE tamponu kullanılarak %3'lük NuSieve (GTG) Agaroz jel hazırlandı.

Elektroforezde kullanılan çözeltiler şunlardır.

10xTBE Tamponu (pH 8.00)

Hazırlanışı :

27 g Tris baz

13,75 g Borik asit

10 mL 0,5 M Na₂EDTA 200 mL deiyonize suda çözüldü. pH 8.00'a ayarlandı ve deiyonize su ile 250 mL'ye tamamlandı.

Yükleme Tamponu (Denatüre edici olmayan)

Hazırlanışı :

% 50 (w/v) Sükroz

% 0.1 (w/v) Bromfenol mavisi

%0.1 (w/v) Xylene cyanole

50 mM Na₂EDTA (pH: 8.00)

Etidyum Bromür

10 mg/mL olacak şekilde stok çözelti olarak hazırlandı. %3'lük nusieve agaroz içindeki konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde sulandırıldı.

Jelin Hazırlanışı:

NuSieve agaroz %3'lük 1.5 g

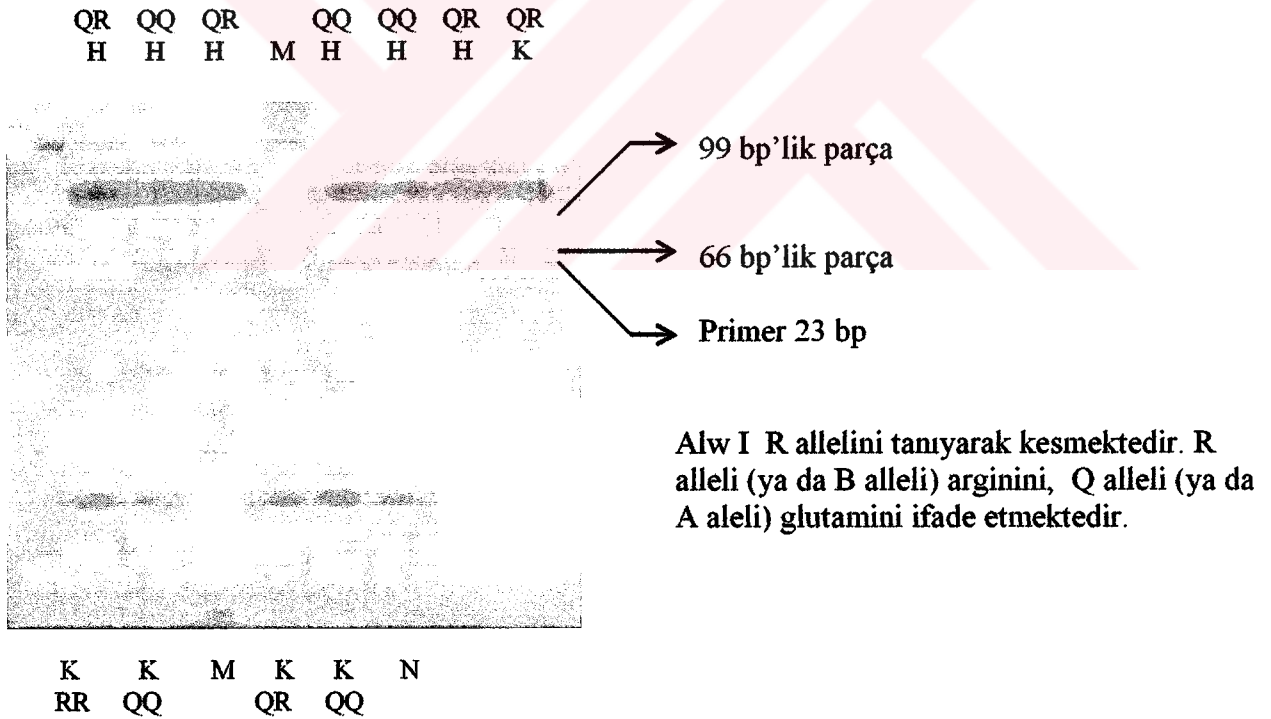
1X TBE tamponu 50 mL

1.5 g nusieve agaroz 50 mL TBE tamponuna eklendi. İyice çalkalandıktan sonra mikrodalga fırında kaynatıldı. Yaklaşık 60 °C'ye gelince 2 µL etidyum bromür eklendi. Tarakları yerleştirilmiş elektroforez tankına dökülerek polimerizasyonu beklendi.

Elektroforez Şartları :

Tampon	: 1 X TBE
Toplam jel uzunluğu	: 10 cm
Örnek hacmi	: 20 µL
Voltaj	: 90 volt
Akım şiddeti	: ~50 mA
Süre	: 35 dakika

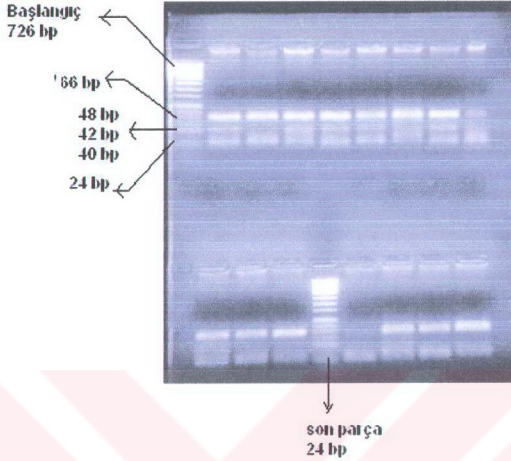
Elektroforez Bulgularının Değerlendirilmesi



Şekil 16: Enzim kesimini takiben uygulanan elektroforezin jel görüntüsü

H : Hasta ; K : kontrol ; M :DNA marker; N :negatif kontrol

Marker : phix174 DNA/Hinf I promega Kat No: G1751



Şekil 17: Marker'in fragment dağılımı

3.3. İstatistiksel Analizler :

Tüm gruptaki değerler aritmetik ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. Gruptaki parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uyanlar Student t testi ile uymayanlar ise Mann Whitney U testi ile ortalamalar arasındaki farkın önemliliği belirlendi. Grup içi parametreler arası ilişki ise Spearman veya Pearson Korelasyon testi ile incelendi. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Birden fazla ortalamalar arası farkı belirlemek için, parametrik olanlar arasında ANOVA, nonparametrik olanlar için Kruskal Wallis testi uygulandı. Allel frekansları Hardy-Weinberg eşitliğine göre hesaplandı.

X : Aritmetik ortalama

SD : standart Sapma

%CV : Varyasyon Katsayısı $= (SD/X) \times 100$

Hardy-Weinberg eşitliği : $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

4. BULGULAR

4.1. Sağlıklı Grupta Ortalama Değerler ve Cinsiyetlere Göre Dağılımları ve Anlamlılıkları

Sağlıklı gruba ait demografik veriler tablo 4’de gösterilmiştir. Erkek ve kadınlar arasında yaş bakımından bir farklılık gözlenmedi. BMI , sistolik ve diyastolik kan basınçları ile bel/kalça oranları erkeklerde kadınlara göre anlamlı derecede yüksek bulundu.

Tablo 4 : Sağlıklı Grupta Demografik Verilerin Cinsiyetlere Göre Dağılımı

	<u>Erkek</u> n= 152 Ortalama±SD	<u>Kadın</u> n= 102 Ortalama±SD
Yaş (yıl)	41.9 ± 14.1	38.6 ± 12.7
BMI (kg/m ²)	25 ± 2.8 ^a	23 ± 2.8
SKB (mmHg)	115 ±11 ^a	109 ± 9
DKB (mmHg)	76 ±7 ^a	71 ± 8
Bel/kalça (cm)	0.89±0.05 ^a	0.82 ± 0.07

a: p<0.05 : Student t testine göre

SKB : Sistolik Kan Basıncı

DKB :Diyastolik Kan Basıncı

BMI : Index (Vücut Kütle Oranı)

Tablo 5 : Sağlıklı Grupta Biyokimya Parametrelerinin Cinsiyetlere Göre Dağılımı

	<u>Erkek</u> n= 152 Ortalama±SD	<u>Kadın</u> n= 102 Ortalama±SD
Glukoz (mg/dL)	85 ±11	83 ± 10
ALT (mg/dL)	23,3 ± 9.7 ^a	16 ± 6.9
AST (mg/dL)	21.9 ± 6.1	8.6 ± 4.8
BUN (mg/dL)	15.2 ± 3.7 ^a	11.9 ± 3.6
Kreatinin (mg/dL)	0.88 ± 0.15 ^a	0.65 ± 0.11

a: p<0.05 : Mann Whitney U testine göre.

Sağlıklı grupta biyokimya parametrelerinin cinsiyetlere göre dağılımı tablo 5’de verilmiştir. Her iki cinsiyet grubunda da biyokimya parametreleri normal değerler içinde çıkmıştır. ALT, BUN ve Kreatinin erkeklerde kadınlara göre anlamlı derecede yüksek bulunurken, glukoz ve AST verileri bakımından cinsiyetler arasında bir anlamlı bir fark görülmedi.

Tablo 6 : Sağlıklı Grupta Lipid Parametrelerinin Cinsiyetlere Göre Dağılımı

	<u>Erkek</u> n= 152 Ortalama±SD	Referans aralığı (%5-95)	<u>Kadın</u> n= 102 Ortalama±SD	Referans aralığı (%5-95)
TK (mg/dL)	187 ± 38	116-245	181 ± 32	128-239
HDL-K (mg/dL)	47 ± 9 ^a	32.6-66	59.4 ± 13	38-85
LDL-K (mg/dL)	124 ± 3 6 ^b	64-180	115 ± 31	66-179
TG (mg/dL)	107 ± 52 ^a	45-217	81 ± 30	37-138
Apo AI (mg/dL)	135 ± 22 ^b	101-177	153 ± 23	116-198
Apo B (mg/dL)	93 ± 25 ^b	53-131	85 ± 22	48-128
Lp(a) (mg/dL)	19.2 ± 15	9-55	22.3 ± 18.3	9-69
TK/HDL-K	4.0 ± 1 ^b	2.5-6	3.2 ± 0.8	2.1-4.5
ApoA/ApoB	1.5 ±0.5 ^a	0.94-2.56	1.9 ± 0.7	1.1-3.1

a: p<0.05 : (Mann Whitney U testine göre)

b: p<0.05 : (student t testine göre)

Sağlıklı grupta lipid parametrelerinin cinsiyetlere göre dağılımı tablo 6’da gösterilmiştir. TK ve Lp(a) değerleri cinsiyetler arasında anlamlı derecede farklılık göstermezken, HDL-K, LDL-K, TG, ApoAI, ApoB, TK/HDL-K, ve apoAI/ApoB değerleri

cinsiyetler arasında anlamlı derecede farklılık göstermektedir. HDL-K, ApoAI ve ApoAI/ApoB oranı kadınlarda erkeklere göre daha yüksek bulundu.

Tablo 7: Sağlıklı Grupta PON aktivitesi, HDL-K, oLab ve PON/HDL-K'nin Cinsiyetlere Göre Dağılımı

	<u>Erkek</u> n=152	Referans aralığı (%5-95)	<u>Kadın</u> n=102	Referans aralığı (%5-95)
	Ortalama±SD		Ortalama±SD	
PON aktivite (nmol/mL/dk)	40.6 ± 26	14.4-97	44.9 ± 28	15-110
HDL-K (mg/dL)	47 ± 9 ^a	32.6-66	59.4 ± 13	38-85
oLab (mU/mL)	175 ± 113	35-425	182 ± 113	40-425
PON/HDL-K	0.88 ± 0.5	0.3-2	0.77 ± 0.4	0.2-1.8

a: p<0.05 : Mann Whitney U testine göre

Sağlıklı grupta PON1 aktivitesi, HDL-K, okside LDL antikor (oLab) ve PON aktivitesinin HDL-K'e oranı (PON/HDL-K) tablo 7'te gösterilmiştir. HDL-K, erkek ve kadınlar arasında anlamlı derecede farklılık gösterirken diğer parametrelerin karşılaştırılmasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 8: Sağlıklı Grupta Genotipik Dağılıma göre PON aktivite, HDL-K, PON/HDL-K ve oLab Düzeyleri

	QQ n= 144	QR n= 88	RR n=22	P*
PON aktivite (nmol/mL/dk)	28.8 ± 14.7	59.2 ± 28.2	64.1 ± 37.4	0.001
HDL-K (mg/dL)	50.7 ±12.2	54.4 ± 13	50. 5 ± 13.7	AD
PON/HDL-K	0.59 ± 0.34	1.13 ± 0.5	1.24 ± 0.6	0.001
oLab (mU/mL)	185 ± 114	177 ±111	131 ± 105	0.045

* Kruskal Wallis testine göre

AD : Anlamlı Değil

PON aktivitesi, HDL-K, PON/HDL-K oranı ve oLab değerlerinin PON1 Q192R polimorfizmine ait allelelere göre dağılımları tablo 8'de gösterilmiştir. PON aktivitesinin

genotipler arasındaki dağılımlarının anlamlı derecede farklılık gösterdiği bulundu. PON aktivitesinin QQ genotipinde düşük, QR'de yüksek ve RR'de ise en yüksek aktiviteye sahip olduğu görüldü. HDL-K düzeyleri genotiplere göre farklılık göstermemektedir. PON/HDL-K oranı RR genotipinde QR ve QQ genotiplerine göre anlamlı yüksek bulundu. oLab düzeyleri ise tam tersi bir dağılım göstermektedir (QQ'da en yüksek, QR'de yüksek ve RR'de düşük). QQ genotipinde en düşük PON aktivitesine karşılık en yüksek oLab düzeyi elde edildi. Diğer genotipler arasında ise bu iki parametrede ters bir seyir gözlemlendi.

Tablo 9 :Sağlıklı Grupta Genotiplerin Dağılımı ve Allel Frekansı (n= 254)

QQ n (%)	QR n(%)	RR n(%)	Q*	R*
144(56.7)	88(34.6)	22(8.7)	0.73	0.27

* Hardy-Weinberg eşitliğine göre hesaplandı.

Sağlıklı grupta Q192R polimorfizmine ait allelerin dağılımı ve allel frekansı tablo 9'de verilmiştir.

Tablo 10 : Sağlıklı Grupta lipid parametreleri, PON aktivitesi ve oLab arasında korelasyonlar (n=254)

	TK	TG	HDL-K	LDL-K	ApoAI	ApoB	Lp(a)	PON/HDL	TK/HDL	PONakt
TG	r=0.344 p=0.001	-								
HDL-K	r=0.176 p=0.005	r=-0.176 p=0.001	-							
LDL-K	r=0.887 p=0.001	r=0.305 p=0.001		-						
ApoAI	r=0.212 p=0.001	r=-0.165 p=0.008	r=0.696 p=0.001		-					
ApoB	r=0.782 p=0.001	r=0.432 p=0.001	r=-0.155 p=0.01	r=0.837 p=0.001		-				
Lp(a)	r=0.222 p=0.001		r=0.147 p=0.01	r=0.174 p=0.001		r=0.156 p=0.01	-			
PON/HDL-K			r=-0.190 p=0.002		r=-0.248 p=0.001			-		
TK/HDL-K	r=0.555 p=0.001	r=0.624 p=0.001	r=-0.684 p=0.001	r=0.627 p=0.001	r=-0.424 p=0.001	r=0.670 p=0.001		r=0.145 p=0.02	-	
PONaktivite			r=0.178 p=0.004					r=0.900 p=0.001	r=-0.134 p=0.03	-
oLab										

r= korelasyon katsayısı; n= birey sayısı

Sağlıklı grupta lipid parametreleri, PON aktivitesi ve oLAB arasındaki korelasyonlar Tablo 10’da gösterilmiştir. Tabloda, beklenildiği gibi bazı lipid parametreleri arasında güçlü ilişkiler mevcuttur. TK, LDL-K ve ApoB ile; HDL-K Apo AI ile; LDL-K Apo B ile güçlü bir şekilde pozitif korelasyon göstermektedir. TK’ün HDL-K, TG ve Lp(a) ile daha zayıf korelasyonları gözlemlendi. TG’in HDL-K ve Apo AI negatif korelasyonu mevcuttur. Bununla beraber PON aktivitesinin HDL-K ve PON/HDL-K oranı ile pozitif korelasyon, TK/HDL-K ile negatif korelasyon gösterdiği tespit edildi.

4.2. Kontrol ve KAH Gruplarında Cinsiyetlere Göre Ortalama Değerler ve Anlamlılıkları

Demografik verilerin kontrol ve KAH grubunda cinsiyetlere göre karşılaştırması tablo 11’de verilmiştir. Gruplarda cinsiyetlerin kendi aralarında ve diğer gruplardaki hemcinsleri ile karşılaştırmalarında anlamlı bir farklılık görülmedi.

Tablo 11: Kontrol ve KAH grubunda Demografik Verilerin Karşılaştırılması

	Kontrol Grubu		KAH Grubu	
	<u>Erkek</u> n= 90 Ortalama±SD	<u>Kadın</u> n= 24 Ortalama± SD	<u>Erkek</u> n= 76 Ortalama±SD	<u>Kadın</u> n=25 Ortalama±SD
Yaş (yıl)	51 ± 9	54 ± 8	51 ± 8	59 ± 8
BMI(kg/m ²)	26 ± 2	25 ± 2	26 ± 4	27 ± 3

BMI : Body Mass Indeks (vücut kütle oranı)

Tablo 12 : Kontrol ve KAH Gruplarında Lipid Parametrelerinin Karşılaştırılması

	Kontrol			KAH		
	Erkek n= 90	Kadın n= 24	Erkek n= 76	Kadın n= 25		
	Ortalama ± SD	Referans aralığı (%5 – 95)	Ortalama±SD	Referans aralığı (%5 – 95)	Ortalama±SD	Referans aralığı (%5 – 95)
TK (mg/dL)	196 ± 35	(133-250)	190 ± 46	(129-250)	197 ± 39	(142-390)
HDL-K (mg/dL)	47 ± 9 ^{ab}	(31-66)	36.2 ± 8.1	(37-88)	42 ± 9	(28-60)
LDL-K (mg/dL)	131 ± 35	(66-182)	120 ± 37	(54-190)	125 ± 51	(46-254)
TG (mg/dL)	114 ± 50 ^{ab}	(49-218)	167 ± 75	(56-180)	140 ± 62	(66-301)
Apo AI (mg/dL)	133 ± 21 ^{ab}	(102-180)	112 ± 24 ^d	(112-197)	128 ± 22	(91-177)
Apo B (mg/dL)	100 ± 24 ^b	(53-134)	109 ± 33	(35-143)	106 ± 28	(64-177)
Lp(a) (mg/dL)	21.2 ± 16.1	(9-61)	22 ± 19	(9-73)	28 ± 25	(9-99)
TK/HDL	4.3 ± 1 ^{ab}	(2.5-6.0)	5.6 ± 1.8	(1.8-5.2)	5.5 ± 3.0	(2.5-15)
ApoA/ApoB	1.44 ± 0.5 ^a	(0.87-2.6)	1.1 ± 0.4	(0.8-5.2)	1.3 ± 0.4	(0.56-2.3)

a: p<0.05 : Sağlıklı grupta kadın erkek arasında, (student t testi)

b: p<0.05 : Sağlıklı grup ile KAH grubu erkekler arasında (student t testi)

c: p<0.05 : Sağlıklı grup ile KAH grubu kadınlar arasında (student t testi)

d: p<0.05 : KAH grubu kadın erkek arasında (student t testi)

Kontrol ve KAH gruplarında lipid parametrelerinin karşılaştırması tablo 12’de verilmiştir. TG, Apo B, TK/HDL-K düzeyleri kontrol grubu erkeklerinde kadınlara göre anlamlı yüksek bulundu. Buna karşılık HDL-K, Apo AI ve ApoAI/ApoB düzeyleri kadınlarda erkeklere göre anlamlı derecede yüksekti. TK ve Lp(a) düzeyleri kadınlarda daha yüksek olmasına karşın anlamlı değildi. Kontrol grubu erkekleri ile KAH grubu erkekleri karşılaştırıldığında TG, Apo B ve TK/HDL-K seviyeleri KAH grubu erkeklerinde anlamlı derecede daha yüksekti. Buna karşılık Apo AI ve Apo AI/Apo B seviyeleri kontrol grubu erkeklerinde anlamlı biçimde yüksek bulundu. Kontrol ve KAH grubu kadınları arasında yapılan karşılaştırmada TG, TK/HDL-K seviyeleri KAH grubu kadınlarında anlamlı biçimde yüksekti. Kontrol grubu kadınlarında ise Apo AI ve ApoAI/ApoB düzeyleri anlamlı derecede daha yüksekti. KAH grubunda kadın ve erkekler arasındaki karşılaştırmada ise ApoAI seviyesi kadınlarda erkeklere göre anlamlı derecede daha yüksekti.



Tablo13: Kontrol ve KAH Grubunda Lipid Parametrelerinin Genotiplere Göre Dağılımı

	<u>Kontrol Grubu</u>			<u>KAH Grubu</u>		
	QQ n= 72	QR n=31	RR n=11	QQ n = 55	QR n=37	RR n=9
TK (mg/dL)	197 ± 34	206 ± 28	163 ± 45	189 ± 42	208 ± 61	176 ± 38
HDL-K (mg/dL)	50 ± 12 ^a	51 ± 13 ^b	44 ± 10	38 ± 9	36 ± 8	37 ± 6
TG (mg/dL)	107 ± 45 ^a	115 ± 55 ^b	118 ± 38 ^c	157 ± 73	168 ± 73	144 ± 67
LDL-K (mg/dL)	130 ± 31 ^a	135 ± 26	102 ± 42	117 ± 36	127 ± 45	109 ± 44
Apo AI (mg/dL)	138 ± 23 ^a	136 ± 23 ^b	134 ± 29 ^c	116 ± 25	113 ± 24	117 ± 19
Apo B (mg/dL)	98 ± 26	106 ± 20	86 ± 20	107 ± 30.4	113 ± 34	92 ± 22
Lp(a) (mg/dL)	23 ± 18	24 ± 17	21 ± 18.7	23 ± 18	26 ± 25	17 ± 14
TK/HDL	4.1 ± 1.1 ^a	4.2 ± 1 ^b	3.8 ± 1.3 ^c	5.2 ± 1.6	6.2 ± 2.8	4.8 ± 1.1
ApoAI/ApoB	1.5 ± 0.7 ^a	1.3 ± 0.5 ^b	1.6 ± 0.5 ^c	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.3	1.3 ± 0.3

a: p<0.05: kontrol ile KAH grupları QQ genotipleri arasında (student t testi).

b: p<0.05: kontrol ile KAH grupları QR genotipleri arasında (student t testi).

c: p<0.05: Kontrol ile KAH grupları RR genotipleri arasında (student t testi)

Kontrol ve KAH gruplarında lipid parametrelerinin genotiplere göre dağılımı tablo 13’de verilmiştir. Kontrol grubu QQ genotipi ile KAH grubu genotipi arasında TG, HDL-K, Apo AI, TK/HDL-K ve Apo AI/ApoB parametreleri arasında anlamlı farklılıklar bulundu. HDL-K, LDL-K, Apo AI ve Apo AI/ApoB oranı kontrol QQ genotipinde anlamlı yüksekti. Kontrol grubu QR genotipi ile KAH grubu QR genotipi arasında TG, ApoAI, TK/HDL-K ve Apo AI/ApoB parametreleri arasında anlamlı derecede farklılık vardı. Apo AI ve Apo AI/Apo B değerleri kontrol grubu QR genotipinde KAH grubu QR genotipine göre yüksek, TG ve TK/HDL-K değerleri ise düşüktü. Kontrol grubu RR genotipi ile KAH grubu RR genotipi arasında TG, Apo AI, TK/HDL-K ve Apo AI/ApoB değerleri arasında anlamlı farklılık görüldü. Apo AI ve Apo AI/Apo B değerleri kontrol grubu RR genotipinde yüksek TG ve TK/HDL-K düzeyleri ise düşüktü.



Tablo 14 : Kontrol ve KAH Grubunda PON aktivitesi, HDL-K, PON/HDL-K ve oLab'nun Karşılaştırması

	Kontrol Grubu			KAH Grubu		
	Erkek n= 90	Kadın n= 24	Referans aralığı (%5-95)	Erkek n= 76	Kadın n= 25	Referans aralığı (%5-95)
PON aktivite(nmol/mL/dk)	Ortalama±SD 41.7 ± 25.4	Ortalama±SD 38 ± 24	(15-92)	Ortalama±SD 34.1 ± 17 ^f	Ortalama±SD 45 ± 22	(11.5-81)
HDL-K (mg/dL)	47 ± 9 ^{ab}	59 ± 16 ^d	(31-66)	36.2 ± 8.1	42 ± 9	(28-60)
PON/HDL-K	0.91 ± 0.6 ^a	0.64 ± 0.49 ^d	(0.26-2.1)	1.03 ± 0.6	1.09 ± 0.5	(0.25-2.1)
oLab (mU/mL)	83 ± 112 ^c	160 ± 115 ^e	(37-430)	364 ± 300	372 ± 294	(75-1200)

a: p<0.05 : Kontrol grubunda erkek ve kadınlar arasında (student t testine göre)

b: p<0.05 :Kontrol grubu ile KAH grubu erkekleri arasında (student t testine göre)

c: p<0.05: Kntrol grubu ile KAH grubu erkekleri arasında (Mann Whitney U testine göre)

d : p<0.05 : Kontrol grubu ile KAH grubu kadınları arasında (student t testine göre)

e: p<0.05: Kontrol grubu ile KAH grubu kadınları arasında (Mann Whitney U testine göre)

f: p<0.05 : KAH grubu kadın erkek arasında (student t testine göre)

Kontrol ve KAH grupları arasında cinsiyetlere göre PON aktivitesi, HDL-K, PONaktivitesi/HDL-K ve oLDL'nin karşılaştırılmasına ait sonuçlar tablo 14'te gösterilmiştir. PON aktivitesi kontrol ve KAH grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermemektedir. Kontrol grubunda HDL-K ve oLAb erkeklerde kadınlara göre anlamlı derecede düşük bulundu. HDL-K, KAH grubu erkeklerine göre anlamlı derecede yüksek, oLAb düzeyi ise düşüktü. Kontrol grubu kadınlarında ise HDL-K düzeyleri KAH grubu kadınlara göre anlamlı yüksek, PONaktivite/HDL-K ve oLAb düzeyleri anlamlı derecede düşüktü. KAH grubunda PON aktivitesi erkeklerde kadınlara göre anlamlı yüksek bulundu.



Tablo 15 : Kontrol ve KAH grubunda PON aktivitesi, oLab ve PON/HDL-K'nün genotiplere göre dağılımı

	<u>Kontrol Grubu</u>				P*	<u>KAH Grubu</u>				P**
	QQ %	QR %	RR %	n=72 (63)		QR %	QQ %	RR %	n=37 (36)	
PON aktivite(nmol/mL/dk)	30 ± 15.3	60 ± 26 ^b	57.7 ± 32.7		0.001	41.4 ± 19.7	30.9 ± 15.1	52.4 ± 26.8		0.008
HDL-K (mg/dL)	50 ± 12 ^a	51 ± 13 ^b	44 ± 10		AD	36 ± 8	38 ± 9	37 ± 6		AD
oLab (mU/mL)	184 ± 116 ^a	189 ± 110 ^b	103 ± 69 ^c		0.02	359 ± 278	400 ± 309	393 ± 339		AD
PON/HDL-K	0.61 ± 0.37 ^a	1.28 ± 0.7	1.20 ± 0.87		0.001	1.24 ± 0.69	0.85 ± 0.44	1.4 ± 0.75		0.04

a: p<0.05: Sağlıklı grupla KAH grubu QQ genotipi arasında (student t testine göre)

b: p<0.05 :Sağlıklı grupla KAH grubu QR genotipi arasında (student t testine göre)

c: p<0.05 :Sağlıklı grupla KAH grubu RR genotipi arasında (student t testine göre)

P* : Kontrol grubu genotiplerinin kendi aralarında karşılaştırması (Kruskal Wallis testine göre)

P** : KAH grubu genotiplerinin kendi aralarında karşılaştırması (Kruskal Wallis testine göre)

Kontrol ve KAH gruplarında PON aktivitesi, HDL-K, oLab ve PONaktivite/HDL-K oranları tablo 15'te verilmiştir. Kontrol grubu QQ, QR-RR genotipleri arasında PON aktivitesi bakımından anlamlı bir fark görüldü. Aktivite QQ genotipinde diğerlerine göre anlamlı derecede düşüktü. Buna karşılık KAH ve kontrol grupları arasında PON aktivitesi bakımından yalnızca QR genotipleri arasında anlamlı bir fark bulundu. HDL-K düzeyleri kontrol grubunun QQ ve QR genotipleri ile KAH grubunun QQ ve QR genotipleri arasında anlamlı derecede farklıydı. oLab ise kontrol grubunun RR genotipi ile QQ-QR genotipleri arasında anlamlı farklılık gösterirken, her bir genotip KAH grubunun kendilerine karşılık gelen genotiplerinden anlamlı derecede düşüktü. PON/HDL-K oranı kontrol grubu QQ genotipinde KAH grubu QQ genotipine göre anlamlı düşüktü. KAH grubunda PON aktivitesi her bir genotip için anlamlı derecede farklıydı. PON/HDL-K oranı QQ genotipinde diğerlerine göre anlamlı düşüktü.

Tablo 16 : Kontrol ve KAH Gruplarında Genotiplerin Dağılımı ve Allel Frekansı Oranları

	Kontrol Grubu (n=114) n (%)	KAH Grubu (n=101) n (%)	P
QQ	72 (63)	55 (55)	AD
QR	31 (27)	37 (36)	AD
RR	11 (10)	9 (9)	AD
Q/R	0.76/0.24	0.73/0.27	AD

AD : Anlamlı değil

Kontrol ve KAH grupları arasında genotipik dağılım ve allel frekansı bakımından anlamlı bir fark görülmedi.

Tablo 17 : KAH grubunda korelasyon analizi (n=101)

	oLab	PONaktivite	TK	TG	HDL-K	LDL-K	ApoAI	ApoB
PONaktivite		-						
TK			-					
TG	r=0.225 p=0.029		r=0.342 p=0.001	-				
HDL-K				r= -0.225 p= 0.024	-			
LDL-K			r=0.829 p= 0.001			-		
ApoAI					r= 0.572 p=0.001		-	
ApoB	r=0.228 p=0.027	r = -0.228 p= 0.046	r=0.747 p=0.001	r= 0.243 p=0.014		r=0.779 p=0.001		-
Lp(a)						r=0.274 p=0.006		r= 0.357 p= 0.001

r= korelasyon katsayısı ; n= hasta sayısı

KAH grubunda lipid, lipoprotein ve apolipoprotein parametreleri PON aktivitesi ve oLAb arasındaki korelasyonları tablo 17’de verilmiştir. Beklenildiği gibi lipid, lipoprotein ve apolipoprotein parametreleri arasında güçlü korelasyonlar görüldü. Total kolesterol ile TG, LDL-Kve Apo B arasında güçlü korelasyonlar bulundu. HDL-K ile TG arasında negatif korelasyon görüldü. LDL-K ile L(a) ve Apo B arasında korelasyonlar bulundu. oLAb ile TG ve Apo B arasında pozitif korelasyon, PON aktivitesi ile LDL-K ve Apo B arasında negatif korelasyon tespit edildi.



5. TARTISMA

5.1. Metodların Tartışması

5.1.1. Çalışma Grubunun Olusturulması

Çalışmamızda, sağlıklı çalışma grubu (n= 254), bu sağlıklı grup icinden KAH grubu ile karşılaştırılmak üzere bir kontrol grubu (n=118) ve KAH grubu (n=101) olmak üzere üç grup oluşturuldu. Yas ve cinsiyetin koroner arter hastalığında önemli risk faktörleri olarak tanımlanması sebebi ile KAH ve kontrol grubu arasında bu kategorilerde farklılık olmamasına dikkat edildi. Sağlıklı grubun geçerliliğini teyit amacıyla klinik hikaye, glukoz, kan üre azotu (BUN) ve kreatin gibi biyokimya parametrelerinin tavanı ve vücut kitle oranı (BMI), sistolik ve diastolik kan basınçları ve bel kalça oranlarının ölçümü yapıldı.

5.1.2 PON Aktivitesinin Belirlenmesi :

PON hem paraoksonaz hem de aril esteraz aktivitesi gösteren tek enzimdir. PON1 paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri hemen hemen tüm çalışmalarda spesifik substratları olan paraokson ve fenil asetat kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda literatürlerde genel olarak kullanılan paraoksonaz aktivite tavin yöntemi kullanılmıştır. Bununla beraber PON aktivitesinin belirlenmesinde kitle tavinı vapan çalışmalar mevcuttur (49,50). Kitle tavinı aynı zamanda PON miktarının KAH grubu ile sağlıklı grup arasında farklı olup olmadığının karşılaştırılması bakımından da önem taşır. Kitle tavinı için gereken PON'a spesifik antikorların ticari olarak tavin kitleleri satışı bulunmadığından bu analizler yapılamadı.

5.1.3.PON Gen Polimorfizminin Tavinı

DNA izolasyonu Miller'in "salting out" prensibine dayanarak geliştirdiği metoda göre yapıldı. Bu metodta, fenol ekstraksiyon metodundaki gibi fenolün ortamdan yeterince uzaklaştırılmamasına bağlı olarak görülen DNA kaybı çok daha az olup DNA'nın saklanma süresi daha fazladır. Hazır DNA izolasyon kitleleri ile yapılan izolasyonlarda elde edilen DNA miktarı yine az olup bu kitlelere göre çalışmamızdaki metod son derece ucuzdur.

PON1 Q192R gen polimorfizmi nokta mutasyonudur. Nokta mutasyon tayininde pek çok metod kullanılmaktadır. Önemli olan, nokta mutasyonunun daha önceden tanımlanmış olup olmadığıdır. Metodun seçimi buna göre yapılır. Bilinen nokta mutasyonları tespit metodları arasında restriksiyon fragment analizi (RFLP), allel spesifik oligonükleotid (ASO), allel spesifik amplifikasyon (ASA), tek nükleotid primer uzaması sayılabilir. Bazı metodların radyoaktif özellikte ve pahalı olması kullanımlarını kısıtlamaktadır. Restriksiyon fragment analizi (RFLP) nokta mutasyonu tayinlerinde en yaygın kullanılan methodtur. Literatürlerde, Humbert ve arkadaşlarının kullanmış olduğu dot blot analizi dışında tamamen RFLP kullanılmıştır. Çalışmamızda kolay ve kaliteli sonuçları açısından RFLP yöntemini tercih edildi. RFLP sonunda ürünlerin değerlendirilmesi için yapılan elektroforez işleminde, kullanılan jel tipleri literatürlerde farklılık göstermekteydi. Literatürde agaroz ve poliakrilamid jel elektroforez uygulamaları vardı. Enzim kesimi sonucunda RR genotipi, 66 ve 33 bp'lik iki parçaya ayrılmaktadır. Özellikle 33 bp'lik parçanın agaroz jelde tespit edilmesi güçtür. Çalışmamızda ayırma gücü daha yüksek olan nusieve agaroz kullanılarak bu problem çözüldü.

5.1.4.Okside LDL Antikoru (oLab) Tayini:

Literatürde subendotelyal LDL oksidasyonunun göstergesi olarak en yaygın kullanılan metod oLab tayinidir. Çalışmamızda da oLab tespiti ELISA yöntemi ile hazır kit kullanılarak gerçekleştirildi. LDL oksidasyonuna karşı oluşan otoantikorların, IgG ile dolaylı olarak tayini prensibine dayanan bu methodta da LDL'yi okside edici ajan olarak Cu^{+2} kullanılmıştır. Ticari olarak ELISA ile oLab tayini için pek fazla seçenek yoktur. Çalışmamızda daha önceki çalışmalarımızın bütünlüğü ve devamlılığını sağlamak amacıyla BIOMEDİCA (Avusturya) firmasına ait (katalog no:BI-20032) oLab kiti kullanıldı.

5.2.Bulguların Tartışması

Sağlıklı grupta lipid parametreleri :

Lipid parametrelerinin normal sınırları ve KAH için risk değerleri NCEP'in (National Cholesterol Education Program) son açıklanan kriterlerine(51) göre (NCEP III) tablo 18 'de verildi. Sağlıklı çalışma grubunun lipid parametrelerinin değerleri NCEP III kriterlerinin normal sınırları içindedir. Bununla beraber sağlıklı grupta kadın ve erkek arasında anlamlı

farklılıklar mevcuttur. Bulduğumuz lipid parametreleri, benzer yaş grubu dikkate alındığında Türk kardiyoloji vakfının gerçekleştirdiği ve Türkiye'nin 7 bölgesini kapsayan TEKHARF çalışmasının Türkiye geneli sonuçları ile uyumludur (1). Bununla beraber, TEKHARF çalışmasının Karadeniz Bölgesi'ne ait TK değeri (E:209 mg/dL, K:216 mg/dL) çalışmamızda bulduğumuz TK değerine göre(E: 187 mg/dL, K:181 mg/dL) yüksektir. HDL-K düzeyleri ise çalışmamızda TEKHARF'in sonuçlarına göre her iki cinsiyette de yüksek bulunmuştur. Bu fark sağlıklı çalışma grubumuzun Trabzon ve çevresi ağırlıklı olması, TEKHARF'in ise tüm Karadeniz Bölgesi'ni kapsayan bir örnekleme gitmesi ile kısmen açıklanabilir. Nitekim sağlıklı grubumuza ait lipid parametrelerimiz aynı bölgeyi kapsayan daha önceden yapılmış diğer çalışmaların lipid verileri ile paralellik göstermektedir . Örem ve ark.'nın aynı bölgedeki benzer bir çalışma grubunda elde ettiği veriler ile sağlıklı grubumuzun verileri örtüşmektedir (52,53).

Tablo18 : NCEP III kriterleri

Parametre	Değerler	Yorum
TK mg/dL	<200	Normal
	200-239	Sınırdaki yüksek
	=>240	Yüksek
LDL-K mg/dL	<100	Normal
	100-129	Normale yakın
	130-159	Sınırdaki yüksek
	160-189	Yüksek
	=>190	Çok yüksek
TG mg/dL	<150	Normal
	150-199	Sınırdaki yüksek
	200-499	Yüksek
	=>500	Çok Yüksek
HDL-K mg/dL	< 40	Düşük
	>60	Yüksek

Kontrol ve KAH Grubunda Lipid Parametreleri :

TK ve LDL-K, yüksek değerleri önemli KAH risk faktörleri olmasına karşılık KAH grubunda NCEP III kriterlerine göre normal sınırlar içinde çıkmıştır ve kontrol grubu ile farklılık göstermemektedir. Bununla beraber beklenildiği gibi diğer risk faktörleri bakımından anlamlı farklılıklar mevcuttur. TK/HDL-K oranının 5.5'e eşit veya yüksek olması, düşük HDL-K (<40 mg/dL), Apo AI/Apo B oranının 1'e yakın olması, önemli KAH risk faktörleri olup KAH grubumuzda mevcuttur. Yüksek TG düzeylerinin özellikle düşük HDL-K'nün eşlik ettiği durumlarda KAH için önemli bir risk faktörü olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. KAH grubunun kadın ve erkeklerindeki TG düzeyleri kontrol grubundaki hemcinslerine göre oldukça yüksek bulunmuştur. Yaş ve cinsiyetin lipidler üzerinde etkili faktörler olduğu bilinmektedir. Çalışma gruplarımızda yaş bakımından kadın ve erkekler arasında bir farklılık yoktur. Erkek cinsiyetin daha yüksek KAH riski taşıdığı belirtilmektedir. Bu etki nisbi risk olarak değerlendirildiğinde(54), lipid parametreleri normal sınırlar içinde çıkmış olan sağlıklı çalışma ve kontrol gruplarının cinsleri arasında görülmektedir.

PON Aktivitesi :

Sağlıklı çalışma grubumuzda PON aktivitesi erkek ve kadınlar arasında anlamlı bir farklılık göstermemektedir. KAH grubunda ise erkek ve kadınlar arasında PON aktivitesi kadınlarda anlamlı derecede yüksekti. PON, batılı devletlerde elde edilen çalışmalara ait literatürlerdeki PON1 aktivitelerine göre her iki cinsiyette de düşük değerlerdeydi (48,50). Azizi ve ark'nın İran'da yaptıkları çalışmalarda(55), Azarsız'ın (56) ve Kural'ın (57) Türk popülasyonu üzerindeki çalışmalarında ise çalışmamızda bulduğumuz PON aktivitesine benzer düzeyde değerler bulunmuştur. Cinsiyetin PON aktivitesi üzerine etkisine yönelik çalışmalarda cinsler arasında genel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir . Natalia ve arkadaşları'nın PON aktivitesini etkileyen faktörleri belirlemek üzere yaptıkları bir çalışmada aktivite üzerinde en etkili faktörler olarak genetik polimorfizm, serum TK ve HDL-K düzeyleri ile sigara gösterilmiştir (58).

PON1 %90 oranında HDL yapısında bulunmaktadır. Dolayısı ile HDL konsantrasyonu ile alt tiplerinin PON aktivitesi ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Seres ve arkadaşlarının yaşlanma-HDL-K ve PON aktivitesi ile ilgili çalışmalarında yaş-PON aktivitesi, yaş-HDL-K konsantrasyonu ve yaş-PON aktivite/HDL-K grafiklerinde benzer dağılımlar gözlemlenmiştir

(59). Sağlıklı çalışma grubumuzun genotipleri arasında HDL-K bakımından bir farklılık yoktu. Buna karşılık, PON aktivitesi/HDL-K oranı genotiplerin PON aktiviteleri ile paralellik göstermektedir. KAH grubunda da genotiplerde HDL-K oranları anlamlı farklılık göstermezken PONaktivite/HDL-K oranı genotiplerin aktiviteleri ile paraleldi. Bu durum HDL-K'nün tek başına çalışmamızda PON aktivitesinin belirlenmesinde önemli bir rolü olmayabileceğini göstermektedir.

PON Aktivitesinin KAH ile İlişkisi :

Çalışmamızda sağlıklı çalışma grubumuz, kontrol grubu ve KAH grubu arasında PON1 aktivitesi bakımından anlamlı bir farklılık görülmedi. Kontrol grubu ile KAH grubundaki diğer genotipiler karşılaştırıldığında yalnızca kontrol grubunun QR genotipi, KAH grubunun QR genotipine göre anlamlı derecede yüksek PON aktivitesine sahipti. Bu iki grup arasında HDL-K seviyesi kontrol QR'de daha yüksek, oLAb ise daha düşük seviyede olup sadece bu genotipler arasında Mackness'in bulgularına uyan bir sonuç vardı(60). PON aktivitesi ile KAH arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik çalışmalarda çok farklı sonuçlar elde edilmiştir. Başlıca Aviram, Mackness ve arkadaşları, paraoksonaz aktivitesinin koroner arter hastalarında anlamlı derecede düşük olduğunu belirtmişler ve hatta bunun bağımsız bir risk faktörü olabileceğini söylemişlerdir(41,42). Buna karşılık Azizi (55) ve Ruiz(61) ise PON aktivitesi ile KAH arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır. Aviram, aşağıdaki önemli bulgulara dayanarak paraoksonazın antiaterojenik olduğunu söylemektedir:

- 1- In vitro koşullarda Cu^{+2} indüklü LDL oksidasyonunda ortama HDL veya saflaştırılmış PON içeren serum eklendiğinde oksidasyon anlamlı biçimde inhibe olmaktadır.
- 2- PON1' e spesifik yarışmasız inhibitör varlığında HDL'nin oksidasyonu artmaktadır (42).

Hemen hemen bütün çalışmalarda PON1'in KAH'a karşı koruyucu rolünü belirlemek için LDL'nin oksidasyonu tespit etmek esas alınmıştır. Okside LDL'nin son aşamasında en önemli göstergesi oLDL'ye karşı oluşan otoantikordlardır. Çalışmamızda da PON aktivitesini değerlendirmek amacı ile oLAb tayini yapıldı. oLAb düzeyleri ile sağlıklı çalışma grubu, kontrol ve KAH gruplarında PON aktiviteleri kıyaslandığında kontrol grubu ile KAH grubu arasında anlamlı farklılık tespit edildi. KAH grubunda cinsiyetler arasında anlamlı bir farklılık yokken kontrol grubunda kadınlarda erkeklere göre anlamlı biçimde yüksekti. Bu grupta

enzim aktiviteleri erkeklerde kısmen daha yüksek ancak HDL-K oranı daha düşüktü. PON aktivitesi/HDL-K oranı ise erkeklerde anlamlı derece yüksekti. oLAB düzeyindeki bu farklılık iki grup arasında PON aktivite/HDL-K oranına ve birey sayısının farklı olmasına bağlandı.

oLAB düzeyleri sağlıklı çalışma ve kontrol gruplarında genel literatür verileri ile uyumluydu. KAH grubundaki oLAB düzeyleri ise literatürdeki KAH gruplarının oLAB düzeylerine göre kısmen düşük seviyede idi. Kural ve ark.'nın dislipidemili bir grup üzerindeki çalışmalarında buldukları oLAB düzeyleri ile uyuşmaktaydı. Bununla beraber KAH gruplarındaki oLAB düzeyleri oldukça farklı seviyelerde bulunmaktadır. Bunun sebebi KAH'nın derecesi ile alakalı olabileceği gibi bu gruplardaki hastaların başka patolojik tablolara sahip olup da oLAB seviyelerini etkileyebilir.

PON1 Q192R Polimorfizmi ve KAH ile İlişkisi :

PON1 polimorfizmi PON aktivitesini belirleyen en önemli faktördür. 192. pozisyonda Q (glutamin : A alleli) ve R (arginin: B alleli) allellerinden birinin bulunması enzim aktivitesinde 8 kata varan farklılığa neden olmaktadır. Çalışmamızda sağlıklı çalışma grubunda QQ ve RR genotipleri arasında üç kata varan farklılık gözlemlendi. Sağlıklı çalışma grubumuzda genotiplere göre PON1 aktivitesi şöyle sıralanmaktadır: QQ en düşük aktivite(28.8 nmol/mL/dk), QR yüksek aktivite(52.2 nmol/mL/dk) ve RR en yüksek aktivite(64.1 nmol/mL/dk). Kontrol grubunda ise QR genotipi RR genotipinden hafif yüksek tespit edilmiştir. KAH grubunda aktivitenin genotiplere göre değişimi ise sağlıklı çalışma grubumuz ve genel literatür ile uyumludur (35).

PON1Q ve PON1R alloenzimlerinin ikisinin de LDL'yi oksidasyona karşı korudukları in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. Aviram PON1Q'nun Cu^{+2} indüklü LDL oksidasyonunu %60'a varan bir seviyede azalttığını, oysa PON1R alloenziminin aynı konsantrasyonunun oksidasyonu %40 azalttığını tespit etmiştir. PON1Q'nun LDL oksidasyonunun hemen başlangıcında ortama eklendiğinde oksidasyonu daha etkili blokladığını, oysa PON1R'nin reaksiyon başlangıcından 1 saat sonra etki gösterdiğini bulmuştur. Bu verilere dayanarak bu iki allelin farklı substratlar üzerinde etkili olduğu ya da serbest radikallere ve dolayısı ile LDL oksidasyonuna farklı şekilde cevap verdiklerini ifade etmiştir (42,62). Düşük aktiviteli Q allelinin lipid peroksitleri metabolize etme aktivitesi ise R'ye göre daha yüksektir (4) Buna göre Q allelinin R alleleline göre oksidasyona karşı koruyucu rolünün daha yüksek olduğu ileri sürülmektedir. (63-65). Q alleli düşük, R alleli ise yüksek PON aktivitesine sahiptir . Bütün

bu verilere dayanarak QQ genotipinin KAH'na karşı koruyucu rolünün RR genotipine göre daha yüksek olduğu söylenebilir.

Bu çalışmada QQ, RR, ve QR genotiplerindeki oLAb düzeylerine bakıldığında, kontrol grubunda en düşük oLAb düzeyi RR polimorfizminde gözlenirken, QQ ve QR'de yaklaşık %70-80 daha yüksek oLAb düzeyleri gözlenmektedir. RR'deki düşük oLAb düzeyi literatürle uygunluk göstermeyip tersine, yüksek PON aktivitesine rağmen düşük oLAb düzeyine sahiptir. Aynı tablo KAH grubunda incelendiğinde her grup polimorfizm arasında oLAb düzeyi bakımından rakamsal bir farklılık gözükmemektedir. Bu da PON'un HDL-K dışında başka faktörlerden de etkilenebileceğini göstermektedir. Buna dayanarak PON aktivitesi, plazma HDL düzeyi ve oLAb düzeyleri arasında polimorfizme bağlı başka faktörlerin de etkisi olabileceği kanaatimiz oluşmuştur.

Paraoksonaz Q192R gen polimorfizminin KAH ile ilişkisini açıklamaya yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Bunların sonuçları da oldukça farklılık göstermekle birlikte Aviram ve Mackness'ın tersine sonuçların büyük çoğunluğu Q192R polimorfizmi ile KAH arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermektedir

Tablo 19: KAH gruplarında PON1 Q192R polimorfizmi ilişkisine yönelik çalışmalar

Populasyon	KAH/Kontrol	R Alleli (%)	P	Genotip karşılaştırması	Kaynak
ABD	223/247	44(31)	0.0001	RR/QR>QQ	44
Fransa	171/267	35(26)	0.0001	RR/QR>QQ	61
Finlandiya	380/169	26(26)	AD		46
İngiltere	440/527	30(30)	AD		67
İtalya	310/142	30(27)	AD		47
Almanya	1000/1000	27(27)	AD		48
Japonya	134/252	62(60)	AD		68
Japonya	75/115	75(59)	0.002	RR>QR/QQ	69
Çin	218/218	64(65)	AD		45
Hindistan	122/125	43(33)	0.014	RR/QR>QQ	45
Türkiye*	96/105	38(31)	AD		71
Türkiye**	101/114	28(28)	AD		

* Aynacıoğlu ve ark.

**Bu çalışma

AD :Anlamlı değil

Çalışmamızda da sağlıklı çalışma ve kontrol grubu ile KAH grubu arasında genotipik olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Bu sonuç bu konuda ülkemizde yapılmış genotip çalışmaları ile uyumludur. Aynacıoğlu (70), ve Karakaya (71), Türk populasyonunda PON1 Q192R polimorfizmi ile KAH arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır.

Bazı araştırmacılar PON1 gen polimorfizminden ziyade PON aktivitesindeki farklılığın KAH için daha önemli olduğunu ifade etmektedir (49). Sentez sonrası post translasyonel modifikasyonların enzim aktivitesini belirleyebileceğini ve bu aşamadaki bir defektin veya farklı bir uygulamanın enzimin substrata ilgisini değiştirebileceğini söylemektedirler.

Genotiplerin dağılımı ve allel frekansları da toplumlar arasında farklılıklar göstermektedir. Genel olarak QQ genotipi daha yüksek bir orandadır. Bunu QR ve daha sonra da RR genotipi takip eder. Çalışmamızda da dağılım büyüklüğü olarak QQ, QR ve RR sıralamasını tespit ettik. Allel frekansları etnik grubun kendi içinde de oldukça farklı olabilir. Örneğin Karakaya(71) , Sözman (4) ve Aynacıoğlu(70) yüksek Q ve düşük R allel frekanslarını bulmuşlardır. Çalışmamızda bu üç çalışmayla uyumlu olarak yüksek Q ve düşük R allel frekansları tespit ettik (Tablo 9). Karakaya ve Sözmen PON enzim aktivitesi ve genotiplere göre dağılımları ile allel frekanslarını Aynacıoğlu ise Q192R polimorfizminin genotipik dağılımını ve Q ve R allel frekanslarını araştırmışlardır. Karakaya ayrıca genotipik dağılımı tuz konsantrasyonundaki fenotipik farklılığa dayanarak tespit etmiş ve bunların lipid ve lipoprotein parametreleri ile arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Azarsız ise kontrol, KAH hastaları ve KAH olmayan hastalar olmak üzere üç grupta PON aktivitesini, lipid ve lipoprotein parametrelerini ve TBARS ile MDA ölçümü yöntemi ile LDL oksidasyonunu karşılaştırmıştır. Çalışma gruplarımız, bu çalışmalarda gruplara göre daha fazla olup bu çalışmaların kombinasyonunu içermektedir. Bu çalışmaların hiçbirinde oLAb tayini yapılmamıştır.

Paraoksonaz polimorfizminin çalışma alanları gittikçe artmaktadır. Örneğin miyokard infarktüsü ile ilişkisi üzerine yapılan çalışmalarda polimorfizm ile MI riski arasında farklı sonuçlar elde edilmiştir. (72,73)

Paraoksonazın promoter polimorfizmi tespit edilmiş olup (74), polimorfimin bu tipinin PON aktivitesi ve KAH ile ilişkisini açıklayan yeterince çalışma yoktur.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

1-Sağlıklı çalışma grubunda :

- Lipid parametrelerinden HDL-K, her iki cinste de, ülkemizde yapılmış en kapsamlı çalışmalardan olan TEKHARF çalışmasındaki HDL-K düzeylerinden yüksek bulundu.TG değerleri ise TEKHARF'daki değerlere göre daha düşüktü. Diğer lipid parametreleri arasında bir fark yoktu.
- PON aktivitesinin sağlıklı çalışma grubundaki genotiplere göre dağılımı, etnik gruplar üzerinde yapılan çalışmalarda elde edilen dağılımlara uygunluk göstermektedir. QQ genotipi düşük, QR yüksek, RR ise en yüksek aktiviteye sahipti.
- QQ genotip dağılım sıklığı en fazlaydı (%56.7). Bunu QR (%34.6) ve RR izlemekteydi (%8.7).
- Q allel frekansı 0.73, R allel frekansı 0.27 olarak bulundu.

2- Kontrol ve KAH gruplarını karşılaştırmasında :

- Kontrol ve KAH grupları arasında lipid profili klasik literatür bilgileri ile uygunluk göstermekteydi.
- KAH ve kontrol gruplarında aynı genotipler arasında PON aktivitesi bakımından anlamlı bir farklılık yoktu.
- Kontrol grubunda QR, KAH grubunda RR genotipleri en yüksek PON aktivitesine sahipti.
- KAH ile PON aktivitesi ve Q192R gen polimorfizmi arasında bir ilişki görülmedi.
- Her iki grupta da QQ genotip dağılımı en fazla idi. Bunun sırası ile QR ve RR genotipleri izledi.
- Q/R allel frekansları kontrol ve KAH grubunda sırası ile 0.76/0.24, 0.73/0.27 şeklinde istatistiksel olarak anlamsız bulundu. Bu frekanslar İtalyan, Alman, Fin ve ülkemizde yapılmış diğer iki çalışmada elde edilmiş frekanslarla benzerdi.

6.2. Öneriler :

Q ve R allellerinin PON aktivitesini nasıl etkilediklerine dair yeterince çalışma bulunmamaktadır. PON'un farklı genotiplere göre aktivitesini belirleyen faktörlerin neler olabileceği araştırılabilir. Son zamanlarda keşfedilen PON1 promoter polimorfizmi ile PON1'in diğer polimorfizmleri arasında allel kombinasyonları oluşturarak PON1 aktivitesi üzerine etkileri inceleyebilir.

7. ÖZET

Koroner arter hastalığı tüm dünyada oldukça yaygın bir hastalık olup yüksek oranda mortalite ve morbidite etkisine sahiptir. Ateroskleroz kardiyovasküler hastalıkların başlıca sebebidir. Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), antiaterosklerotik bir lipoprotein olup koroner arter hastalığı insidansı ile güçlü biçimde ters bir ilişki içindedir. Paraoksonaz (EC:3.1.8.1. arildialkilfosfataz) HDL'nin yapısında bulunan bir enzim olup LDL oksidasyonunu engellediği belirtilmektedir. Paraoksonaz geni (PON1), 192. pozisyona 3 farklı (QQ, QR, RR) genetik polimorfizm göstermektedir. Çeşitli çalışmalarda PON1 Q192R polimorfizmi ile KAH arasında ilişki olduğuna dair sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmamızda paraoksonaz gen polimorfizmi ile PON1 aktivitesi, serum lipid parametreleri ve bunların KAH ile ilişkisinin tespiti amaçlandı. Sağlıklı çalışma grubu (152 erkek, 102 kadın), kontrol grubu (90 erkek, 24 kadın) ve KAH grubu (76 erkek, 25 kadın) olmak üzere üç çalışma grubu oluşturuldu. Bu gruplarda PON aktivitesi, lipid ve lipoprotein parametreleri (TK, TG, HDL-K, LDL-K, Apo AI, Apo B, Lp(a), Apo AI/ApoB) okside LDL antikor (oLab) ve PON aktivite/HDL-K tayinleri yapıldı. PON1 Q192R gen polimorfizmi çalışmasında genotiplerin dağılımı ve allel frekansı tespit edildi.

Çalışmamızda PON aktivitesi ve PON1 Q192R polimorfizmi ile KAH arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. Bununla beraber literatürlerle uyumlu olarak QQ genotipinin düşük, QR genotipinin yüksek ve RR genotipinin en yüksek aktiviteye sahip olduğu görüldü. Q ve R allel frekansları (sırası ile 0.76, 0.24) Türk toplumunda daha önceden yapılan çalışmalarla paraleldi.

Elde edilen veriler doğrultusunda PON1 aktivitesi, Plazma HDL-K ve LDL oksidasyonu arasında doğrudan etki olmadığı, bunların dışında başka faktörlerin de rolü olabileceği kanaatine varıldı.

SUMMARY

Serum Paraoxonase (PON1) Activity and Its Relationship with PON1 Polymorphism and Serum HDL-C Levels

Coronary artery disease is a common disease and it has high mortality and morbidity effect. Atherosclerosis is major cause of cardiovascular diseases. High density lipoprotein (HDL) an anti atherogenic lipoprotein, is strong inverse association with incidence of coronary artery disease. Paraoxonase (PON), (EC: 3.1.8.1) enzyme binds to HDL structure, and suggested that PON prevented low density lipoprotein from oxidation. PON has three different genetic polymorphism (QQ, QR, RR) on the 192. positions. Several studies have suggested that there are relationship between PON1 Q192 R polymorphism and coronary artery disease.

It was aimed to investigate PON1 192 gene polymorphism, PON1 activity, antibody against oxidized LDL, serum lipids parameters and their association with coronary artery disease. Our studies groups included total healthy group (152 men, 102 women), control group that obtained from total healthy group sex and age matched with CAD group (90 men, 24 women) and CAD group (76 men, 25 women). The levels of serum TC, TG, HDL-C, LDL-C, Apo AI, Apo B, Lp(a), Apo AI/ApoB , antibody against oxidized LDL (oLAb) and PON activity/HDL-C were determined. We also determined PON1 Q192R genetic polymorphism and Q, R allele frequency.

It was not find association assay PON activity PON1 Q192R polymorphism and CAD. However, It was found that QQ frequency has low PON activity, QR has more high levels and RR genotyping has highest activity. The allele frequency was 0.76/0.24 (Q/R) and this data same the other studies on Turkish population.

There are multifactorial interaction among plasma HDL-C, PON activity and oLAb levels and all these parameters may play important role on development of CAD.

KAYNAKLAR

1. Onat, A. : Risk factor and cardiovascular disease in Turkey. *Atherosclerosis*, 156:1-10, 2001.
2. Mahley, R., Palaoğlu, E., Atak, Z., ve ark : Türk kalp çalışması : Lipidler, lipoproteinler ve apolipoproteinler. *J. Lipid Research*, 36:839-860, 1995.
3. Warnick, G., Myres, G., Cooper, G., Rifai, N. : Impact of the third cholesterol report from adult treatment panel of the national cholesterol education program on the clinical laboratory., *Clin Chem*, 48 :11-17, 2002.
4. Azarsız, E., Sözmen, E. :Paraoksonaz ve klinik önemi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 25(3): 109-119, 2000.
5. Stein, O., Stein, Y. : Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis*, 144: 285-301, 1999.
6. Jere, P., Ling, L., Anantramaiah, G., Harvey, S., Kalliopi, N. : Structure and function of apolipoprotein A-I and high density lipoprotein. *Curr Opi Lipi*, 11:105-115, 2000.
7. www.icb.ufmg.br/pat/imagen/esquema/hdl.jpg'den alınmıştır (01.02.2005).
8. Gate, M., Paul, J., Nguye, B. G., Tew, K. D., Tagiero, H. : Oxidative stress induced in pathologies: The role of antioxidants. *Biomed&Pharmacother*, 53: 169-180, 1999.
9. Sinatra, S. T., De Marco, J. : Free radicals, oxidized low density lipoprotein (LDL), and the heart: Antioxidants and other strategies to limit cardiovascular damage. *Connecticut Med.* , 59(10):579-587, 1995.

10. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. :The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molec Aspects Med*, 8: 89-93, 1985.
11. Kohen, R. :Skin antioxidants: Their role in aging and oxidative stress-new approaches for their evaluation. *Biomed&Pharmacother.*, 53 :181-92,1999.
12. Sevanian, A., Ursini, F. : Lipid peroxidation in membrane and low density lipoproteins : similarities and differences. *Free Rad Biol Med.*, 29:306-311, 2000.
13. Estebauer, H., Wa G., Puhl, H. : Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br Med Bul*, 49:566-576, 1993.
14. Aviram, M. : Malondialdehyde affects the physico-chemical and biological characteristics of oxidized low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 34:141-143, 1990.
15. Hoff, HF., O'Neil, J. : Structural and functional changes in LDL after modification with both 4-hydroxynonenal and malondialdehyde. *J Lipid Res*, 34:1209-1217, 1993.
16. Gate, M., Paul, J., Nguye, BG., Tew, K. D., Tagiero, H. : Oxidative stress induced in pathologies: The role of antioxidants. *Biomed&Pharmacother*, 53: 169-80, 1999.
17. Jialal, I., Devaraj, S. :Low density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem*, 42:498-506,1996.

18. Chait, A., Brazg, B., Washington, S., Tribble, D. L. : Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern., B Am J Med, 94: 350-355, 1993.
19. Lynch, S. M., Frei, B. : Reduction of copper, but not iron by human low density lipoprotein (LDL). Implications for metal ion-dependent oxidative modification of LDL. J Biol Chem., 270: 5158-5163, 1995.
20. Parthasarathy, S., Santanam, N., Tamachandran, S., Meilhac, O. : Oxidants and antioxidant in atherogenesis : an appraisal. J. Lipid Res., 40: 2143-2157, 1999.
21. <http://www.herkules oulu.fi/isbn951426973x/html/x840.html> (01.02.2005). Jukka., H : Departman of Electrical and Information Engineering, University of Oulu.
22. Ross., R. :Pathogenesis of atherosclerosis –an update. N Eng J Med, 314:388, 1986
23. K lt rsoy., H . : Koroner kalp hastalığı :Primer ve sekonder korunma. Argos İletişim Hizmetleri. İstanbul, 2001.s.10-20
24. http://www.umm.edu/imagepages/enlarged_view_of_atherosclerosis_overview_18018.htm (01.02.2005), Sgarbossa.,E. : Universty of Maryland Medical Center.
25. Steinbrecher, U., Witztum, JL., Partasarathy, S. : Decrease in reactive amino groups during oxidation or endotelial cell modification of LDL. Arteriosclerosis,7:134-143, 1987.

26. Takasasji, M., Kitagawa, S., Masuyama, T. : Human monocyte-endothelial cell interaction induces synthesis of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Circulation*, 93:1185, 1996.
27. Raines., E, Ross., R. Smooth muscle and pathogenesis of the lesion of atherosclerosis., *BHJ*, 69:377-381, 1993.
28. Rader., D. : High density lipoproteins and atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 90 (supplement):62i-70i, 2002.
29. Gordon, DJ., Rifkind, BM. : High density lipoproteins: The clinical implications recent studies. *N Eng J Med*, 321:1311-1316, 1989.
30. O'Connel, B., Genest, J. : High density lipoproteins and endothelial functions. *Circulation*, 104:1978-1983, 2001.
31. Blair , A., Shaoul, PW., Yuhanna, IS., et al. : HDL prevents oxidized LDL- induced inhibition of endothelial nitric oxide synthase localization and activation in caveola. *J. Biol Chem*, 275: 11278-11283, 2000.
32. Primo -Pardo SL., Sorenson RC., Teiber J., La Du BN.: The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* , 33:498-507, 1996.
33. La Du, BN., Aviram , M., Billecke, S., Navab, M., Pardo, S., Sorenson, RC. :On the physiological role(s) of the paraoxonase. *Chem Biol Interact*, 119-120:379-388, 1999.
34. Mackness, MI., Mackness, B., Durrington, P., Cloney, PW. :Paraoxonase :Biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Cur Opin Lipid* , 7:69-76, 1996.

35. Humbert, R., Adler, DA., Disteche, CM., Hassett, C., Omiecinski, CJ., Furlong CE: The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nature Genetics*, 3:73-76 1993.
36. Furlong CE., Richter RJ., Seidel SL., Motulsky AG. Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon. *Am J Hum Genetics*, 43: 230-238, 1988.
37. Mackness, MI., Harty, D., Bhatnagar, D., Winocour, PH., Arol, S. : Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin dependent diabetes mellitus., *Atherosclerosis*. 86:193-199, 1991
38. Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, CL., et al. :Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions. *J Clin Invest*, 101:1581-90, 1998.
39. Ahmed, Z., Ramandi, A., Maguire, GF. : Multiple substrates for paraoxonase 1 during oxidation of phosphatidylcholine by peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun*, 290:391-96, 2002.
40. Shih., DM, Xia., Y, Wang., Y. : Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem*, 275:17527-535, 2000.
41. Mackness, B., David, H., Yifen, L., Mastorikou, M., Mackness., M. : Paraoxonase-1 inhibits oxidized MCP-1 production by endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 318:680-683, 2004.
42. Aviram, M. : Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Molecular Medicine Today*, 5:381-386, 1999.

43. Adkins, S., Gan, KN., Mody, M., La, Du. : Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: Glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes., *Am. J. Hum. Genet.* 52:598-608,1993.

44. Serrato, M., Marian, AJ. : A variant of human paraoxonase /arylesterase (HUMPONA) genetic a risk for coronary artery disease. *J Clin Invest* 96:3005-3008, 1995.

45. Sangherra, DK., Saha, N., Aston, CE., Kamboh., MI. : Genetic polymorphism of paraoxonase and risk of coronary heart disease. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 17:1067-73, 1997.

46. Antikainen, M., Murtomaki, K., Syvanne, M. et al.: The GLN-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest.* 98:883-85, 1996

47. Ombers, D., Panniteri, G., Mentali, A, et al. : The Gln-Arg 192 polymorphism of human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with coronary artery disease in Italian patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:1611-6, 1998.

48. Cascorbi, I., Laule, L., Mrozikiewich, PM., et al.: Lack of association of Paraoxonase L54M and Q192R polymorphism to coronary artery disease in 2000 German cases and controls. *Pharmacogenetics*, 6:755-761, 1999.

49. Mackness, B., Davies, GK., Turkie, W., Lee, E. : Paraoxonase status in coronary heart disease. Are activity and concentration more important than genotype?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:1451-1457, 2001.

50. Pati, N., Pati, U.: Paraoxonase gene polymorphism and coronary artery disease in Indian Subjects. *Int J Cardiol* 66(2):165-168, 1998.

51. Warnick, R., Gary, LM., Gerald, C., Nader, R. : Impact of the third cholesterol report from adult treatment panel of the National Cholesterol Education Program on the clinical laboratory. *Clinical Chemistry*, 48:11-17, 2002.

52. Örem, A., Değer, O., Önder, E., Karahan, SC., Efe, H., Uzunosmanoğlu, D. : Distribution of serum lipoprotein (a) concentrations in a healthy Turkish population. *Ann Clin Biochem*, 31:343-346, 1994.

53. Örem, A., Değer, O., Kulan, K., Önder, E., Kıran, E., Uzunosmanoğlu, D. : Evaluation of lipoprotein (a) [L(a)] as a risk factor for coronary artery disease in the Turkish population. *Clinical Biochemistry*. 28:171-173, 1995.

54. Grundy, S., Balady, GJ., Criqui, MH. : Guide to primary prevention of coronary heart disease. A statement for Health care professionals from the task forces on risk reduction. *Circulation*, 95: 2329-2331, 1998.

55. Azizi, F., Rahmani, R., Raishzade, F., Solati, M., Navab, M. : Association of lipids, lipoproteins, apolipoproteins and paraoxonase enzyme activities with premature coronary heart disease. *Coronary Artery Disease*, 13:9-1 2002.

56. Azrasız, E., Kayıkçıoğlu, M., Payzı, S., Sözmen, E. : PON1 activities and oxidative markers of LDL in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Int. J Cardiol*, 91:43-51, 2003.

57. Kural, BV., Örem, C., Uydu, H., Alver, A., Örem, A. : The effect of lipids lowering therapy on paraoxonase activities and their relationships with the oxidant-antioxidant system in patients with dyslipidemia. *Coronary Artery Disease*, 5:277-283, 2004.

58. Natalia, F., Camps, J., Fernandez, B., Arija, V., et al. : Regulation of serum paraoxonase activity by generic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem*, 49:1491-1497, 2003.
59. Seres, I., Paragh, G., Elaine, D., Tamas, F., Abddelouahed, K. : Study of factors influencing decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Experimental Gerontology*, 39:59-66, 2004.
60. Mackness, M., Durrington, P., Mackness, B. : Paraoxonase activity, concentration and genotype in cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipid*, 15:399-404, 2004.
61. Ruiz, J., Blanche, H., James, RW. et al. Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type II diabetes. *Lancet* , 346:869-72, 1995.
62. Aviram, M. : Paraoxonase activity site required for protection against LDL oxidation involves its free sulphydryl group and is different than required for its arylesterase / paraoxonase activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18:1617-1624,1998.
63. Mackness, B., Mackness, M., Arrol, S., Turkie. :Effect of human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphism on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *Febs Lett*, 423:57-60,1998.
64. Hegele, RA., Brunt, JH., Connely, PW. : A polymorphism of the paraoxonase gene associated variation in plasma lipoproteins in a genetic isolate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15:89-9 1995.
65. Natalia, F., Monica, T., Antoni, P., et al.:Paraoxonase Gln-Arg 192 and Leu-Met55 gene polymorphisms and enzyme activities in a population with low rate of coronary heart disease.*Clinical Biochemistry*, 35: 197-203, 2002.

66. Voetsch, B., Benke, K., Damasceno, B., Siquire, H. : Paraoxonase 192 gln-Arg polymorphism: an independent risk factor for non fatal arterial ischemic stroke among young adults. *Stroke*, 33:1459-1464, 2002.
67. Rice, GI., Ossei,GN., Stickland, MH., Grant, PJ. : The paraoxonase Gln-Arg192 polymorphism in subject with iscemic heart disease. *Coron Artery Dis*, 8:677-82,1997.
68. Seuhiro, T., Nakauchi, Y., Yamamoto, M., et al.: Paraoxonase gene polymorphismin japanese subjects with coronary heart disease. *Int J Cardiol*. 57:69-73, 1996.
69. Zama, T., Murata, M., Matsulara, Y., et al. : A 192 Arg variant of human paraoxonase (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk of coronary artery disease in japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17:3565-3569, 1997.
70. Aynacioğlu, AS., Kepekçi, Y. : The human paraoxonase Gln-Arg192 (Q/R) polymorphism in Turkish patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 74:33-37, 2000.
71. Karakaya, A., Ibis, S., Kural, T., Köse, SK., Karakaya, AE. : Serum paraoxonase activity and phenotype distribution in Turkish Subject with coronary heart disease and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Chemico-Biol Interact*, :193-200, 1999.
72. Senti, M., Thomas, M., Vila, J., Marrugat, J., Elosua, R. : Relationship of age releated myocardial infarction risc and Gln192Arg variants of human paraoxonase1 gene. *Atherosclerosis* , 156:443-449, 2001.

73. Imai, Y., Mortita, H., Kurihara, K., et al. : Evidence for association between paraoxonase gene polymorphism in japanese subject with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 149:435-442, 2000.
74. Leviev, I., Poirier, O., Nicaud, V., Evans, A., et al.:High expressor paraoxonase PON1 gene promoter polymorphisms are associated with reduced risc of vascular disease in younger coronary artery patients. *Atherosclerosis*, 161:463-467, 2002.



ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında İstanbul’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul’da tamamladı. 1991’de Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü’ne girdi ve 1995 yılında mezun oldu. Aynı yıl Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı. 1999 yılında “ Esansiyel Hipertansiyonlu Hastalarda Angiotensinogen Gen polimorfizmi” konulu tezini tamamlayarak masterini bitirdi. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’nda doktora başladı. Evli ve bir çocuk babasıdır.

