



**KOLESTEROLDEN ZENGİN DİYETİN SIÇAN DOKULARINDA PON1,
PON2, PON3 EKSPRESYON ve AKTİVİTELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Seda SABAH

**Temmuz 2010
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Seda SABAH tarafından Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ yönetiminde hazırlanan “kolesterolden zengin diyetin Sıçan dokularında PON1, PON2, PON3 ekspresyon ve aktiviteleri üzerine etkileri” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ
Jüri Üyesi (Danışman)



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10.05.2019 tarih ve 2019/13-1... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Doç. Dr. A. Çevik TUFAN
Müdür

**KOLESTEROLDEN ZENGİN DİYETİN SIÇAN DOKULARINDA PON1,
PON2, PON3 EKSPRESYON ve AKTİVİTELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

Seda SABAH

Danışman: Yard. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ

**Temmuz 2010
DENİZLİ**

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince bana her tűrlű desteęi veren deęerli tez danıőman hocam Yard. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ'e teőekkűr ederim. Yűksek lisans űęrenimim boyunca bilgilerini benden esirgemeyen baőta bűlűm baőkanımız Prof. Dr. Gűlseren BAĖCI ve tűm bűlűm hocalarıma teőekkűrű borç bilirim. Pamukkale űniversitesi Bilimsel Araőtırma Projeleri Koordinasyon Birimine katkılarından dolayı teőekkűr ederim. Tez çalıőmam boyunca katkılarından dolayı çalıőma arkadaőlarıma ve her zaman yanımda olan aileme çok teőekkűr ederim.

Bu tezin tasarımı, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :

Öğrenci Adı Soyadı : Seda SABAH

ÖZET

KOLESTEROLDEN ZENGİN DİYETİN SIÇAN DOKULARINDA PON1, PON2, PON3 EKSPRESYON ve AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Sabah, Seda
Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji ABD
Tez Yöneticisi: Yard. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ

Temmuz 2010, 64 sayfa

Paraoksonaz enzim ailesi PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç gen içerir. PON1 ve PON3 genel olarak karaciğerde eksprese edilip kana verilirler ve plazma HDL ile birlikte taşınırlar. PON2 serumda bulunmayıp bir çok dokuda sentezlenir ve sitoplazmik yerleşim gösterir. PON'un fizyolojik substrat (lar)'ı henüz tanımlanmamıştır; fakat organik fosforlu insektisitleri ve sinir gazı yapımında yaygın olarak kullanılan sarin, soman gibi organofosfat bileşiklerinin hidrolizini katalizlemekte ve bu nedenle *in vivo* ksenobiyotik metabolizması ve toksikolojik çalışmalar için büyük önem taşımaktadır. Paraoksonaz enzimleri oksidatif hasarı önleyerek yüksek derecede ateroprotektif etki gösterirler. Lipit hidroperoksitlerini hidrolize ederek ve LDL'yi oksidatif modifikasyondan koruyarak ateroskleroz oluşumunu engellerler. Bu çalışmada yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak tüm sıçan (*Rattus norvegicus*) dokularında PON1, PON2 ve PON3 mRNA ekspresyonlarını semikantitatif olarak saptanmış, paraoksonaz enzim aktivitesi ve ekspresyonu arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Ayrıca sıçanlarda kolesterol diyeti uygulanarak oluşturulacak ateroskleroz modelinde paraoksonaz enzim miktarlarıyla aktiviteleri arasındaki ilişkinin nasıl etkilendiği incelenmiştir. Kolesterol diyeti ile beslenen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri artmış, PON1 ve PON3 ekspresyonları azalmış PON2 ekspresyonu ise değişmemiştir. Oksidasyona duyarlılık testinde deney ortamında bulunan biyolojik moleküller yüksek konsantrasyonda bakır klorürle oksidasyona tabi tutulmuşlardır. Antioksidan mekanizmalarla korunmuş olan doku örneklerinde oksitlenebilir moleküller daha fazla olacağından test sonucunda artmış MDA düzeyleri antioksidan potansiyelin dolaylı bir göstergesi olarak ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Paraoksonaz, Ateroskleroz, Oksidatif stres

ABSTRACT

THE

EFFECTS OF CHOLESTEROL-RICH DIET ON PON1, PON2, PON3

EXPRESSIONS AND ACTIVITIES IN RAT TISSUES

Sabah, Seda
M.Sc. Thesis In Medical Biology
Supervisor: Ass. Prof. Dr. Nedim KARAGENC

July 2010, 64 page

Paraoxanase enzyme family contains three genes which are PON1, PON2 and PON3. PON1 and PON3, generally, are expressed and secreted from liver to blood and transported along with HDL. PON2 is synthesized in many tissues except serum and resides in cytoplasm. Yet, none of the physiologic PON substrates are identified, however, it catalyzes insecticides with organic phosphorus and organophosphate compounds like sarin and soman that widely used in producing nerve gas thus it has crucial role for *in vivo* xenobiotic metabolism and toxicologic studies. Paraoxanase enzymes prevent oxidative damage and thus have potential atheroprotective effect. It block atherosclerosis formation by hydrolyzing lipid hydroperoxides and preserve LDL from oxidative modification. In this study, apart from other studies, PON1, PON2 and PON3 mRNA expressions were semiquantitatively detected in all rat (*Rattus norvegicus*) tissues and the relationship between paraoxanase enzyme activity and its expression were also assessed. Furthermore, it was also investigated that how the relationship between paraoxanase enzyme amounts and activities were affected through generated atherosclerosis model by cholesterol diet. Comparing to control group, experiment group that was feeded with cholesterol dietary has increased paraoxanase and arilyasterase activities whereas PON1 and PON3 expressions decreased and there was no change in PON2 expression. Biological molecules that was present during experiment were exposed oxidation by high concentration cuprous-chloride in oxidation susceptibility test.

Key Words: Paraoxanase, atherosclerosis, oxidative stress

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İçindekiler	v
Şekiller Dizini.....	vii
Tablolar Dizini.....	viii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	2
2.1.Serbest oksijen radikalleri.....	2
2.1.1.Süperoksit radikali	3
2.1.2.Hidrojen peroksit	4
2.1.3.Hidroksil radikali.....	4
2.1.4.Singlet oksijen.....	5
2.1.5.Nitrik oksit.....	6
2.2. Lipit peroksidasyonu.....	7
2.3. Oksidatif stres.....	9
2.4. Antioksidan molekül ve sistemler.....	10
2.5. Paraoksonaz Enzimi.....	14
2.6.Oksidatif stres ve paraoksonaz ilişkisi.....	15
2.7.Paraoksonaz ve ateroskleroz.....	17
2.7.1.Ateroskleroz gelişimi.....	17
2.7.2. Statinler	20
2.8 Paraoksonaz ve HDL-LDL.....	20
2.9.Paraoksonazların modülasyonu.....	22
2.9.1. Ekzojen bileşikler ile PON1 modülasyonu.....	22
2.9.1.1 Çevresel kimyasallar.....	22
2.9.1.2 İlaçlar.....	23
2.9.1.3 Klasik uyarıcılar.....	23
2.9.2. Hayat standartlarıyla PON1 modülasyonu.....	23
2.9.2.1 Sigara kullanımı.....	23
2.9.2.2 Alkol kullanımı.....	24
2.9.2.3 Antioksidanlar.....	24
2.9.3 Yaşın ve cinsiyetin PON1 aktivitesi üzerine etkisi.....	24
2.9.3.1 Gelişim sürecinde PON1.....	24
2.9.3.2 PON1 ve yaşlanma.....	25
2.9.3.3 Cinsiyetin PON1 aktivitesi üzerine etkisi.....	25
2.9.3.4 Fizyolojik ve patolojik koşullarda PON1.....	25
2.10 Paraoksonaz gen ailesi.....	25
3. MATERYAL VE METOD	27
3.1 Deney hayvanlarının beslenmesi ve örneklerin elde edilmesi.....	27
3.2 Dokularda RNA izolasyonu.....	27
3.3 cDNA sentezi	28
3.4 Polimeraz zincir reaksiyonu.....	29
3.5 Agaroz jel hazırlanması.....	32

3.6 Enzim aktivitesi ölçümü için rat dokularının homojenizasyonu.....	33
3.7 Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonlarının hesaplanması.....	33
3.8 Malondialdehit tayini ve oksidasyona duyarlılık.....	34
3.9 MDA standart eğrisinin elde edilmesi.....	36
3.10 Oksidasyona duyarlılık.....	36
3.11 MDA ve oksidasyona duyarlılığın hesaplanması.....	37
3.12 Serumda ve dokularda paraoksonaz aktivitesinin ölçümü.....	37
3.13 Paraoksonaz aktivitesinin kalibrasyonu.....	38
3.14 Paraoksonaz aktivitesinin hesaplanması.....	39
3.15 PON1 enzimi arilesteraz aktivitesinin ölçümü.....	40
3.16 PON1 enzimi arilesteraz aktivitesinin hesaplanması.....	41
4. BULGULAR.....	43
4.1 Sıçan PON genlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi.....	43
4.2 PON1 ekspresyonu.....	44
4.3 PON2 ekspresyonu.....	45
4.4 PON3 ekspresyonu.....	45
4.5 Paraoksonaz enzim aktivitesi.....	46
4.6 Arilesteraz enzim aktivitesi.....	48
4.7 MDA tayini ve oksidasyona duyarlılık.....	50
4.8 Verilerin değerlendirilmesi.....	53
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ	57
7. KAYNAKLAR	59
8. ÖZGEÇMİŞ.....	64

ŞEKİLLER DİZİNİ**Sayfa**

Şekil 2.1 Lipit peroksidasyonunun temel basamakları süreci.....	8
Şekil 2.2 Antioksidan enzimler ve reaksiyonları	11
Şekil 2.3 Askorbik asit yapısı.....	14
Şekil 2.4 PON1 enziminin modülasyonu.....	22
Şekil 3.1 TBA- MDA kompleksini oluşumu.....	34
Şekil 3.2 MDA standart eğrisi.....	36
Şekil 3.3 Paraoksonun p-nitrofenol ve asetik asite parçalanması.....	37
Şekil 3.4 PON1 paraokson standart eğrisi.....	38
Şekil 3.5 Paraoksonaz fenilasetatın fenol ve asetik asite parçalanmasını katalizler.....	40
Şekil 3.6 PON1 arilesteraz standart eğrisi.....	41
Şekil 4.1 Beta aktin, PON1, PON2 ve PON3 ekspresyonları agaroz jel görüntüsü.....	43
Şekil 4.2 Sıçan dokularında PON1 ekspresyonu.....	44
Şekil 4.3 Sıçan dokularında PON2 ekspresyonu.....	45
Şekil 4.4 Sıçan dokularında PON3 ekspresyonu.....	46
Şekil 4.5 Sıçan dokularında paraoksonaz aktivitesi	47
Şekil 4.6 Sıçan serumunda paraoksonaz aktivitesi.....	47
Şekil 4.7 Sıçan dokularında arilesteraz aktivitesi.....	49
Şekil 4.8 Sıçan dokularında arilesteraz aktivitesi.....	49
Şekil 4.9 Sıçan dokularında MDA tayini.....	51
Şekil 4.10 Sıçan dokularında oksidasyona duyarlılık.....	51

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Ekstraselüler, intraselüler ve membran antioksidanlar.....	13
Tablo 3.1 cDNA sentezi reaksiyon içeriği.....	28
Tablo 3.2 Beta aktin gen primerinin özellikleri	30
Tablo 3.3 Paraoksonaz 1 gen primerinin özellikleri.....	30
Tablo 3.4 Paraoksonaz 2 gen primerinin özellikleri.....	31
Tablo 3.5 Paraoksonaz 3 gen primerinin özellikleri.....	31
Tablo 3.6 PON1, PON2, PON3 ve beta aktin genleri için PCR karışım içeriği.....	32
Tablo 3.7 MDA tayini protokolü.....	35
Tablo 4.1 PON1, PON2 ve PON3 ekspresyonlarının yüzdeleri.....	44
Tablo 4.2 Sıçan dokularında ve serumda paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümlerine ait ortalamalar ve standart sapma değerleri.....	48
Tablo 4.3 Sıçan dokularında ve serumda aril esteraz enzim aktivitesi ölçümlerine ait ortalamalar ve standart sapma değerleri.....	50
Tablo 4.4 Sıçan dokularında ve serumda MDA tayini ölçümlerine ait ortalamalar ve standart sapma değerleri.....	52
Tablo 4.5 Sıçan dokularında ve serumda oksidasyona duyarlılık testi ölçümlerine ait ortalamalar ve standart sapma değerleri.....	52

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Apo E:	Apolipoprotein E
BSA:	Bovine Serum Albumin
cDNA:	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CHD:	Kroner Kalp Hastalıkları
CSF:	Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
DHEA:	Dehydroepiandrosterone
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit
HDL:	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
LDL:	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LPS:	Lipopolisakkarit
MCP-1:	Monosit Kemoatraktan Protein 1
MDA:	Malondialdehit
MM LDL:	Minimal Modifiye Düşük Dansiteli Lipoprotein
NADPH:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NOS:	Nitrik oksit sentaz
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
ROS:	Reaktif oksijen türleri
SOD:	Süperoksit dismutaz
TBA:	Tiyobarbitürik asit
TCA:	Trikloro asetik asit

1.GİRİŞ

Paraoksonaz enzim ailesi PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç gen içerir. Bu genler insan kromozomunda yedinci, fare kromozomunda ise altıncı kromozomda yer almaktadırlar (Godfrey vd 2004). PON1 ve PON3 genel olarak karaciğerde eksprese edilip kana verilirler ve plazma HDL ile birlikte taşınırlar. PON2 serumda bulunmayıp bir çok dokuda sentezlenir (Teiber vd 2007).

PON1 en çok çalışılan paraoksonaz enzim ailesi üyesidir. PON1 aromatik esterlerin, organofosfat insektisitlerin toksik okson metabolitlerinin ve sinir gazlarının hidrolizini katalizlemekte ve bu nedenle *in vivo* ksenobiyotik metabolizması ve toksikolojik çalışmalar için büyük önem taşımaktadır. PON1 aynı zamanda lakton hidrolizini katalizleyerek bazı ilaçları da kapsayan bir çok laktonun laktonizasyon reaksiyonlarında görev alır (Teiber vd 2007). Paraoksonaz enzim ailesi üyelerinin tümü antioksidan etki göstermektedir. PON enzimlerinin antioksidan enzim olarak görev almaları ateroskleroz gelişimine karşı koruyucu bir etki sağlamaktadır. PON1 enzimi aterosklerotik lezyonları, okside kolesterolü, okside LDL'deki okside fosfolipitleri hidrolize ederek ateroskleroza karşı koruyucu etki gösterir (Draganov ve La Du 2003).

Bu çalışmada yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak tüm sıçan (*Rattus norvegicus*) dokularında PON1, PON2 ve PON3 mRNA ekspresyonlarını semikantitatif olarak saptayarak, enzim aktivitesi ve ekspresyonu arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amaçlanmıştır. Ayrıca sıçanlarda kolesterol diyeti uygulanarak oluşturulacak ateroskleroz modelinde paraoksonaz enzim miktarlarıyla aktiviteleri arasındaki ilişkinin nasıl etkilendiği incelenecektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Serbest oksijen radikalleri

Serbest oksijen radikalleri dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren moleküler yapılar olarak tanımlanır. Oksijenden tek elektron indirgenmesi sonucu oluşan serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidan yıkım; iskemi, hiperoksijenizasyon ve doku inflamasyonu gibi birçok olayda yer alarak hastalıkların patogenezinde rol oynar. Serbest radikaller biyolojik sistemlerde radyoliz, fotoliz, organik materyalin termal yıkımı, metal iyonlarının ve enzimlerin katalize ettiği redoks reaksiyonları gibi çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşur (Şimşek 1999).

Biyolojik sistemlerde oksijen fazla miktarda bulunan bir moleküldür. Bir radikal olmasına karşın iki adet eşleşmemiş elektronun farklı moleküler orbitallerde yer alması ve paralel spin göstermesi açısından reaktiftir. Bu yüzden oksijen nikotinamid adenin dinükleotit (fosfat) (NADH/NAD(P)H) oksidaz ve ksantinoksidaz (XO) gibi enzimler ile univalan redüksiyon geçirerek süperoksit formuna dönüşür. Nonenzimatik olarak, oksijen redoks aktif bileşikleriyle reaksiyona girerek mitokondri elektron taşıma sisteminde semiubiquinon gibi süperoksit haline gelebilir. Süperoksit dismutazlar ile süperoksit anyonu enzimatik olarak dismutazlanır ve hidrojen peroksit ortaya çıkar. Biyolojik dokularda da süperoksit enzimatik olmayan transformasyon geçirerek hidrojen peroksit ve singlet oksijene dönüşebilir. Hidrojen peroksit diğer radikaller ile reaksiyona girerek yüksek derecede reaktif hidroksil radikalleri oluşturur. Bu olay Fenton reaksiyonu olarak bilinir. Bu radikaller biyomoleküllere oksidasyon ile zarar verirler (Nageswara vd 2005).

Oksijen atmosferde dioksijen ya da moleküler oksijen (O₂) olarak bulunmaktadır. Moleküllerin oksijen ile oksitlenmesi durumunda, oksijen molekülü indirgenir ve iki tane serbest radikal ortaya çıkar (Gutteridge 1995).

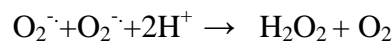
Oksijen bir oksidan ajandır. Normal koşullarda moleküler oksijenin çoğu sitokrom sistemi gibi hücre içi sistemler içinde redüksiyona uğrar. Bununla beraber %2 oranında bu yoldan sızan oksijenin biyolojik yapılarda univalan redüksiyonu sonucu, serbest

oksijen radikalleri olarak adlandırılan reaktif ürünler açığa çıkar. Hidrojen peroksit, nitrik oksit, hidroksil radikali bunlardan bazılarına örnek olarak verilebilir. Organizmada serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu reaksiyonlar radikal bir diğer radikal ile veya radikal olmayan ajanlar ile karşılaşması ile oluşur. Serbest radikaller birbiri ile karşılaştığında kovalan bir molekül oluşturacak şekilde reaksiyona girerler. Serbest radikaller organizmada radikal olmayan birçok hücre bileşeni ile de reaksiyona girebilir ve bu bileşenlerin yapı ve işlevlerini değiştirir. Böylece serbest radikaller organizmada moleküler düzeyde birçok biyolojik etkiye neden olur; DNA yıkımı, proteinlerin yıkımı ve enzim aktivitelerinde değişiklik, hücre membran lipidleri ve hücre organellerinin yıkımı örnek olarak verilebilir (Şimşek 1999).

Moleküler oksijen suya indirgenebilir. Oksijen redüksiyonunun ara basamağı, bir, iki ve üç elektrona karşılık olan süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalının formasyonudur. Moleküler oksijenin triplet temel hali di radikal olarak, elektronik olarak singlet moleküler oksijene uyarılabilir. Oksijen radikalleri lipidlerde reaksiyona girerek alkil veya peroksil radikalleri olarak oluştururlar. Oksidan oluşumu ayrıca çeşitli radyasyon tipleriyle de oluşur. X ışınları hidroksil radikallerinin oluşmasına, ultraviyole ışınları elektronik olarak uyarılmış çeşitli radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Ultrasound ve mikrodalga ışınları da reaktif oksijen türlerinin oluşmasına sebep olur (Sies 1997).

2.1.1 Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Süperoksit radikali moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar. Süperoksit sıvı solüsyonda hidrojen peroksit ve oksijen oluşumunu sağlayan dismutasyon reaksiyonundan dolayı hızlıca kaybolur.



Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile bu reaksiyon hızlanır. Süperoksit radikalının kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit

kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir, oksidan perhidroksi radikali (HO_2^\bullet) oluşturmak üzere protonlanır (Gutteridge 1995).

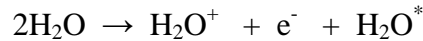
2.1.2 Hidrojen peroksit (H_2O_2)



Herhangi bir sistem süperoksit üretecek ise dismutasyon reaksiyonu sonucu aynı zamanda hidrojen peroksit de üretir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipit peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Ürat oksidaz, glukoz oksidaz, D-aminoasit oksidaz gibi pek çok enzim oksijene iki elektron transferi ile hidrojen peroksit üretirler. Geçiş metal iyonları yokluğunda hidrojen peroksit zayıf bir oksidan ve indirgeyici ajandır. Hidrojen peroksit hızlıca su ile karışarak vücut içinde su molekülü gibi davranır ve hızlıca hücre zarına difüze olur. İstenmeyen hidrojen peroksit hücreden katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer peroksidazlar ile dışarıya atılır (Gutteridge 1995).

2.1.3 Hidroksil radikali (OH^\bullet)

Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali iki şekilde oluşmaktadır. İyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması gerçekleşir.



Uyarılmış su molekülü (H_2O^*) yıkım ile, H_2O^+ ise bir su molekülü ile tepkimeye girerek hidroksil radikali oluştururlar. Bu tepkimeler çok kısa sürede gerçekleşir ve üretilen OH^\bullet , radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal türdür. H_2O_2 'nin iki elektron ile indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektron ile

indirgenmesi $\cdot\text{OH}$ yapımına neden olur. Bu tür indirgenme Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir. Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamda oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden H_2O_2 'den $\cdot\text{OH}$ yapımı sürekli bir duruma gelir.

Hidroksil radikali fenton reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten de oluşmaktadır.



Fizyolojik pH'da (7.4) , demir iyonları ferro (Fe^{2+}) , oksijen ve fosfat iyonları varlığında geçici olarak ferri (Fe^{3+}) halinde bulunurlar. Bu geçiş sırasında demirden oksijene bir elektron transferi ile süperoksit radikali oluşur (Gutteridge 1995).

2.1.4 Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksijen eşlenmemiş elektron çifti bulundurmasından dolayı serbest radikal olarak adlandırılmaz. Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda reaktivite çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip yeniden oksijene dönebilir. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini, oluşturur ve $\cdot\text{OH}$ kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir.(Gutteridge 1995).

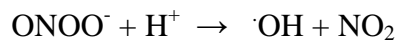
Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Bu moleküllerin başında tokoferoller, fenoller, bilirubin, DNA, karotenler, kolesterol, NADPH, triptofan, methionin, sistein ve histidin gibi bileşikler gelir. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini ($\text{ROO}\cdot$) oluşturur ve $\text{HO}\cdot$ kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir. (Kılınç 2002)

2.1.5 Nitrik oksit

Nitrik oksit oluşumu memeli hücrelerinde yaygındır ve NADPH'a bağımlı nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini gerektirir. Nitrik oksit'in moleküler orbitalinde eşlenmemiş elektron çifti bulunduğu için serbest radikal olarak yarı ömrü çok kısadır. (Benzer ve Ozan 2002).

Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipid radikallerle (örneğin hücre zarında) tepkimeye girmesi NO'ya antioksidan bir etki kazandırır. Süperoksit ile NO arasındaki tepkime ile oluşan peroksinitrit (ONOO⁻), hidroksil radikali benzeri aktiviteye sahip olup radikalik tepkimeleri başlatmaya ilave olarak biyomoleküllerin nitrasyonuna neden olur. Peroksinitrit (ONOO⁻) bir çok biyolojik moleküle zarar veren güçlü bir oksidandır. Asidik ortamda ayrışarak metal katalizinden bağımsız olarak az miktarda hidroksil radikali oluşturur. Fizyolojik düşük derişimde üretilen NO esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO₃⁻) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır (Kılınç 2002).

Vasküler fizyoloji ve patofizyolojide nitrik oksit, süperoksit, hidrojen peroksit ve peroksinitrit gibi reaktif oksijen türleri önemli rol oynamaktadır. Nitrik oksit damar içinde endotelial nitrik oksit sentaz enzimi tarafından üretilir. İnflamasyon durumunda indüklenebilen bir enzim olan endotelial nitrik oksit sentaz makrofaj ve düz kas hücrelerinde eksprese edilerek nitrik oksit üretimine yardımcı olur (Kathy vd 2003).

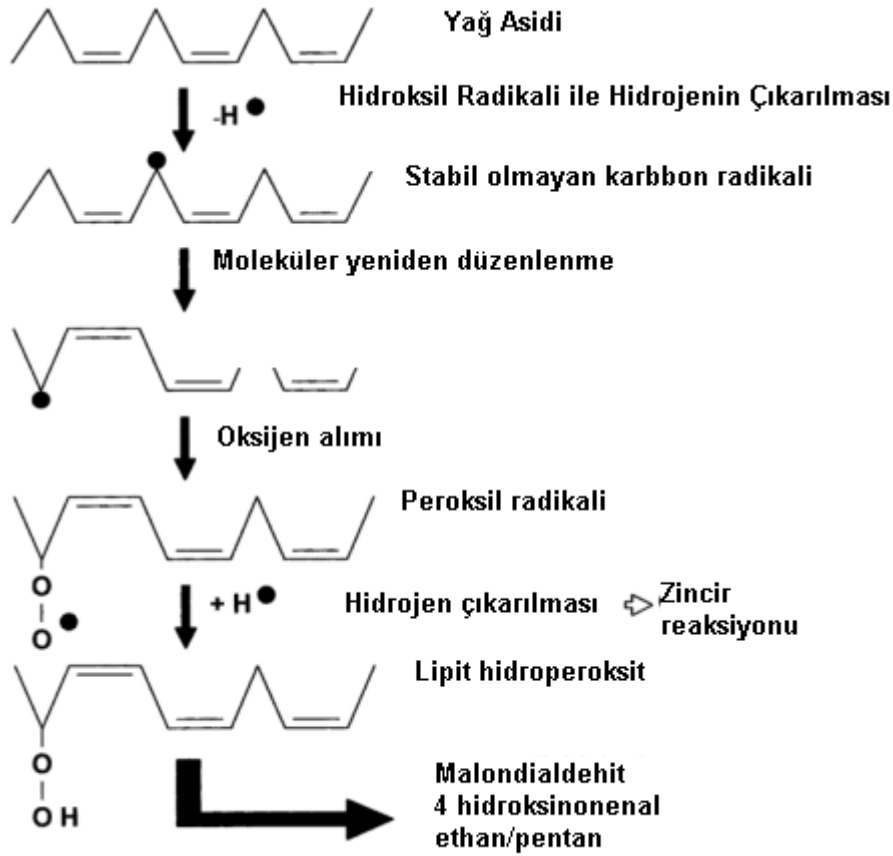


Peroksinitrit lipid peroksidasyonunda ve protein nitrasyonunda önemli bir mediatördür. Nitrik oksit süperoksit yokluğunda süperoksit dismutaz tarafından daha stabil reaktif oksijen türü olan hidrojen peroksite dismutazlanır. Süperoksit ve hidrojen peroksitin vasküler fonksiyonlara etkisi bu moleküllerin üretildikleri miktarlara bağlıdır. Düşük miktarlarda bulduklarında hücre içerisinde ikincil haberci olarak etki gösterirler. Biyokimyasal yolların, vasküler düz kas hücrelerinin ve fibroblastların büyümelerine cevapla ilişkili fonksiyonları düzenlerler. Aşırı miktarda reaktif oksijen türü düz kas hücrelerinde ve endotelial hücrelerde, DNA hasarına, toksisiteye ve hatta apoptoza neden olabilir (Kathy vd 2003).

2.2 Lipit peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu oksidatif stres altında hücre zarı ve diğer lipit içeren hücre yapılarının dejenerasyonunu gerçekleştiren bir süreçtir (Girotti 1998). Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar (Girotti 1998). Lipit peroksidasyonu, membranlarda bulunan poliansature yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipit hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffuze olup hücrenin diğer bölümlerine hasar yayarlar, böylece bir çok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar (Benzer ve Ozan 2002).

Lipit peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipit radikali haline alması ile başlar. Lipit radikallerinin moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikalleri ($LOO\bullet$) oluşur. Lipit peroksit radikalleri ($LOO\bullet$), zar yapısındaki diğer poliansature yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit peroksitlerine ($LOOH$) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. Lipit peroksidasyonu serbest radikal zincir reaksiyonunda iki radikal zinciri sonlandırmak için birbirlerini tüketene kadar ilerler. Lipit hidroperoksitleri ($LOOH$) doymamış fosfolipitlerden, glikolipitlerden ve kolesterolden türer. Lipit hidroperoksitler, hidroksil radikali, peroksil radikalleri, singlet oksijen ve peroksinitrit gibi serbest radikaller ile uyarılan oksidatif reaksiyonların ara ürünleridir (Gutteridge 1995).



Şekil 2.1 Lipit peroksidasyonunun temel basamakları (Young 2001)

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit peroksitlerinin (LOOH) yıkılımı geçiş metallere iyon kataliziyle olur. Lipit peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının tümü ile uyarılabilir ve geçiş metallere varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir (Girotti 1998).

Lipit peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. Malondialdehit (MDA) kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir göstergesi olmamakla beraber lipit peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit (MDA) ölçülmesi lipit peroksit seviyelerinin göstergesi olarak kullanılır.

Hücre zarında bulunan doymamış fosfolipitler, glikolipitler ve kolesterol oksidan atakları için belirli hedeflerdir. Bu durum hedef sistemin yapısını ve fonksiyonunu bozarak lipit peroksidasyonunu gerçekleştirerek sitopatolojik sonuçlar ortaya çıkmasına neden olur. Lipit peroksidasyonu ateroskleroz, iskemi ve karsinogenezler gibi bir çok çeşitli hastalık ile ilişkilidir. Lipit peroksidasyonu aynı zamanda oksidan temelli kemoterapötik ve fototerapötik ilaçların sitotoksik etkilerinde önemli rol oynar (Girotti 1998) .

2.3 Oksidatif stres

Genel olarak antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki dengenin potansiyel bir hasara bağlı olarak oksidanlar yönünde değişmesi oksidatif stres olarak tanımlanır. Antioksidan defans enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere iki strateji içerir (Sies 1997).

Reaktif oksijen türlerinin artışı veya antioksidan koruma sisteminin azalmasıyla ortaya çıkan oksidatif stresin klinik olarak organizmada, ateroskleroz, hipertansiyon, kanser, böbrek rahatsızlıkları ve nörodejenerasyon gibi bir çok patofizyolojik olayla ilişkili olduğu bilinmektedir (Kathy 2003).

Büyüme faktörü ve sitokinlere cevap olarak solunum fagositoz gibi normal hücrel olaylar sırasında ökaryotik hücreler serbest oksijen radikalleri üretirler. Bu durumu kompanse edebilmek için hücreler serbest oksijen radikallerin toksik etkilerinden korunabilmek amacıyla enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalara sahiptirler. Bu mekanizmalar süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimlerle etki gösterirler. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise glutatyon, askorbat ve α -tokoferolü içerirler (Nagaeswara vd 2005). Patofizyolojik durumlarda oksidanların aşırı artışı hücrel antioksidan sisteminin etkisini ortadan kaldırabilir. Bunun sonucunda oksidatif stres ile hücrenin lipitleri, membranı, proteinleri ve DNA'sı gibi hücrel yapılar hasar görür (Kathy vd 2003).

Oksidatif stresten korunma amacıyla, güneş ışınlarından korunmak için planktonların deniz yüzeyinin alt kısımlarına yerleşmeleri, DNA'nın kromatin olarak paketlenmesi gibi canlıların geliştirdiği birçok strateji vardır (Sies 1997).

Bazı enzimler serbest radikal türlerini üretmeye uygundurlar. Hücrel oksijen redüksiyonunu gerçekleştiren sitokrom oksidaz, demir ve bakır iyonları içermesine rağmen süper oksit veya diğer radikalleri ortaya çıkarmaz. Zincir reaksiyonunun başlamasının önlenmesi demir ve bakır iyonlarının bağlanması içerir. Ferritin, transferin, seruloplasmin gibi metal bağlayan proteinler potansiyel radikal oluşumunun kontrolünde önemli role sahiptir. Hücrelerin radyasyondan korunmaları, özelleşmiş pigmentler ile gerçekleşir, ultraviyole radyasyon için melanin, uyarılmış durumda olan singlet oksijen için karetonoitler gibi (Sies 1997).

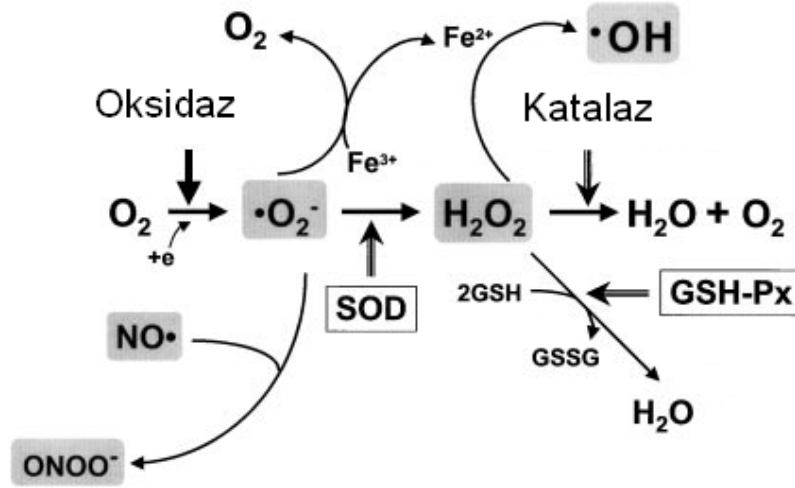
2.4 Antioksidan molekül ve sistemler

Hücrelerde serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu oksidan yıkıma karşı birçok koruyucu antioksidan mekanizma bulunmaktadır. Antioksidanlar; lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak ya da oksijeni uzaklaştırarak, katalitik metal iyonlarını uzaklaştırarak, süperoksit, hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini uzaklaştırarak, hidroksil, alkoksil ve peroksil türleri gibi serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek ve singlet oksijeni uzaklaştırarak etki gösterirler (Gutteridge 1995). Ökaryot hücrelerde bulunan antioksidan maddeler ve enzimler tablo 2.1' de özetlenmiştir.

Antioksidanlar işlevlerine göre iki gruba ayrılır:

- I. Serbest radikal oluşumunu önleyenler: Metal bağlayıcılar (transferrin, albumin, seruloplazmin) ile süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz enzimleridir.
- II. Zincir kıran ajanlar: Yağda eriyenler; α - tokoferol, ubiquinone, β - karoten; Suda eriyenler, Glutatyon, ürat, sistein ve askorbattır (Şimşek vd 1999).

Ökaryotik organizmalar içerisinde tüm hücreler güçlü antioksidan sistemlere sahiptir. Çok sayıda özelleşmiş antioksidan enzim bulunmaktadır. Antioksidan enzimlerin üç büyük sınıfı, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH)'dır (Kathy vd 2003, Sies 1997).



Şekil 2.2 Antioksidan enzimler ve reaksiyonları

Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit serbest radikalinin hidrogen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. SOD'un fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. İnsanda süperoksit dismutazın iki izomer tipi bulunmaktadır. Cu-Zn SOD sitozolde bulunur, Cu ve Zn içerir, dimerik yapıdadır, siyanitle inhibe edilir. Mn SOD mitokondride bulunur, Mn içerir, tetramerik yapıdadır, siyanitle inhibe olmaz. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dur (Gutteridge 1995).

SOD



Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Organik hidroperoksitlerin ve hidrogen peroksitin uzaklaştırılmasından sorumludur (Gutteridge 1995). Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz sitoplazma, mitokondri ve nükleusta bulunan enzimlerdir. Glutasyon peroksidaz, indirgenmiş glutasyonu hidrogen donörü olarak kullanarak hidrogen peroksiti suya metabolize eder. Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz ile oluşturulan NADPH kofaktörünü kullanarak glutasyon redüktaz glutasyon disülfiti glutatyona geri çevirir. Diyabet hastalarında glutasyon peroksidaz aktivitesi karaciğer, aort, pankreas, böbrek, kan ve kan hücrelerinde yükselirken kalp ve retinada düşmüştür (Jang vd 2000). Diyabet hastalığında artan glutasyon peroksidaz

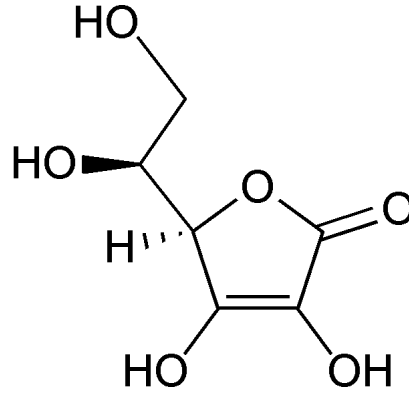
aktivitesi, probukol, DHEA, C, E vitaminleri, β -karoten, quercetin (karaciğer ve beyinde), koenzim Q₁₀ (karaciğerde), piperin (böbrekte), aminoguanidin, melatonin, α lipoik asit muamelesi ile tersine çevrilir (Maritim 2002).

Katalaz, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayarak etki gösterir (Gutteridge 1995). Katalaz birçok dokuda peroksizomlarda bulunan ve demir içeren bir enzimdir. Katalaz eritrositlerde yüksek oranda, kalp kası ve endotelde ise düşük oranda bulunur (Şimşek 1999).

Tablo 2.1 Ekstrasellüler, intrasellüler ve membran antioksidanlar (Gutteridge 1995)

Ekstrasellüler Antioksidanlar	İntrasellüler Antioksidanlar	Membran Antioksidanları
Transferrin: demir iyonlarına bağlanır	Süperoksit dismutaz (SOD)	E Vitamini
Laktoferrin: düşük pH'da ki demir iyonlarına bağlanır	Katalaz	β -karoten
Haptoglobulinler: hemoglobine bağlanır	Glutasyon peroksidaz	Koenzim Q
Hemopeksin: hem gruplarına bağlanır		
Albumin: bakır ve demir gruplarına bağlanır,		
Bilirubin: bilirubin süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır		
Mukus: hidroksil radikallerini toplar		
Ürat: normal plazma konsantrasyonunda urat, hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler		
Glukoz: hidroksil radikallerin temizler		
Askorbik asit: hidroksil radikallerin temizler		

Zincir kıran ajanlar genellikle fenolik bileşiklerdir. Lipit fazında vitamin E (α - tokoferol) en etkili olanıdır. Hücre membran fosfolipitlerinde bulunan poliansature yağ asitlerini serbest radikal etkisinden korur. Vitamin E süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipit peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger (Sies 1997). Vitamin E okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutasyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Glutasyon peroksidaz ile vitamin E, serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Glutasyon peroksidaz oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken vitamin E peroksitlerin sentezini engeller (Abuja ve Albertini 2001).



Şekil 2.3 Askorbik asit yapısı

C vitamini (askorbik asit) en çok çalışılan güçlü antioksidanlardan biridir. Askorbik asit, süperoksit, hidroksil radikali ve singlet oksijeni uzaklaştırarak ve askorbat peroksidaz reaksiyonu ile hidrojen peroksiti suya indirgeyerek etki gösterir (Blokhina vd 2003). Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir (Maritim 2002).

2.5 Paraoksonaz enzimi

İnsan serum paraoksonaz (PON) enzimi arildialkilfosfataz olarak da adlandırılan Ca^{+2} bağımlı, HDL ile ilişkili ve 43 - 45 kDa molekül ağırlıklı hem arilesteraz hem de paraoksonaz (arildialkil fosfataz; organofosfat hidrolaz; paraokson hidrolaz) aktivitesine sahip bir ester hidrolazdır (Ekmekçi vd 2004). PON'un fizyolojik substrat(lar)'ı henüz tanımlanmamıştır; fakat organik fosforlu insektisitleri ve sinir gazı yapımında yaygın olarak kullanılan sarin, soman gibi organofosfat bileşiklerinin hidrolizini katalizlemekte ve bu nedenle *in vivo* ksenobiyotik metabolizması ve toksikolojik çalışmalar için büyük önem taşımaktadır (Başkol vd 2004).

Paraoksonaz enziminin PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç ayrı formu vardır. PON proteinleri dokulardaki ekspresyonlarına ve dağılımlarına göre, birbirleri arasında fark gösterirler. PON1 ve PON3 genel olarak karaciğerde sentezlenip HDL partikülüne taşınır ve etkilerini serumda gösterir, PON2 ise beyin, karaciğer, testis, böbrek ve kalpte sentezlenerek vücut hücrelerinde sitoplazmada bulunur. PON proteinlerinin amino asit dizileri arasında % 65 oranında benzerlik olduğu bildirilmektedir (Carey vd 2005).

Paraoksonaz, 3 tane sistein molekülü içerir, bunlardan iki tanesi molekül içi disülfid bağının oluşumuna katılırken, 284. pozisyondaki sistein molekülü ise serbest halde bulunur. Sistein 284'ün, enzimin aktif merkezine yakın bölgede bulunduğu ve bu bölgenin substrata bağlanma için gerekli olduğu düşünülmektedir. PON1de 284. pozisyondaki sisteinde bulunan serbest sülfidril grubunun lipoproteinlerde lipit peroksidasyonundan korunmaya karşı gerekli olduğu, fakat paraoksonaz arilesteraz aktivitesi için gerekli olmadığı gösterilmiştir. Bu aminoasit rezidüsü PON1'in aktif bölgesinde olmamasına rağmen PON1'in aktif yapısının korunması için gereklidir. (Aviram vd 1998).

2.6 Oksidatif stres ve paraoksonaz ilişkisi

Antioksidan korumasındaki azalış reaktif oksijen türlerinde (ROS) artışa sebep olur. Bunun sonucunda serbest radikaller birikir. Bunların birikimi de anahtar organik substratların (çoklu doymamış yağ asitleri, proteinler ve DNA) oksitlenmesiyle toksik etki gösterir. Bu süreç oksidatif stres olarak tanımlanır. Vücuttaki normal fonksiyonlara zarar verir. Kanser, ateroskleroz, kistik fibrozis, alzhemier ve parkinson gibi geniş bir spektrumda patolojik sonuçlar doğurur (Levy vd 2007). Reaktif oksijen türleri (ROS) hücrel defansı etkileyerek DNA zincir kırıklarına, zar iyon transport sisteminde, enzimlerde, proteinlerde lipitlerde yeniden düzenlenmelere ve hasara yol açabilir. Prooksidan/antioksidan dengesindeki bozukluk nedeniyle artmış oksidatif stres hipertansiyon, ateroskleroz, diyabet ve kronik böbrek hastalıkları gibi çeşitli patolojilerle ilişkilidir. Yeterli antioksidan miktarı aşırı ROS üretiminin etkilerini ortadan kaldırır. Paraoksonaz enzimi önceleri sadece organofosfat bileşiklerini hidrolize eden bir enzim olarak bilinmekteyken daha sonraki yıllarda antioksidan ve antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Precourt vd 2009).

Oksidatif hasar ile uyarılmış zararı önlemek için antioksidanlar serbest radikalleri nötralize ederek önemli rol oynarlar. Enzimatik olmayan oksidanlar (α tokoferol, c vitamini ve retinoit) oksijen ve peroksitleri uzaklaştırmaya izin veren kimyasal bir yapıya sahiplerdir. İnsanlar süperoksitlerin oksijen ve hidrojen peroksitlere dönüşümünü sağlayan ve organik moleküllere göre daha az reaktif olan, hidrojen peroksitin su ve oksijene dismutasyonuna izin veren süperoksit dismutaz, hem grubu içeren katalaz ve hidrojen peroksit redüksiyonunun katalizi ile aktif oksijenleri detoksifiye eden, glutasyon peroksidaz gibi endojen enzimatik antioksidanlara sahiptir (Levy vd 2007).

Paraoksonaz enzimleri lipitlerde oksidatif hasarın en güçlü durdurucularıdır ve yüksek derecede ateroskleroza önlemede önemli role sahiptir. Lipit hidroperoksitlerini hidrolize ederek ve LDL'yi oksidatif modifikasyondan koruyarak ateroskleroz oluşumuna engel olurlar. PON2'nin bir çok dokuya dağılmış olması antioksidan rolünde büyük önem taşır. Hela hücrelerinde PON2'nin aşırı ekspresyonu okside LDL formasyonunu engellemiştir. Bu gözlemler PON2'nin antioksidan özellikleri için bir göstergedir (Levy vd 2007).

Bir çok çalışmada PON1'in oksidatif stresi azaltarak antiaterosklerotik rolünün olduğu gösterilmiştir. PON1 HDL ve LDL'yi lipit peroksidasyonuna karşı korur. PON1 spesifik okside kolesterol esterleri hidrolize eder ayrıca okside eikosenoidlere ve dekasonoidlere karşı yüksek aktivite gösterir. PON1 varlığında LDL üzerindeki okside lipitlerin birikiminin ve bunların LDL proteinleri ile yaptıkları kovalent etkileşimlerin ortadan kalktığı gösterilmiştir (Sanvanich vd 2003). Oksidatif stresi azaltmada PON1'in direkt etkisi PON1 "knockout" fare modeli ile ve insan PON1 transgenik fare modeli ile yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. PON1 "knockout" fareden izole edilen HDL, kültür ortamındaki arteriyel hücrelerde LDL oksidasyonunu engellemeyi başaramaz iken zıt olarak kontrol grubu farelerden izole edilen HDL bunu gerçekleştirebilmektedir. Bu sonuçlara göre PON1 transgenik fareden izole edilen HDL LDL'yi oksidasyondan korumada yaban tipe göre çok daha fazla etkilidir. Transgenik farede PON1'in aşırı ekspresyonu HDL'deki lipit hidroperoksit formasyonunu engellemiştir ve HDL yapısını dolayısıyla fonksiyonunu korumuştur. Okside LDL'deki veya okside HDL'deki okside lipitler PON1'in inaktive olduğunu gösterir. Flavonoid glabridin (meyandan) veya quercetin (kırmızı şaraptan) gibi antioksidanlar LDL oksidasyonu sırasında PON1 ile birlikte lipit peroksidazlarla ilişkili lipoproteinlerin içeriğini azaltır ve okside LDL

kolesteril linoleat hidroperoksitleri hidrolize ederek PON1 aktivitesi ortaya çıkarılır. Çalışmalarda monoenoik asit veya onların fosfolipit türevleri PON1'i oksidatif inaktivasyondan korumada büyük rol oynadığı gösterilmiştir. Nar suyu veya kırmızı şarap gibi antioksidanların E⁰ fare tarafından tüketimi oksidatif stresi azaltarak PON1 aktivitesini koruduğu gösterilmiştir. Sağlıklı bireylerde de nar suyu PON1 arilesteraz aktivitesini arttırmıştır. Nar suyu içen karotis arter stenozlu hastalarda bir yıl içerisinde PON1 aktivitesinde anlamlı bir artış (%83) gözlenmiş, paralel olarak bazal ve bakır iyonuyla indüklenmiş LDL oksidasyonunda (%90) azalma görülmüştür. İntima-media kalınlığında %35 azalma saptanmıştır (Aviram vd 2000).

Kolesterol sentezini önleyen ilaçlardan olan statinlerin antioksidan aktivitesi ile serum PON1'in ilişkili olduğu gösterilmiştir. Atorvastatin veya simvastatin tedavileri serum PON1 aktivitesini anlamlı derecede arttırmışlar ve serum oksidatif stresi azaltmışlar. Sıçanlarda, cerivastatin de PON1 aktivitesini artırır, plazma antioksidan dengesini geliştirir ve oksidatif stres seviyesini düşürür (Aviram vd 2004). Okside LDL merkezi bir proaterojenik role sahiptir. Paraoksonaz seviyesi ve oksidatif stres arasında ters bir ilişki söz konusudur. Fare karaciğerinde veya HepG2 hücrelerinde paraoksonaz mRNA seviyesi okside LDL ile azalmıştır. İnterlökin 6 ile ilişkili olarak insan PON1 arilesteraz aktivitesi *in vitro* ortamda okside LDL ile veya ilişkili okside lipitler ile inaktif olur. Bu etki 284. rezidüdeki serbest sisteinin oksidasyonu ile ilişkilidir (Godfrey vd 2004).

2.7 Paraoksonaz ve ateroskleroz

2.7.1 Ateroskleroz gelişimi

Kardiyovasküler hastalıkların çoğu ateroskleroz komplikasyonları sonucunda oluşur. Ateroskleroz ilk olarak okside LDL'nin arter duvarı içinden endotele transportu ile gerçekleşir. Kan plazmasında bulunan LDL endotelin içine sızıp oksitlenir. LDL oksidasyonuna etki eden karmaşık biyokimyasal reaksiyonlar zinciri, endotelde bulunan serbest radikallerle gerçekleşir. Okside LDL endotelyal hücrelere zarar verir bunun sonucunda P-selektin gibi adezyon moleküllerinin, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve makrofaj koloni uyarıcı faktör (CSF) gibi kemotaktik faktörlerin ekspresyonları uyarılır. Bu süreç monositlerin ve T lenfositlerin aktive olmasıyla devam eder. Damar duvarının hasar görmesi, bir yangı tepkisi doğurur. Bir akyuvar türü olan

monositler kandan gelip arter duvarının içine girer. Endotelial hücreler, lökositler ve düz kas hücreleri monosit ve lökositlerin subendotelial alana göçünü sağlayan büyüme faktörü ve kemoatraktan salgırlar. Ardından, monositler değişime uğrayıp makrofaj olur, bunlar da oksitlenmiş LDL'yi içlerine alarak zamanla "köpük hücre"lere dönüşür. Köpük hücreleri lökositlerle birleşerek yağ çizgilerini oluştururlar. Süreç köpük hücrelerinin büyüme faktörü salgılamasıyla devam eder bunun sonucunda düz kas hücrelerinin intimaya göçü uyarılır. Düz kas hücre proliferasyonu, makrofajların çoğalmasıyla ilgilidir, yağ çizgileri gelişmiş lezyonlara dönüşür. Daha sonra kalsifikasyon gerçekleşir. Bunun sonucunda zengin lipit kor ile çevrili fibröz örtü meydana gelir. Bu formasyon ayrıca ölü düz kas hücrelerini de içerir. Fibröz plağın bozulması tromboz formasyonuna neden olur ve damar tıkanıklığı ile sonuçlanır (Nagaswara vd 2004)

İnsan serumunun HDL kompleksinde PON 1'in özel lokalizasyonu Mackness tarafından gösterilmiştir (1989) ve bu enzimin lipit metabolizmasında önemli bir fizyolojik rol oynadığı ve ateroskleroz gelişimini engellediği saptanmıştır. Bir çok önemli araştırma ile on yılda bu çalışmalar desteklenmiş ve PON1'in vasküler dokuları oksidatif hasardan koruduğu gösterilmiştir (Draganov ve La Du 2003).

PON1'in, LDL-Kolesterol'ü serbest radikallerin indüklediği oksidasyondan koruyarak antioksidan fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir (Aviram vd 2000, Heijmans vd 2000, Kelso vd 1994). Bu yolla paraoksonaz enzimi serumda ve dokularda lipit peroksidasyonunu engelleyerek ateroskleroza önler. En belirgin etkisini, ileri düzeyde değişikliğe uğramış LDL (HM-LDL)'deki kolesterol linoleat hidroperoksitleri hidroliz ederek gösterir. Bu durum makrofajlarda kolesterol birikimini engelleyerek köpük hücre oluşumunu ve ateroskleroz gelişimini yavaşlatmaktadır (Ekmekçi vd 2004). HDL'nin oksidatif modifikasyonu; ters yönde kolesterol taşıma fonksiyonunda bozulmalara yol açar. Serumda HDL partikülü içinde taşınan paraoksonaz, HDL'yi oksidasyondan koruyarak HDL-Kolesterol'ün ters kolesterol taşıma fonksiyonunun devamını sağlar.

Aterosklerotik plak formasyonu ve progresyonu arteriyel duvarında monosit türevli makrofaj birikimi ile ilişkilidir. Arteriyel makrofajlar lipitleri ve okside lipitleri alırlar, plak nekrotik korun formasyonuna sebep olan köpük hücrelerine dönüştürürler.

Aterosklerotik plak progresyonu okside LDL seviyesinin, HDL'nin, fosfolipitlerin, araşidonik asit türev seviyelerinin artışı ve fibrinojen, APS A1, clusterin ve paraoksonazın birikimi ile olur.

Ateroskleroz oluşum sürecinde oksidatif stres büyük bir etkidir. Monosit-makrofaj farklılaşması hücrel oksidatif stresin artışıyla karakterizedir. Okside yağ asitleri ateroskleroz gelişimini artırır. Plazma kolesterol profilinin değişimine bağlı olarak oksidatif stres artar ve dolayısıyla aterojenite artar. İnsan ve hayvan dokularında, kanda, koroner ve karotis arterlerinde plaklarda bulunan okside kolesterol ürünleri kolesterol biyosentezini artırarak, plazma membran yapısına etki eder, hücre proliferasyonuna sebep olup ateroskleroz gelişimini hızlandırır (Tavori vd 2009).

İnsan serum paraoksonaz aktivitesi kardiyovasküler hastalık risk faktörleriyle ilişkilidir ve aterosklerozda düşük PON1 aktivitesi gözlenmiştir. PON2 gen polimorfizmi ile koroner kalp hastalıkları (CHD) arasındaki ilişkileri içeren çok az sayıda yayın bulunmakla birlikte bazı çalışmalar PON2 Ser 311 polimorfizmi ile koroner kalp hastalıkları arasında ilişki olduğunu göstermektedir (Mackness vd 2006).

PON 1 seviyesi ve aktivitesi genetik olarak farmakolojik düzenlemelerle ve beslenme alışkanlığı ile düzenlenir. Plaklarda PON1 birikimi oksidasyon artışını önler ve plak progresyonunu durdurur (Mackness vd 2006).

Yapılan bazı çalışmalarda serum PON aktivitesi ve kolesterol, trigliserit, HDL-Kolesterol ve apolipoprotein A1 seviyesinde anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. Bu sonuç gösteriyor ki yüksek yağ içeren ve kolesterolce zengin diyetle oluşturulan aterosklerozlu farede serum PON aktivitesi düşmüştür (Durak vd 2004).

PON1 “knockout” farede uygulanan aterojenik diyet, yaban tipe göre önemli derecede ateroskleroza neden olmuştur. İnsan PON1 enziminin aşırı ekspresyonunun total plak miktarının ve plaklardaki okside LDL ve makrofaj miktarının azalmasına neden olarak ateroskleroza engellediği deneysel olarak gösterilmiştir. Prospektif çalışmalarda düşük PON1 aktivitesinin kardiyovasküler hastalıklarda bağımsız bir risk faktörü olabileceği gösterilmiştir (Mackness vd 2003). Oksidatif strese koruyucu bir

cevap olarak ateroskleroz gelişimi sırasında PON1 miktarının insan atardamar duvarında arttığı gözlenmiştir (Mackness vd 2006).

2.7.2 Statinler

Ateroskleroz tedavisinde kullanılan statinler yağ asitleri oksidasyonunda yer alan β -Hidroksi- β - metilglutaril-Koenzim A redüktaz enziminin inhibitörüdürler. Serum kolesterol seviyesini düşürerek etki gösterirler. Lipit düşürücü etkilerinin yanında statin ve metabolitler antioksidan potansiyele de sahiptirler (Hossein vd 2008). Lipit düşürücü ilaçlar olan statin türevleri aynı zamanda HDL' yi de yükseltir. (Deakin vd 2003) Okside LDL seviyesinin statin türevi olan atorvastatin ile tedavi sürecinde azaldığı gösterilmiştir (Harangi vd 2009). Simvastatin ile muamele edilen hücrelerde promotor aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Klinik çalışmalar, statinin tedavi süresince PON1'in serumdaki seviyesini arttırdığını göstermiştir. Simvastatin kolesterol sentezini inhibe ederek PON1 üzerinde etkili olmuştur. Simvastatinle tedavi edilen ailesel hiperkolesterolemik hastalarda edilmeyenlere oranla serum PON1 aktivitesi artmaktadır (Deakin vd 2003).

2.8 Paraoksonaz ve HDL-LDL

Epidemiyolojik ve deneysel bir çok kanıt HDL'nin ateroskleroz gelişiminde koruyucu etkisini desteklemektedir (Hedrick 2000). Paraoksonaz enzimlerinin antiaterosklerotik aktiviteleri HDL partikülü üzerindeki lokalizasyonlarına bağlıdır. Paraoksonazın yapısında bulunan N-terminal hidrofobik sinyal peptidi, HDL ile etkileşim için gerekmektedir (Godfrey vd 2004). Paraoksonaz enzimi N-terminal hidrofobik sinyal peptidi aracılığı ile fosfolipitlere ve lipoproteinlere bağlanır (Ekmekçi vd 2004). PON3 ve PON2'nin sinyal peptidi PON1'den farklıdır, sinyal peptit yokluğunda PON1'in arilesteraz aktivitesi azalır (Godfrey vd 2004).

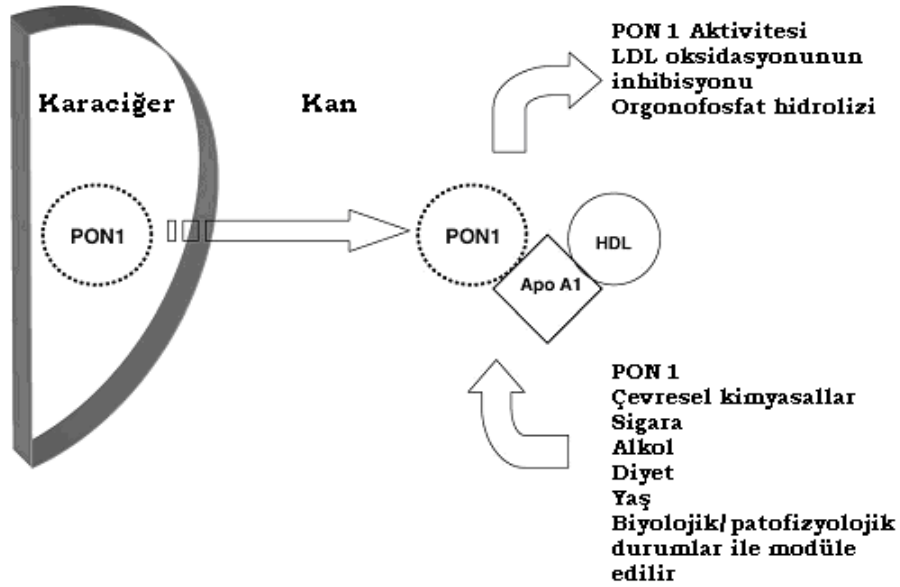
Omurgalılarda kolesterol sentezinin çoğu karaciğerde yer alır. Kolesterol ve kolesterol esterleri esas olarak suda çözünmez. Bu lipitler yapıldıkları dokulardan kullanılacakları ya da depolanacakları dokulara taşınmalıdırlar. Bunlar apolipoprotein adı verilen özgül taşıyıcı proteinlerin fosfolipitler, kolesterol, kolesterol esterleri ve triaçilgliserollerin çeşitli bileşimleriyle oluşan makromolekül kompleksleri olan plazma

lipoproteinleri şeklinde bir dokudan diğerine kan plazmasında taşınır. Apoproteinler lipoprotein partiküllerinin birçok sınıfını oluşturmak üzere lipitlerle, yüzeyde hidrofilik aminoasit yan zincirleriyle ve çekirdekte hidrofobik lipitlerle yuvarlak kompleksler şeklinde birleşir. Proteinler ve lipitlerin farklı bileşimleri şilomikronlardan yüksek dansiteli lipoproteinlere (HDL) kadar değişen farklı dansitelerde partiküller oluşturur. Lipitler farklı lipit ve protein bileşimine dolayısıyla farklı dansitelere ve farklı işlevlere sahip çeşitlilikte oluşan lipoproteinler olarak kan dolaşımında taşınır. Diyetle alınan lipitler şilomikronlara paketlenir; bunların triaçilgliserol içeriklerinden bir kısmı kapillerlerden taşınma sırasında lipoprotein lipaz tarafından kas ve adipoz dokuya salınır. Şilomikron kalıntıları karaciğer tarafından alınır. Endojen lipitler ve kolesterol VLDL tarafından karaciğerden kas ve adipoz dokuya aktarılır. VLDL'den lipidin özütlenmesiyle bunun bir kısmı yavaş yavaş karaciğer tarafından tekrar alınan veya karaciğer dışı dokulara kolesterol taşıyan LDL'ye çevrilir. Karaciğer LDL, VLDL kalıntıları ve şilomikron kalıntılarını reseptör aracılı endositozla alır. Karaciğer dışındaki aşırı kolesterol HDL olarak karaciğere geri döner.

HDL, reseptör aracılı endositozla karaciğer tarafından alınabilir, ancak en azından HDL'deki kolesterolün bir kısmı ilginç bir mekanizmayla diğer dokulara gönderilir. HDL, hepatik ve adrenal bez gibi steroidogenik dokularda SR-BI denilen plazma zarı reseptör proteinlerine bağlanabilir. Bu reseptörler endositozla değil, HDL'deki kolesterol ve diğer lipitlerin hücrelere kısmi ve seçici transferine aracılık eder. Boşaltılmış HDL, aynı zamanda karaciğer dışı dokularda depolanan kolesterolü toplayarak ters kolesterol taşınması yoluyla karaciğere getirir (Nelson ve Cox 2000).

HDL, LDL'yi oksidasyondan koruyabilme yeteneğine sahiptir. Çeşitli mekanizmalar bu koruyucu rolün açıklanmasında önem kazanmaktadır. HDL ile ilişkili enzimlerin [PON1, LCAT, Trombosit Aktive Edici Faktör Asetil Hidrolaz Platelet (PAF-AH)] oksidatif modifikasyonlara karşı lipoproteinleri koruduğuna inanılmaktadır (Mackness vd 1998, Aviram vd 1999). Paraoksonaz; LDL-Kolesterol'ü, serbest radikallerin indüklediği oksidasyondan korumaktadır. HDL-Kolesterol yapısında bulunan PON1 enzimi, Minimal Modifiye LDL (MM-LDL)'deki okside lipitleri yıkar ve böylece arter duvarında yer alan hücrelerde inflamatuvar cevap oluşumuna karşı koruyucu etki gösterebilir (Nelson vd 2000, Steinberg 1997).

2.9 Paraoksonazların modülasyonu



Şekil 2.4 PON1 enziminin modülasyonu

PON1 birincil olarak karaciğerde sentezlenir ve bir kısmı HDL ile ilişkili olarak plazmaya salınır. Paraoksonaz ismini parathion insektisitinin toksik metaboliti olan paraoksondan almıştır. Paraokson paraoksonaz enziminin en çok çalışılan substratıdır. PON1 okside LDL formasyonunu önler ve LDL'den türemiş okside fosfolipitleri inaktive eder. PON1 ayrıca HDL'deki fosfolipitleri oksidasyondan koruyarak da etki gösterir. PON2 ve PON3 de paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi yoktur fakat uzun zincirli alifatik ve aromatik laktonları hidrolize ederek PON1 ile benzer etki gösterirler. PON3 kısmen statin laktonları simvastatin lavostatin hidrolize eder (Costa vd 2003).

2.9.1 Ekzojen bileşikler ile PON 1 modülasyonu

2.9.1.1 Çevresel kimyasallar

Baryum, lanthanum, bakır, çinko ve cıva PON1 aktivitesini engeller. Bu kimyasalların 100nM'den az konsantrasyonları dahi yüzde seksen oranında inhibisyona sebep olmaktadır (Cole vd 2002).

2.9.1.2 İlaçlar

Kültür ortamında insan hepatoma hücrelerinde (HuH7) yapılan bir çalışmada simvastatin ve flovastatin yüzde yirmi beş yüzde elli oranında PON1 aktivitesini düşürmüş ve PON1 mRNA'sında düşüğe neden olmuştur. Aynı hücrelerde, fenofibrik asit (250µm) PON1 aktivitesinde ve mRNA'sında yüzde otuz, yüzde elli oranında artışa neden olmuştur (Gouedard vd 2003). Fenofibrik asit PON1 gen promotor aktivitesini uyarır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada fluvostatin plazma ve karaciğerde PON 1 aktivitesini düşürmüştür (Beltowski 2004). İnsanlarda yapılan çalışmalar da bu deneyleri destekler. Aspirin kullanıcılarında PON1 aktivitesinde ve konsantrasyonunda artış gözlenmiştir. Bu etki aspirinin antiinflamatuvar etkisiyle de ilişkili olabilir (Blatter, Garin vd 2003). Antiinflamatuvar glukokortikoid deksametazon (1mM) fare hepatoma hücrelerinde PON1 mRNA'sında sekiz kat artışa neden olmuştur (Ali vd 2003).

2.9.1.3 Klasik uyarıcılar

PON1'in uyarılabilen bir enzim olup olmadığı konusunda yapılan çok az çalışma vardır. Phenobarbital, CYP 2B izoenzimine etki eden klasik enzim uyarıcısı hepatik PON1 aktivitesinde ve karaciğer RNA seviyesinde artışa neden olmuş serum PON1 aktivitesini ise azaltmıştır (Costa vd 2003). Sıçanlarda 3metilholantrane serum ve karaciğer de PON1 aktivitesini arttırmıştır (Rodrigo vd 2001).

2.9.2 Hayat standartlarıyla PON1 modülasyonu

2.9.2.1 Sigara kullanımı

Sigara kullanımı insan plazma PON1 aktivitesini engeller. Bu etki E ve C vitaminleri, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidanlar ile geri çevrilememektedir. GSH, n-asetilsistein, 2 merkaptoetanol, DTT ve L-sistein gibi serbest tiollerini inhibe edebilir. Yapılan araştırmalar serum PON1 aktivitesini sigara kullanımının azalttığını göstermiştir (Nishio ve Watanabe 1997).

2.9.2.2 Alkol kullanımı

Yapılan araştırmalar sonucunda *in vitro* insan plazma PON1'in etanol ve diğer alifatik alkoller ile inhibe edildiği gösterilmiştir. Hayvan ve insanlarda yapılan gözlemler sonucu dşuk seviyede alınan etanolün PON1 aktivitesini ve seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (Debord vd 1998). Yapılan iki çalışmada sağlıklı orta yaşlı bir erkekler ile menapoz sonrası kadınlarda şarap ve bira ile muamele sonrasında plazma PON1 aktivitesi şarap ve bira ile muamele edilmemiş bireylere göre artmıştır (Van der Gaag vd 1999, Sierksma vd 2002). Az miktarda alkol kullanımı yüzde otuz dokuz plazma PON1 aktivitesinde artışa sebep olurken çok miktarda alınan alkol sonucunda PON1 aktivitesinde yüzde kırk beş düşüş gözlenmiştir (Rao vd 2003).

2.9.2.3 Antioksidanlar

İnsanlar ve hayvanlarda yapılan *in vitro* ve *in vivo* alışmalar antioksidanların PON1 aktivitesini arttırdığını göstermiştir. Quercetin ve glabridin gibi flavonoidler, PON1 aktivitesinde etkili antioksidanlardır. Apo-E eksik farede quercetin ile beslenme ile yüzde yetmiş beş, nar suyu ile yüzde yirmi altı yüzde kırk üç artış gözlenmiştir (Aviram vd 1999). Nar suyu içen sağlıklı on üç erkekte PON1 aktivitesinde yüzde yirmi artış gözlenmiştir (Aviram vd 2000).

2.9.3 Yaşın ve cinsiyetin PON1 aktivitesi üzerine etkisi

2.9.3.1 Gelişim sürecinde PON1

PON1 aktivitesinde yaş önemli bir belirleyicidir. Kemirgenler ile yapılan çalışmalar serum ve karaciğer PON1 aktivitesinin yeni doğanda çok düşüş postnatal dönemin yirmi birinci gününden sonra arttığı gösterilmiştir (Moser vd 1998). İnsanda yeni doğan bebekte altı on beş ay arasında PON1 aktivitesi artmaya başlamaktadır. Premature bebeklerde normal bebelere kıyasla yüzde yirmi dört daha düşüştür (Ecobichon ve Stephens 1973).

2.9.3.2 PON1 ve yaşlanma

Plazma ve karaciğer PON1 aktivitesinde üç ve yirmi dört aylık sıçanlar arasında fark bulunamamıştır (Kranth vd 2000). Son araştırmalar PON1 aktivitesinin yaşlılıkta azaldığını göstermektedir (Milochevitch vd 2001).

2.9.3.3 Cinsiyetin PON1 aktivitesi üzerine etkisi

PON1 aktivitesinin dişi farelerde erkek farelere oranla yüzde on dört yüzde yirmi altı oranında yüksek olduğu gösterilmiştir (Wehner vd 1987).

2.9.3.4 Fizyolojik ve patolojik koşullarda PON1

PON1 aktivitesi farklı fizyolojik koşullarda ve patolojik durumlarda değişim gösterir. İnsanlarla ve sıçanlarla yapılan çalışmalarda hamilelik döneminde düşük PON1 aktivitesi gözlenir (Weitman vd 1983). Patolojik hastalıklarda PON1 aktivitesi düşer. Tip 1 ve Tip 2 diyabet düşük PON1 aktivitesi ile ilişkilidir. Bu düşük PON1 aktivitesi genotipten bağımsızdır (Mackness vd 2002). Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda serum PON1 aktivitesi düşüktür. Hipertrioidizm de düşük PON1 aktivitesiyle ilişkilidir (Raiszadeh vd 2004). Alzhemier hastalarında yüzde otuz yüzde kırk oranında düşük PON1 aktivitesi gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda PON1 aktivitesinin akut faz cevabı sırasında değiştiği gösterilmiştir (Paragh vd 2002). Lipopolisakkarit serum ve karaciğer PON1 aktivitesini yüzde elli oranında düşürmüştür (Costa vd 2002). Benzer sonuç hepatik mRNA seviyesinde de gözlenmiştir. Bu düşüş kısa sürelidir, kırk sekiz saat içerisinde PON1 aktivitesi normale döner. LPS ile IL-2 ve TNF- α , ekspresyonlarında da değişimler olmuştur. Aynı proinflamatuvar sitokinler HepG2 hücrelerinde PON1 ekspresyonunda düşüşe neden olmuştur (Kumon vd 2003).

2.10 Paraoksonaz gen ailesi

Memeli türleri arasında geniş bir dağılıma sahip olan PON proteinleri, balıklarda, kuşlarda ve eklembacaklılar gibi omurgasızlarda mevcut değildir. İnsanda ve farede, aynı kromozom üzerinde birbirine komşu üç ayrı PON geni (PON1, 2, 3) bulunmaktadır. Farelerde 6. kromozom üzerinde yerleşen PON genlerinin, insanlarda 7.

kromozomun uzun kolunda, q 21.3 ile q 21.1 bölgesinde lokalize oldukları bildirilmektedir (Başkol vd 2004).

İnsanda PON1'e ait mRNA' nın karaciğerin yanı sıra böbrek, kalp, beyin, ince bağırsak ve akciğer dokularında da bulunduğu gösterilmiştir. PON2'nin kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, plasenta, ince bağırsak, dalak, mide, testis de PON3'ün ise karaciğer ve böbrekte eksprese edildiği gösterilmiştir (Carey vd 2005). Bir başka çalışmada ise farenin tüm dokularında PON1 PON2 ve PON3'ün immunohistokimyasal yöntem ile ekspresyonuna bakılmış ve PON1 ve PON3'ün dil epitelinde, mide ve ince bağırsak epitelinde, hepatositlerde, iskelet ve kalp kasında, göz lens epitelinde ve retinal tabakada, adipoz dokuda, trake ve bronş epitelinde, semifer tubulde, spermatozoada ve böbrek proksimal tübülünde bulunduğu gözlenmiştir. PON2'nin ise ekspresyonunun PON1 ve PON3'e göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Marsillach vd 2008).

Paraoksonaz ekspresyonu sıçanda yalnız karaciğer, böbrek, akciğer ve beyin dokularında immunohistokimyasal yöntem ile çalışılmış ve varlığı bu dokularda tespit edilmiştir (Rodrigo vd 2001). Sıçan dokularında PON proteinlerinin ekspresyonu ve aktivitesiyle ilişkisi literatürde gösterilmemiştir.

Bu çalışmada yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak tüm sıçan (*Rattus norvegicus*) dokularında PON1, PON2 ve PON3 mRNA ekspresyonlarını semikantitatif olarak saptamak, enzim aktivitesi ve ekspresyonu arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amaçlanmıştır. Ayrıca sıçanlarda kolesterol diyeti uygulanarak oluşturulacak ateroskleroz modelinde paraoksonaz enzim miktarlarıyla aktiviteleri arasındaki ilişkinin nasıl etkilendiği incelenecektir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Deney hayvanlarının beslenmesi ve örneklerin elde edilmesi

Tez çalışmamızda, 15 adet *Rattus norvegicus* deney hayvanları ile çalışılmıştır. Çalışmamızda 185 gr ortalama ağırlığında altı haftalık dişi wistar sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar otuz gün boyunca $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklığında ve $(50\pm 5\%)$ oranında nem bulunan ortam koşullarında 12 saat gün ışığı 12 saat karanlık ortama maruz kalarak beslenmişlerdir. Sıçanlar bu sürede su ve standart pellet yemler ile beslenmişlerdir. Kolesterol diyeti ile beslenen grup ise %1 kolesterol içeren yem ile beslenmiştir. Sıçanlar talaş altlıklı standart polipropilen-çelik kafeslerde tutulmuşlardır. 15 sıçan rastgele kontrol (n=7) ve kolesterol (n=8) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Deney süresi boyunca grupların ağırlıkları arasında fark gözlenmemiştir. Bir aylık periyodun ardından hayvanlardan Ketamin (90mg/kg) / Xylazin (10mg/kg) kullanılarak genel anestezi altında abdominal aorttan arterial kan alınmıştır. Kan örnekleri kullanılabildiği kadar -20°C de saklanmıştır. Ardından sıçanlar sakrifiye edilmiş ve alınan dokular -20°C de saklanmıştır.

3.2 Dokularda RNA izolasyonu

Sakrifiye edilen sıçanlardan alınan karaciğer, böbrek, akciğer, kalp, aort, incebarsak ve beyin dokularından 50 mg alınmış 1ml Trizol (Tri Reagent Molecular Research Centre Inc.) ile 2000 rpm'de doku homojenizatörü (Heidolph RZR 2021) ile homojenize edilmiştir.

Homojenize edilmiş doku örnekleri 5 dakika 15°C - 30°C 'de inkübasyona bırakılmıştır. 0,2 ml kloroform (Merck) eklenip 15 saniye el ile çalkalanmıştır. 15°C - 30°C 'de 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında 2°C - 8°C 'de $12\ 000\times g$ 'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte bulunan sıvı faz yeni steril bir tüpe aktarılmış ve 0,5 ml izopropanol (Alfa Aesar) eklenip 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. $12\ 000\times g$ 'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra supernatan uzaklaştırılmış pellet kısmına 1 ml % 75 etanol eklenip vortekslenmiştir. Ardından, $7500\times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilip supernatan kısmı uzaklaştırılmıştır. 5-10 dakika alkolün uçması için beklenmiş ve RNaz

içermeyen su ile pellet çözülmüştür. Ardından, 10 dakika 60°C’de inkübasyona bırakılmış ve total RNA elde edilmiştir.

3.3 cDNA sentezi

Karaciğer, böbrek, akciğer, kalp, aort, incebarsak ve beyin dokularından elde edilen RNA’lar ile 4°C koşullarında, cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.1 cDNA sentezi reaksiyon içeriği

İçerik	Son Konsantrasyonu	Eklene Hacim
Reaksiyon Tamponu	5X	5 µL
dNTP Karışımı	10 mM	2 µL
Oligo (dT) Primer	100pmol	1 µL
RNaz İnhibitör	20U/µL	0,5 µL
Reverse Transkriptaz Enzimi	200U/µL	1 µL
Kalp RNA		2 µL
Steril bidistile Su		8,5 µL
Toplam		20 µL

cDNA sentezi reaksiyon koşulları sağlandıktan sonra 42°C’de 1 saat ve ardından 70°C’de 10 dakika inkübasyon sonunda tamamlanmıştır.

3.4 Polimeraz zincir reaksiyonu

cDNA sentezi yapılan doku örnekleri polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile çoğaltılmıştır. PON1, PON2, PON3 ve Beta aktin genleri ayrı ayrı polimeraz zincir reaksiyonu için sıcaklık, döngü ve zamanları optimize edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi PCR cihazı (Techne Ltd., Duxford, Cambridge) ile gerçekleştirilmiştir.

Beta aktin, PON1, PON2 ve PON3 genlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi için 4 set oligonükleotit primer kullanılmıştır. Kullanılan bu primerler -20°C 'de saklanmıştır.

Beta aktin, PON1, PON2 ve PON3 genleri için kullanılan primer dizileri aşağıda verilmiştir.

Beta aktin geni için ileri primer, 5'-AAG AGC TAT GAG CTG CCT GA-3'
 geri primer, 5' ACG GAT GTC AAC GTC ACA CT-3'
 (UniSTS: 273170)

PON1 geni için ileri primer, 5'-AAG GTC AAC ATT CGT TGG TGA G-3'
 geri primer, 5'-TAT GCA GAG AAT GGC ACG GTG T -3'
 (UniSTS: 210664)

PON2 geni için ileri primer, 5'-CCT TGG GAA TCA AAC ACA AAC A-3'
 geri primer, 5' - AGG AGT CCA CTG AAA CAG GGA G-3'
 (UniSTS: 217599)

PON3 geni için ileri primer, 5'-TAT GGA CTG CAG AAG CCT CAG A-3'
 geri primer, 5'- AGT AGC AAG GCA ACC AGA AAC C-3'
 (UniSTS: 210715)

Tablo 3.2 Beta Aktin gen primerinin özellikleri

Primer özellikleri	Rat Beta Aktin	
	İleri	Geri
Primerler	İleri	Geri
Uzunluk	20 baz	20 baz
GC içeriği	% 50	% 50
Erime sıcaklığı (50mM NaCl)	55.8 ⁰ C	56.5 ⁰ C
Molekül ağırlığı	6,166.10 µg/µmol	6,086.0 µg/µmol

Tablo 3.3 Paraoksonaz 1 gen primerinin özellikleri

Primerler özellikleri	Rat Paraoksonaz 1	
	İleri	Geri
Primerler	İleri	Geri
Uzunluk	22 baz	22 baz
GC içeriği	% 45.4	% 50
Erime sıcaklığı (50mM NaCl)	55.5 ⁰ C	58.9 ⁰ C
Molekül ağırlığı	6,814.5 µg/µmol	6,839.5 µg / µmol

Tablo 3.4 Paraoksonaz 2 gen primerinin özellikleri

Primerler özellikleri	Rat Paraoksonaz 2	
Primerler	İleri	Geri
Uzunluk	22 baz	22 baz
GC içeriği	% 40.9	% 54.5
Erime sıcaklığı (50mM NaCl)	54 °C	58.4 °C
Molekül ağırlığı	6,705.4 µg/µmol	6,842.5 µg/µmol

Tablo 3.5 Paraoksonaz 3 gen primerinin özellikleri

Primerler özellikleri	Rat Paraoksonaz 3	
Primerler	İleri	Geri
Uzunluk	22 baz	22 baz
GC içeriği	% 50	% 50
Erime sıcaklığı (50mM NaCl)	57.7 °C	57.7 °C
Molekül ağırlığı	6,768.5 µg/µmol	6,755.5 µg/µmol

PON1, PON2, PON3 ve Beta aktin genlerinin sıçan dokularındaki ekspresyonlarını belirlemek amacıyla bu genler için uygun olan primerlerin seçiminden sonra PCR ortam içeriği optimize edilerek Tablo 3.6' daki PCR karışım içeriği uygulanmıştır.

PON1, PON3 ve Beta aktin genleri için PCR programı aşağıdaki gibi optimize edilmiştir:

Denaturasyon	94 ⁰ C	60 saniye	} 30 Döngü
Yapışma	53 ⁰ C	60 saniye	
Uzama	72 ⁰ C	60 saniye	
Son Uzama	72 ⁰ C	10 dakika	

Tablo 3.6 PON1, PON2, PON3 ve Beta aktin genleri için PCR karışım içeriği

İçerik	Son Konsantrasyonu	Eklenen Hacim
PCR Tamponu	10X	2.5 µL
MgSO₄	2 mM	2,5 µL
dNTP Karışımı	200µmol	0,5 µL
Reverse Primer	100 pmol/µL	1 µL
Forward Primer	100 pmol/µL	1 µL
cDNA		4 µL
Taq DNA polimeraz	5 U/µL	0.5 µL
Steril Ultra Saf Su		13 µL
Toplam		25 µL

3.5 Agaroz jel hazırlanması

% 1,2'lik agaroz jel hazırlamak için 0,6 gr agaroz tartılıp 50ml Tris Asetat EDTA Tamponu (TAE) (40mM tris-base, 20mM Asetik asit, 1mM EDTA) içerisinde mikrodalgada çözülmüştür. İçerisine 2µL Ethidium Bromide (Et-Br, 1mg/1ml) eklenerek, agaroz jel tepsisine dökülmüştür. Kuyucuklara numuneler (4µl numune, 2 µl jel yükleme boyası Brom fenol blue 6x) yüklenmiş ve ilk kuyucuğa DNA moleküler ağırlık belirteci konulmuştur. TAE (Tris-Asetat-EDTA tamponu 1 X konsantrasyon,

Sigma) tamponu içerisinde PCR ürünleri 80 volt'ta 30 dakika yürütülmüştür. Örneklerin görüntüleri UV jel görüntüleme cihazı (Biolab BTX-20 M) ile bilgisayara aktarılmıştır.

3.6 Enzim aktivitesi ölçümü için sıçan dokularının homojenizasyonu

Sıçan dokularında ve serumunda paraoksonaz, arilesteraz aktivitesi, malondialdehit miktarı tayini ve oksidasyona duyarlılık ölçümlerinin gerçekleştirilmesi için sakrifiye edilen sıçanlardan alınan karaciğer, böbrek, akciğer, incebarsak, kalp ve beyin dokuları % 0,9'luk 1000 µL NaCl solüsyonuyla 2000 rpm'de doku homojenizatörü (Heidolph RZR 2021) ile homojenize edilmiştir.

3.7 Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonlarının saptanması

Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonlarının hesaplanması için ilk olarak stok BSA hazırlanmıştır. 0,025 gram BSA (Sigma) tartılıp, 2,5 mg/ml stok hazırlanmıştır. Ana stok 1:10 oranında sulandırılıp, 0,25 mg/ml (250µg/ml) BSA hazırlanmıştır. 250µg/ml BSA'dan 2ml alınıp üzerine 8ml distile su ilave edilmiş ve 50 µg/ml BSA ara stok hazırlanmıştır. 50µg/ml BSA ara stoktan 1ml alınıp üzerine 4ml distile su ilave edilerek 10µg/ml BSA solüsyonu hazırlanmıştır. 50µg/ml BSA ara stoktan 3ml alınıp üzerine 3 ml distile su eklenmiş ve 25µg/ml BSA hazırlanmıştır. 250µg/ml stoktan 4ml alınıp üzerine 8ml distile su eklenmiş ve 125µg/ml BSA hazırlanmıştır. Sonuç olarak, 250µg/ml, 125µg/ml, 50µg/ml, 25µg/ml, 10µg/ml BSA stokları elde edilmiştir.

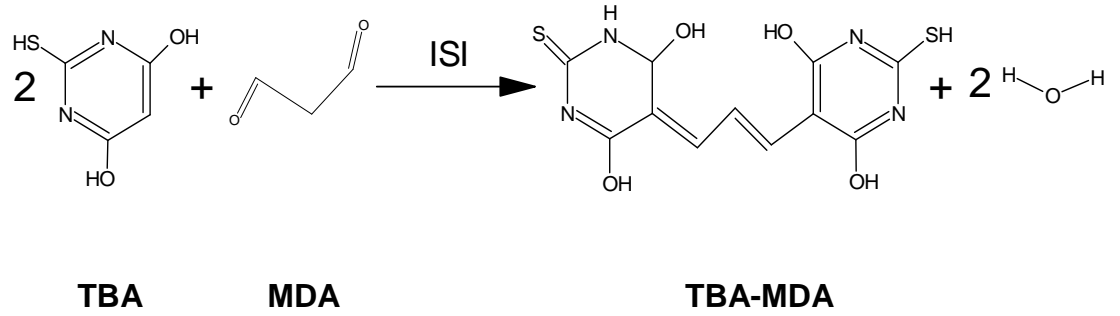
Bradford yöntemini uygulamak için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır. Protein konsantrasyonları saptanacak olan homojenize edilmiş doku örneklerinden 5µl alınıp, üzerine 495µl distile su steril mikro santrifüj tüplerine konmuştur (1:100 sulandırma). 1:100 oranında sulandırılan doku örneklerinden 80µl alınmış, üzerine 720µl distile su farklı steril mikro santrifüj tüplerine konulmuştur (toplamda 1:1000 sulandırma). Kalibrasyon için hazırlanan BSA konsantrasyonlarında 80µl alınarak, üzerine 720µl distile su steril mikro santrifüj tüplerine konulmuştur (toplamda 1:1000 sulandırma). Bu örneklerin üzerine 200µl Biorad protein tayin kiti (Biorad Inc.) solüsyonu (1:5 oranında) konulmuş ve 15 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, örnekler vortekslenerek 96 kuyucuklu petrilere 200µl olacak şekilde konulmuştur. Örnekler, eliza reader (XL 808) cihazında 630 nm' de okunmuştur.

Standart BSA'lar ile oluşan grafiğin eğimi kullanılarak konsantrasyon aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$Konsantrasyon = (absorbans / eğim) \times sulandırma \text{ katsayısı}$$

3.8 Doku örneklerinde malondialdehit tayini ve oksidasyona duyarlılık

Serum malondialdehit (MDA) düzeyleri tayini lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA'nin asit ortamda tiyobarbitürik asitle (TBA) reaksiyona girerek görünür bölgede 532 nm de absorbans veren MDA-TBA kompleksi oluşturmasına dayanan spektrofotometrik yöntemle saptanmıştır (Dahle LK 1962).



Şekil 3.1 Bir Molekül tiyobarbitürik asit bir molekül MDA ile asit ortamda kaynatıldığında birleşerek TBA- MDA kompleksini oluştururlar.

Tablo 3.7 MDA tayini protokolü

	MDA	TETİKLİ	KÖR
Numune	100 µl	---	100 µl
*Numune+CuSO₄	---	200 µl	---
Etanol	1 ml	1 ml	1 ml
Fosfat Tamponu	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml
TCA	1 ml	1 ml	1 ml
TBA	1 ml	1 ml	1 ml
Distile Su	0.1 ml	---	0.1 ml

*100 µl numune ve 100 µl CuSO₄ karıştırılıp 37°C da 1 saat süreyle inkübe edilmiştir (Tablo 3.7).

Tüpler 30 dk süreyle kaynayan suda tutulmuştur.

Musluk altında soğutulduktan sonra 6000 rpm de 20 dk süreyle santrifüj edilir ve 532 nm de (Perkin Emler Lambda 25 UV/VIS spectrameter) distile suya karşı okunmuştur.

Reaktif ve tamponlar

Fosfat Tamponu (pH: 6 ; 100 mM): 2.13 gr Na₂HPO₄ ile 11.56 gr KH₂PO₄ tartılıp distile suyla 1 litreye tamamlanır.

TCA (Trikloro asetik asit): % 20 TCA (Sigma) 0.6 N HCl (Sigma).

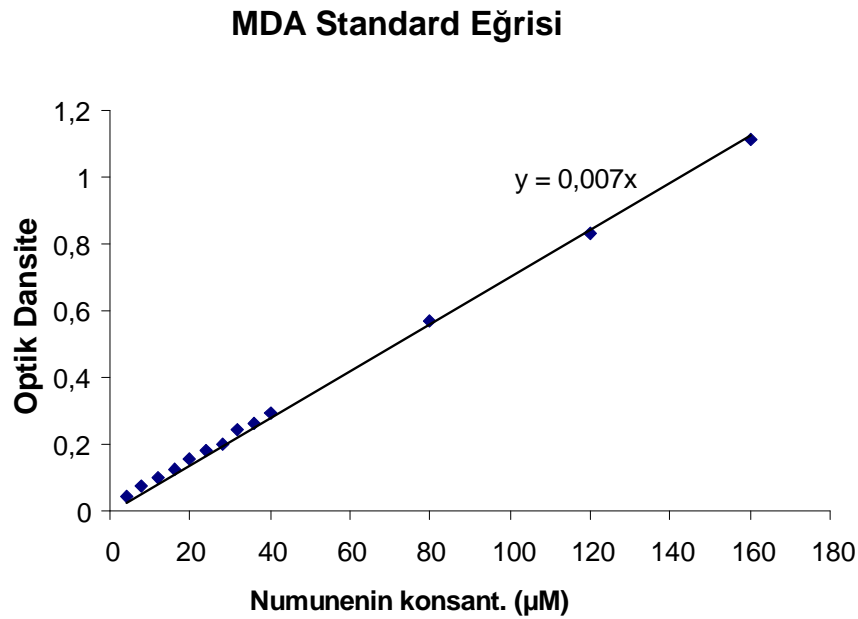
TBA (Tiyobarbitürik Asit, Merck): %2 w/v

CuSO₄ çözeltisi: 100 µM

Etanol: % 95

3.9 MDA standart eğrisinin elde edilmesi

MDA standart eğrisi malondialdehitin (Biç-dimetilasetal) 4-160 μM aralığındaki standart konsantrasyonları 10 mM MDA stoğundan hazırlanarak 100 μl hacmin kullanılmasıyla elde edilmiştir. 4-160 μM konsantrasyon aralığında 13 ölçüm yapılmıştır ve elde edilen değerler grafiğe yerleştirilerek grafikten eğrinin eğimi bulunarak bu değer ölçümlerde MDA konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılmıştır.



Şekil 3.2 MDA standart eğrisi.

3.10 Oksidasyona duyarlılık

Doku örneklerinin oksidasyona duyarlılığı ve MDA tayini aynı deney setinde yapılmıştır. 100 μl doku örneği eşit miktarda 100 μM CuSO_4 çözeltisi ile 37°C da 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her örnek için birisi kör, diğeri bazal MDA ve üçüncüsü tetikli MDA (oksidasyona duyarlılık) olmak üzere 3 tüp çalışılmıştır. MDA değerleri, bazal MDA optik dansitesinden körün optik dansitesi çıkarılarak, oksidasyona duyarlılık ise tetikli MDA optik dansitelerinden bazal MDA optik dansiteleri çıkarılarak hesaplanmıştır.

3.11 MDA ve oksidasyona duyarlılığın hesaplanması

MDA değerleri:

$$\text{MDA} = (\text{OD}_{\text{MDA}} - \text{OD}_{\text{K}}) / 0.007 / \text{mg protein} : \text{nmol MDA} / \text{mg protein}$$

Oksidasyona Duyarlılık (OS):

$$\text{OS} = (\text{OD}_{\text{T}} - \text{OD}_{\text{MDA}}) / 0.007 / \text{mg protein} : \text{nmol MDA} \cdot (\text{mg protein})^{-1} \cdot \text{saat}^{-1}$$

OD_{K} : Kör tüpünün optik dansitesi

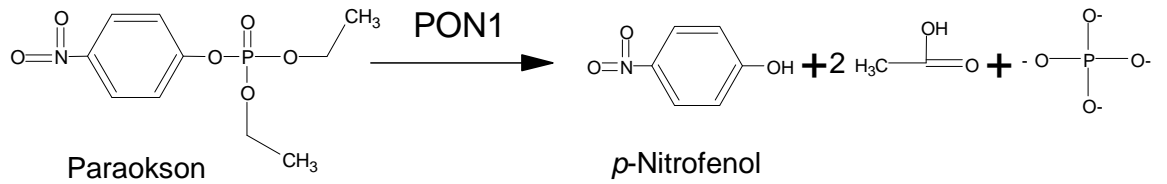
OD_{MDA} : Numune (MDA) tüpünün optik dansitesi

OD_{T} : Bakırla indüklenmiş numunenin optik dansitesi

0.007: Standard eğrinin eğimi (OD / Numune Konsantrasyonu)

3.12 Serumda ve dokularda paraoksonaz aktivitesinin ölçümü

PON1 enziminin paraoksonaz aktivitesi ölçümünde paraokson substrat olarak kullanılmıştır. PON1 enzimi aşağıdaki reaksiyonu katalizler.



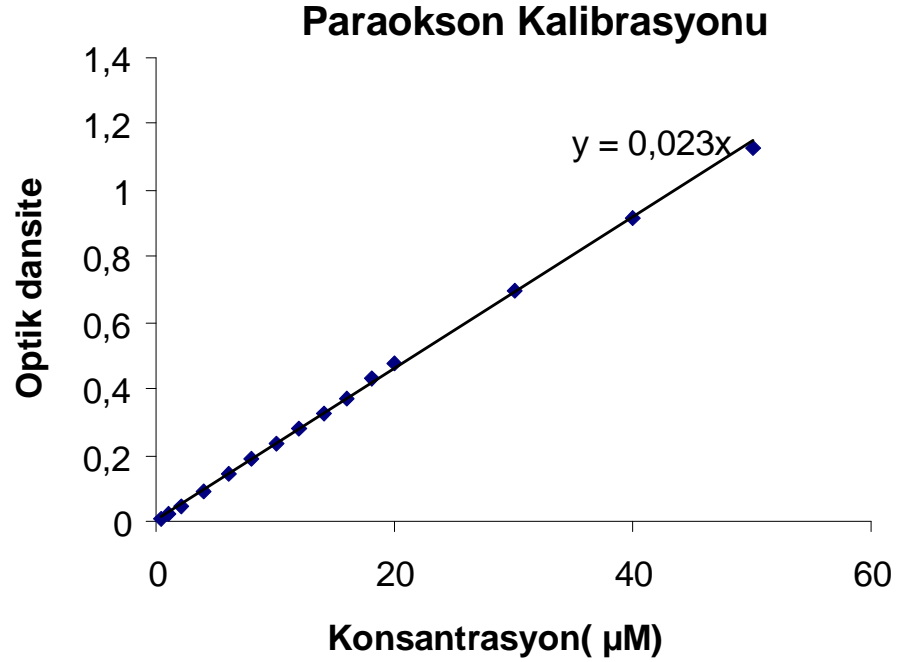
Sekil 3.3 Paraoksonaz paraoksonun p-nitrofenol ve asetik asite parçalanmasını katalizler.

Reaksiyon sonucunda oluşan p-nitrofenol 405 nm de görünür bölgede absorbans verir. Bu ürünün absorpsiyonu ölçülerek enzimin aktivitesine bakılmıştır.

Toplam 1 ml reaksiyon karışımında 20 mM tris-HCl (pH:8), 1 mM CaCl₂ ve 1 mM paraokson varlığında 10 µl doku ve serum örneği 5 dk inkübasyon sonrasında ölçülmüş tür (Cao, H vd 1999). İlk ölçüm 30. saniyede yapılıp ikinci ölçüm 5,5. dk da yapılmıştır. İlk ölçüm hesaplamalarda kör olarak kullanılmıştır. Sonuçlar ml serum tarafından bir dakikada oluşan ürün miktarı olarak hesaplanmıştır.

3.13 Paraoksonaz aktivitesinin kalibrasyonu

0,1 mM *p*-nitrofenol stoğundan 0.5-50 µM final konsantrasyonu verecek şekilde hazırlanan standart çözeltilerin optik dansiteleri okunarak aşağıdaki grafik elde edilmiş ve grafiğin eğimi paraoksonaz aktivitelerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.



Şekil 3.4 PON1 Paraokson standart eğrisi

0.5-50 µM son konsantrasyon aralığında 15 farklı standart *p*-nitrofenol çözeltilisine deney protokolü uygulanmış ve elde edilen değerlerle grafik çizilerek eğim belirlenerek formül hesaplanmıştır.

3.14 Paraoksonaz aktivitesinin hesaplanması

Serum İçin:

$$\text{Enzim Aktivitesi} = (\text{OD}_2 - \text{OD}_1) / 0.023 \times 100 / 5$$

nmol ürün. dk⁻¹. ml⁻¹ serum (mU/ml)

Doku Örnekleri İçin:

$$\text{Enzim Aktivitesi} = (\text{OD}_2 - \text{OD}_1) / 0.023 \times (100 / 5) / \text{mg protein}$$

nmol ürün. dk⁻¹. mg⁻¹ doku (mU/mg)

OD₂ : 5 dk 30 saniye sonunda optik dansite

OD₁ : 30 saniye sonunda optik dansite

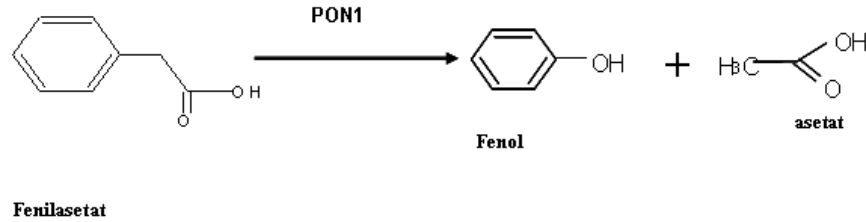
0.023 : Standart eğrisinin eğimi (OD / Konsantrasyon)

100 : Seyreltme faktörü

5 : 1 dakikalık aktiviteyi elde etme

3.15 PON1 enzimi aril esteraz aktivitesinin ölçümü

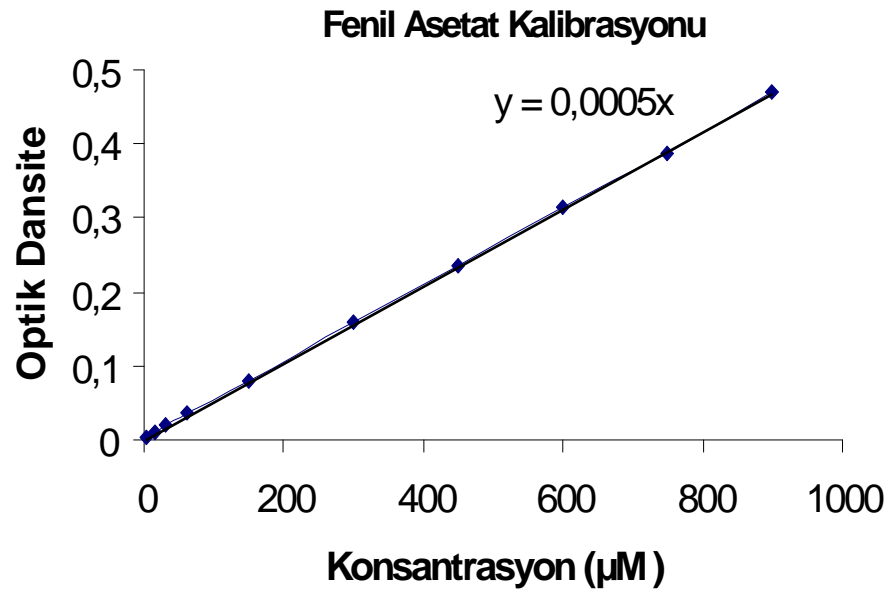
PON1 enziminin Aril esteraz aktivitesinin ölçümü için fenil asetat substrat olarak kullanılmıştır (Sigma). Deneyin prensibi PON1 enziminin fenil asetatı fenol ve asetik asite parçalamasıyla oluşan fenolün 270 nm de absorbansının ölçülmesine dayanır.



Şekil 3.5 Paraoksonaz fenil asetatın fenol ve asetik asite parçalanmasını katalizler.

Reaksiyon toplam 3 ml hacimde 20 mM Tris-HCl (pH:8), 1 mM CaCl₂ ve 1 mM fenil asetat varlığında gerçekleşmiştir (Gan vd 1991). 10 µl doku örneği reaksiyon tüpüne eklendikten 15 saniye sonra 1. optik dansite ölçümü yapılmış ve 1,15. dk.da ikinci okuma yapılmıştır. Birinci optik dansite hesaplamalarda kör olarak kullanılmıştır. Okumalar quartz küvetlerde yapılmıştır.

Aril esteraz aktivitesi için kalibrasyon eğrisi 1 mM fenol stoğundan 3-900 µM son konsantrasyon olacak şekilde 10 değişik konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltiler kullanıldı. Elde edilen optik dansitelerin konsantrasyona göre grafiği çizilerek grafiğin eğimi bulundu ve enzim aktivitesini hesaplamak için kullanıldı.



Şekil 3.6 PON1 aril esteraz standart eğrisi.

3-900 µM son konsantrasyon aralığında 10 farklı standart fenol solüsyonunun kullanılmasıyla elde edilen değerlerden grafik çizilerek eğilim çizgisi bulunarak formül hesaplanmıştır.

3.16 PON1 enzimi aril esteraz aktivitesinin hesaplanması

Serum için:

$$\text{Enzim Aktivitesi} = (\text{OD}_2 - \text{OD}_1) / 0.0005 \times 300 / 1000$$

$$\mu\text{mol ürün. dk}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ serum (U/ml)}$$

Doku örnekleri için:

$$\text{Enzim Aktivitesi} = (\text{OD}_2 - \text{OD}_1) / 0.0005 \times 300 / 1000 / \text{mg protein}$$

$$\mu\text{mol ürün. dk}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ serum (U/mg)}$$

OD₂: 1dk 15 saniye sonunda optik dansite

OD₁: 15 saniye sonunda optik dansite

0.0005: Standart eğrisinin eğimi (OD / Konsantrasyon)

300: Seyreltme faktörü

1000 : 1 ml deki ürün miktarı μmol olarak

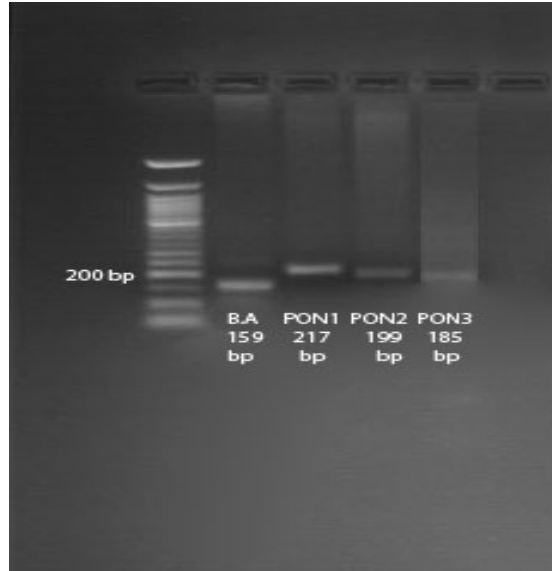
4. BULGULAR

4.1 Sıçan PON genlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi

Sakrifiye edilen sıçanlardan alınan karaciğer, akciğer, kalp, beyin, böbrek, incebarsak ve aort dokularının homojenizasyonunun ardından elde edilen total RNA'lar materyal metot kısmında anlatıldığı gibi cDNA'ya çevrilmiş uygun primerler kullanılarak PCR işlemi ile amplifiye edilmiştir. Ardından agaroz jel elektroforezi ile tüm dokularda beta aktin pozitif kontrol olarak kullanılıp PON1, PON2 ve PON3 genlerinin ekspresyonları gösterilmiştir.

Beta aktin, PON1, PON2 ve PON3 genlerinin ekspresyonlarını belirlemek için agaroz jel elektroforezi ile yürütülen numunelerin görüntüleri UV jel görüntüleme cihazı ile bilgisayara aktarılmıştır. Ardından Scion image görüntü analiz programı kullanılarak beta aktin ekspresyonu yüzde yüz olarak kabul edilmiş ve beta aktine göre PON1, PON2 ve PON3 ekspresyonları relatif olarak hesaplanmıştır.

Beta aktin, PON1, PON2 ve PON3 ekspresyonlarının jel görüntüsü şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Beta aktin, PON1, PON2 ve PON3 ekspresyonlarının agaroz jel görüntüsü

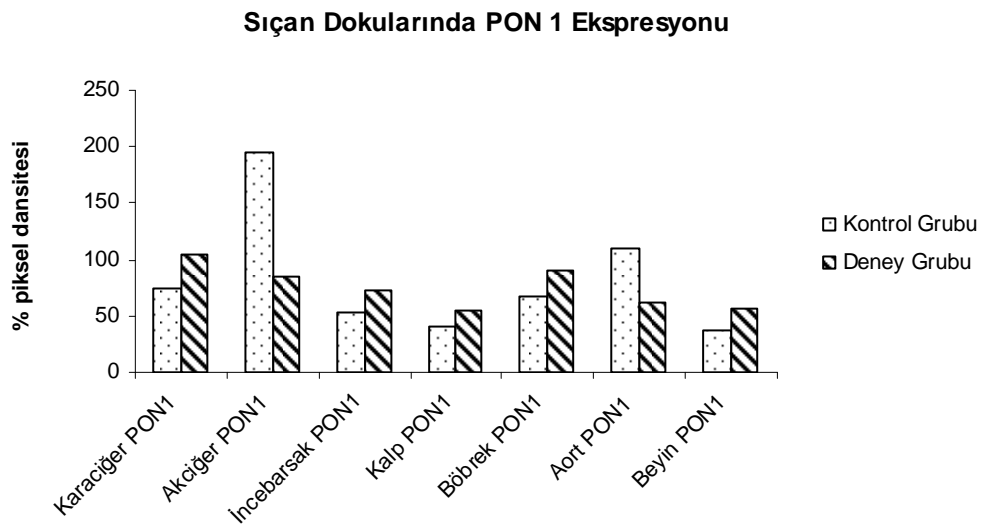
PON1, PON2 ve PON3 ekspresyonları, beta aktin ekspresyonu yüz olarak belirlenip relatif olarak hesaplanmıştır. PON1, PON2 ve PON3 ekspresyonlarının yüzdeleri tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 PON1, PON2 ve PON3 ekspresyonlarının yüzdeleri

DOKULAR	PON1		PON2		PON3	
	Kontrol	Kolesterol	Kontrol	Kolesterol	Kontrol	Kolesterol
Karaciğer	75	105	67	68	73	86
Böbrek	67	91	70	63	74	83
Akciğer	196	84	63	89	321	111
Aort	110	63	65	52	198	61
Beyin	38	58	67	67	25	30
İncebarsak	58	75	69	70	60	49
Kalp	41	55	69	73	63	80

4.2 PON1 ekspresyonu

Karaciğer, böbrek, beyin, aort, incebarsak, akciğer ve kalp dokularında PON1 ekspresyonlarının yüzdeleri grafik olarak aşağıdaki şekil 4.2 ‘de gösterilmiştir.



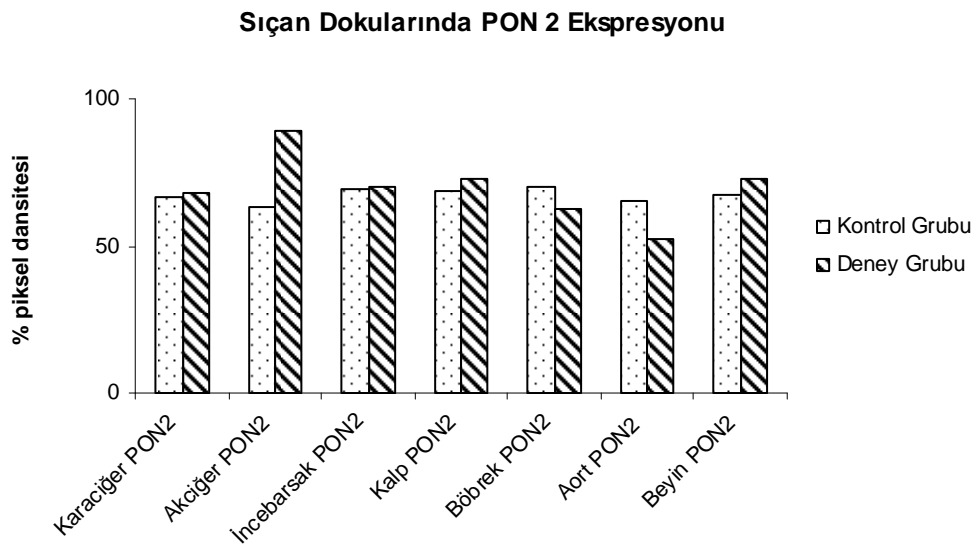
Şekil 4.2 Sıçan dokularında PON1 ekspresyonu

Beta aktin geni pozitif kontrol olarak kullanılarak PON1 genlerinin ekspresyonları belirlenmiştir. Sıçan karaciğer dokusunda PON1 ekspresyonu kontrol grubuna oranla % 30, böbrek dokusunda % 24, beyin dokusunda % 21, incebarsakta % 17 oranında

artmıştır. Sıçan aort dokusunda PON1 ekspresyonu kontrol gruba göre % 47 oranında azalmıştır ve akciğer dokusunda ise PON1 ekspresyonu kontrol gruba oranla % 112 oranında azalmıştır.

4.3 PON2 ekspresyonu

Karaciğer, böbrek, beyin, aort, incebarsak, akciğer ve kalp dokularında PON2 ekspresyonlarının yüzdeleri grafik olarak aşağıdaki şekil 4.3 'de gösterilmiştir.



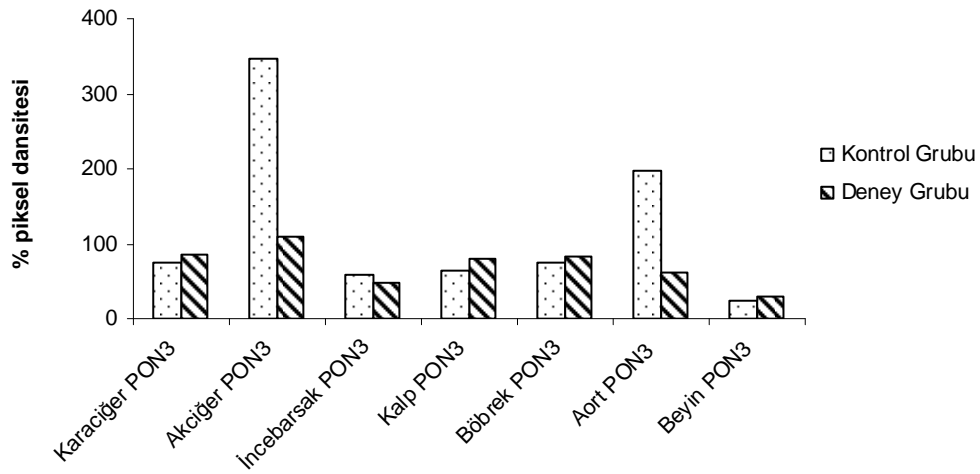
Şekil 4.3 Sıçan dokularında PON2 ekspresyonu

Beta aktin geni pozitif kontrol olarak kullanılarak PON2 genlerinin ekspresyonları belirlenmiştir. PON2 ekspresyonunda karaciğer, böbrek, aort, beyin, incebarsak ve kalp dokularında kontrol grup ve kolesterol diyeti ile beslenen grup arasında fark gözlenmemiştir. Akciğer dokusunda ise kolesterol diyeti ile beslenen grupta kontrol gruba göre % 26 oranında PON2 ekspresyonu artmıştır.

4.4 PON3 ekspresyonu

Karaciğer, böbrek, beyin, aort, incebarsak, akciğer ve kalp dokularında PON3 ekspresyonlarının yüzdeleri grafik olarak aşağıdaki şekil 4.4 'de gösterilmiştir.

Sıçan Dokularında PON 3 Ekspresyonu



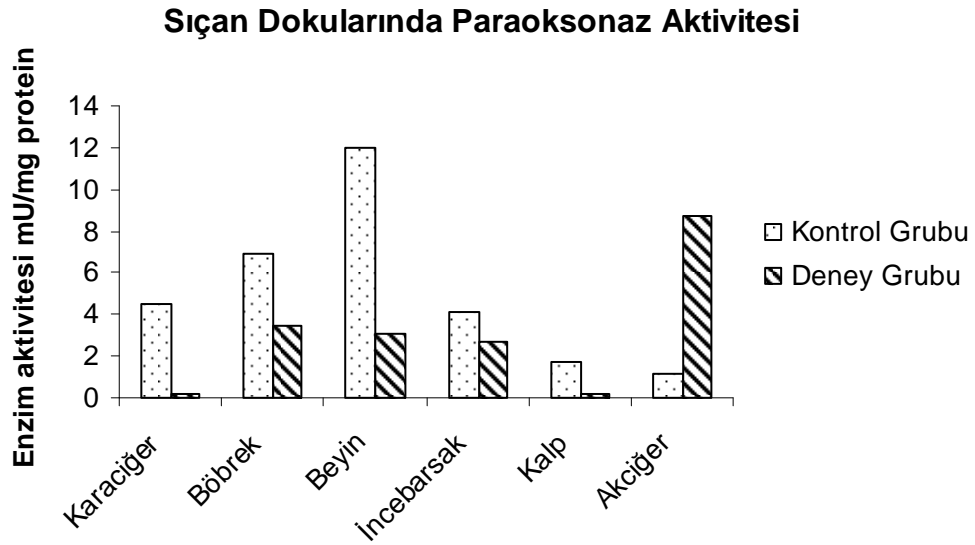
Şekil 4.4 Sıçan dokularında PON3 ekspresyonu

Beta aktin geni pozitif kontrol olarak kullanılarak PON3 genlerinin ekspresyonları belirlenmiştir. Sıçan karaciğer dokusunda PON3 ekspresyonu kontrol grubuna göre % 13 oranında artmıştır. İncebarsakta PON3 ekspresyonu kontrol gruba oranla % 11, akciğer dokusunda % 210 ve aort dokusunda % 137 oranında azalma göstermiştir.

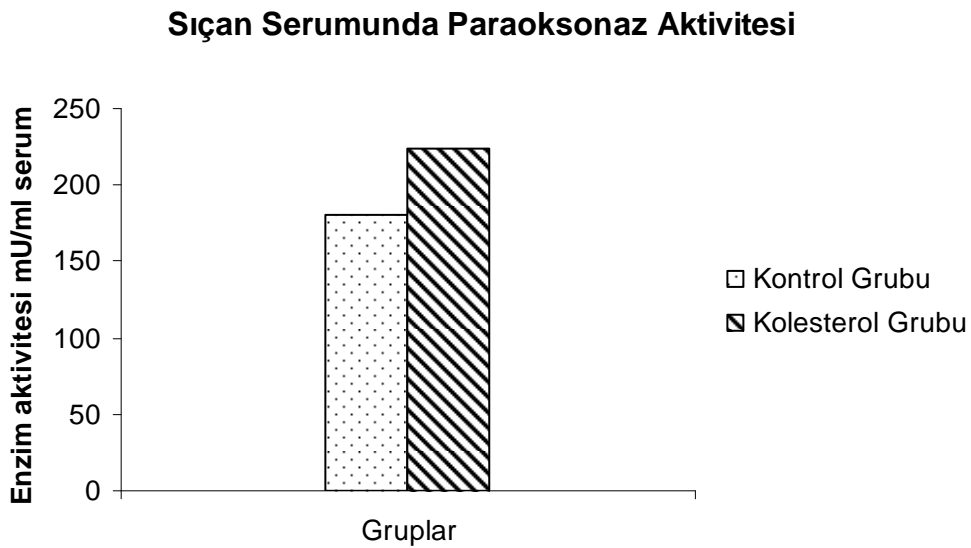
4.5 Paraoksonaz enzim aktivitesi

PON1 enziminin paraoksonaz aktivitesi ölçümünde paraokson substrat olarak kullanılmıştır. Sıçan karaciğer, akciğer, beyin, kalp, böbrek ve incebarsak dokularında homojenizasyon işleminin ardından paraoksonaz enzim aktivitesi ölçülmüştür.

Paraoksonaz enzim aktivitesi sonuçları her bir doku için aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.



Şekil 4.5 Sıçan dokularında paraoksonaz aktivitesi



Şekil 4.6 Sıçan serumunda paraoksonaz aktivitesi

Paraoksonaz Enzim Aktivitesi sonuçlarına ilişkin her bir doku ve sıçanlardan alınan serum örnekleri için hesaplanan ortalamalar ve standart sapma değerleri tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2 Sıçan dokularında ve serumunda paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümlerine ait ortalamalar ve standart sapma değerleri

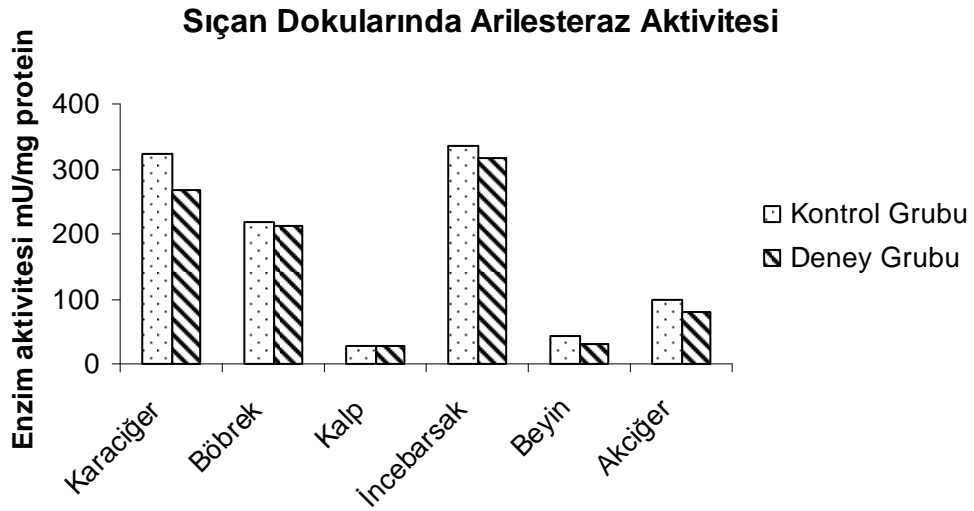
Gruplar	Kontrol Grup Ortalama ve Standart Sapma Değerleri	Kolesterolden zengin diyet ile beslenen grup ortalama ve standart sapma değerleri	<i>P</i> Değeri
Karaciğer	0,35±0,30	4,48±2,30	<i>p</i> < 0,05
Böbrek	6,88±6,25	3,47±2,37	<i>p</i> >0,05
Akciğer	1,42±0,73	8,73±11,69	<i>p</i> >0,05
Kalp	1,98±2,45	0,36±0,20	<i>p</i> >0,05
Beyin	5,87±5,29	4,98±5,05	<i>p</i> >0,05
İncebarsak	4,79±4,66	2,68±2,01	<i>p</i> >0,05
Serum	180±63,80	224±67,34	<i>p</i> >0,05

Sıçan karaciğer dokusunda paraoksonaz enzim aktivitesi kolesterol diyeti ile beslenen grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir (*p*< 0,05). Böbrek, incebarsak, kalp, beyin dokularında da istatistiksel anlamda anlamlı olmasa da kolesterol diyeti ile beslenen sıçan grubunda paraoksonaz aktivitesi azalma göstermiştir. Serum paraoksonaz enzim aktivitesinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubunda deney grubuna oranla azalma gözlenmektedir. Akciğer dokusunda ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da paraoksonaz enzim aktivitesinde kontrol grubunda artış gözlenmiştir.

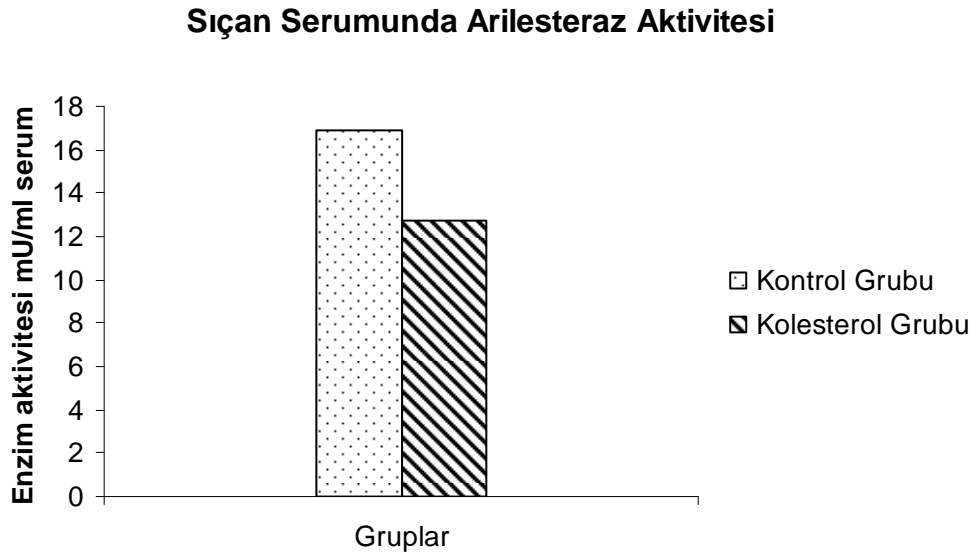
4.6 Arilesteraz enzim aktivitesi

PON1 enziminin Aril esteraz aktivitesinin ölçümü için fenil asetat substrat olarak kullanılmıştır. Sıçan karaciğer, akciğer, beyin, kalp, böbrek ve incebarsak dokularında homojenizasyon işleminin ardından arilesteraz enzim aktivitesi ölçülmüştür.

Aril esteraz enzim aktivitesi sonuçları her bir doku için aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.



Şekil 4.7 Sıçan dokularında arilesteraz aktivitesi



Şekil 4.8 Sıçan dokularında arilesteraz aktivitesi

Aril esteraz enzim aktivitesi sonuçlarına ilişkin her bir doku ve sıçanlardan alınan serum örnekleri için hesaplanan ortalamalar ve standart sapma değerleri tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3 Sıçan dokularında ve serumda aril esteraz enzim aktivitesi ölçümlerine ait ortalamalar ve standart sapma değerleri

Gruplar	Kontrol Grup Ortalama ve Standart Sapma Değerleri	Kolesterolden zengin diyet ile beslenen grup ortalama ve standart sapma değerleri	<i>P</i> Değeri
Karaciğer	336±100	266±188	<i>p</i> >0,05
Böbrek	217±24	211±88	<i>p</i> >0,05
Akciğer	99±22	78±27	<i>p</i> >0,05
Kalp	27±10	27±12	<i>p</i> >0,05
Beyin	44±10	32±6	<i>p</i> <0,05
İncebarsak	335±117	350±162	<i>p</i> >0,05
Serum	16±2	12±2	<i>p</i> <0,05

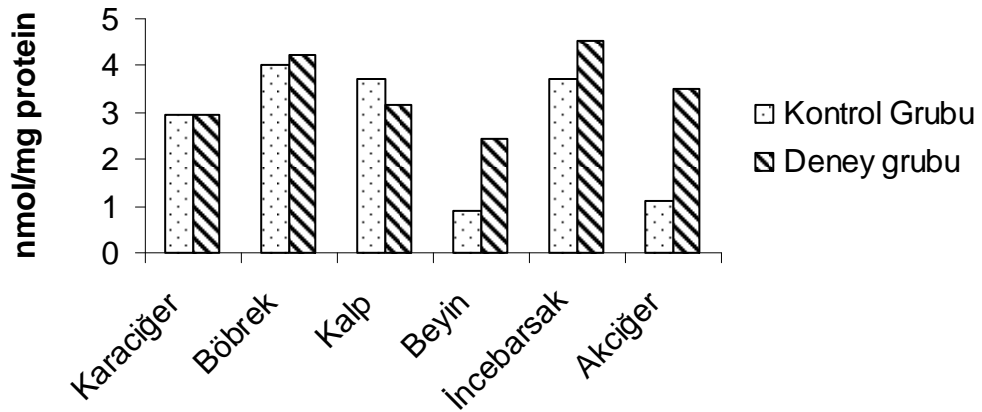
Sıçan beyin dokusunda arilesteraz enzim aktivitesinde kolesterol diyeti ile beslenen grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir ($p < 0,05$). Böbrek, incebarsak, karaciğer ve akciğer dokularında da istatistiksel anlamda anlamlı olmasa da kolesterol diyeti ile beslenen sıçan grubunda arilesteraz aktivitesi azalma göstermiştir. Serum arilesteraz enzim aktivitesinde ise istatistiksel anlamda anlamlı olarak ($p < 0,05$) kontrol grubunda deney grubuna oranla artma gözlenmektedir.

4.7 Doku örneklerinde malondialdehit tayini ve oksidasyona duyarlılık

Serumda ve sıçan dokularında malondialdehit (MDA) düzeyleri tayini lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA'nin asit ortamda tiyobarbitürik asitle (TBA) reaksiyona girerek MDA-TBA kompleksi oluşturması sonucunda elde edilen spektrofotometrik değerler ile belirlenmiştir. Doku örneklerinin oksidasyona duyarlılığı da MDA tayini ile aynı deney setinde yapılmıştır.

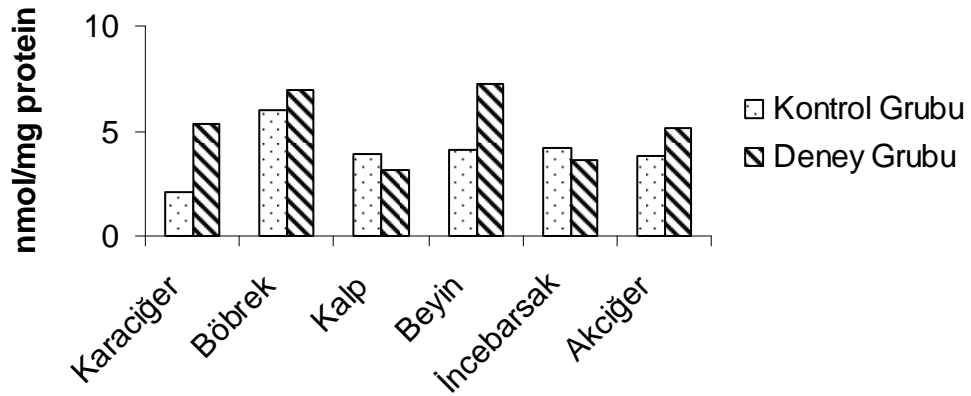
MDA tayini ve oksidasyona duyarlılık testi sonuçları her bir doku için aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.

Sıçan Dokularında MDA Tayini



Şekil 4.9 Sıçan dokularında MDA tayini

Sıçan Dokularında Oksidasyona Duyarlılık



Şekil 4.10 Sıçan dokularında oksidasyona duyarlılık

MDA tayini ve oksidasyona duyarlılık testi sonuçlarına ilişkin her bir doku ve sıçanlardan alınan serum örnekleri için hesaplanan ortalamalar ve standart sapma değerleri tablo 4.4 ve tablo 4.5’de gösterilmiştir.

Tablo 4.4 Sıçan dokularında ve serumda MDA tayini ölçümlerine ait ortalamalar ve standart sapma değerleri

Gruplar	Kontrol Grup Ortalama ve Standart Sapma Değerleri	Kolesterolden zengin diyet ile beslenen grup ortalama ve standart sapma değerleri	<i>P</i> Değeri
Karaciğer	2,9±0,6	2,9±0,8	<i>p</i> >0,05
Böbrek	4,0±0,7	4,2±0,6	<i>p</i> >0,05
Akciğer	6,5±4,8	9,0±7,2	<i>p</i> >0,05
Kalp	3,7±1,4	3,1±1,3	<i>p</i> >0,05
Beyin	1,1±0,6	2,4±1,7	<i>p</i> >0,05
İncebarsak	3,7±2,2	4,5±1,9	<i>p</i> >0,05

Tablo 4.5 Sıçan dokularında ve serumda oksidasyona duyarlılık testi ölçümlerine ait ortalamalar ve standart sapma değerleri

Gruplar	Kontrol Grup Ortalama ve Standart Sapma Değerleri	Kolesterolden zengin diyet ile beslenen grup ortalama ve standart sapma değerleri	<i>P</i> Değeri
Karaciğer	3,6±1,4	5,2±1,3	<i>p</i> >0,05
Böbrek	5,9±0,6	6,9±1,4	<i>p</i> >0,05
Akciğer	4,8±2,1	8,1±2,4	<i>p</i> <0,05
Kalp	3,9±1,8	3,0±1,5	<i>p</i> >0,05
Beyin	4,1±0,8	7,1±2,6	<i>p</i> <0,05
İncebarsak	4,2±1,1	3,6±1,1	<i>p</i> >0,05

Sıçan beyin, incebarsak ve akciğer dokularında MDA değerlerinde kolesterol diyeti ile beslenen grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artış gözlenmiştir. Karaciğer dokusunda ise kontrol grubu ve deney grubu arasında MDA açısından fark göstermemiştir.

Sıçan karaciğer, böbrek ve beyin dokularında istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da deney grubunda kontrol gruba oranla oksidasyona duyarlılık da artış gözlenmiştir. Beyin ve akciğer dokularındaki oksidasyona duyarlılık da ise deney grubunda kontrol gruba oranla artış göstererek istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (*p*<0,05).

4.8 Verilerin değerlendirilmesi

Deney grubu ve kontrol grubu enzim aktiviteleri, MDA tayini ve oksidasyona duyarlılık testlerine ait veriler istatistiksel analiz programı olan SPSS'in (Statistical Package for the Social Sciences) 10.0 sürümündeki ilişkilendirilmiş örneklem için Kuruskal Wallis ve Mann Withney U testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde anlam taşıyıp taşımadığı test edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Tez çalışmamızda PON1, PON2 ve PON3 genlerinin ekspresyonlarına bakılmıştır. PON1 ekspresyonu akciğer, aort ve karaciğer dokularında diğer dokulardan daha fazla bulunmuştur. PON1 ekspresyonu karaciğer, böbrek, beyin, incebarsak ve kalp dokusunda kontrol grubuna göre artarken, akciğer ve aort dokularında kolesterol diyeti ile beslenen deney grubunda azalma gözlenmiştir. Yapılan benzer bir çalışmada, serum PON1 aktivitesi ve karaciğer PON1 mRNA seviyesi üç hafta aterosjenik diyet ile beslenmiş farelerde yüzde atmış oranında azalmıştır (Shih 1996). PON1 karaciğer mRNA seviyesi yağlı diyet ile beslenen erkek sıçanlarda kontrol gruba göre azalmıştır, dişi sıçanlarda ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da karaciğer mRNA seviyesinde kontrol gruba göre azalma gözlemiştir. Paraoksonaz aktivitesinde ve PON1 karaciğer mRNA seviyesindeki azalışın sebebi PON1 geninin hepatik transkripsiyonel aktivitelerinin azalmasından ya da PON1 mRNA moleküllerinin düşük stabilitesinden kaynaklanabilir (Thomàs-Moyà vd 2006). Böbrek, beyin ve kalp ve aort dokularında PON1 ekspresyonu ilk kez bu projede çalışılmıştır. Karaciğer, kalp, beyin, böbrek ve incebarsak dokularında PON1 ekspresyonunun bu çalışmada kolesterol diyetiyle artış gösterdiği saptanmış olup, bu artış kolesterol diyeti sonucunda ortaya çıkan oksidatif stres veya bu dokularda PON1 geninin diyete bağlı olarak transkripsiyonel aktivitenin artmasına bağlı olabilir.

PON2 ekspresyonu çalışılan sıçan dokularında PON1 ve PON3 ekspresyonlarına oranla daha az ekspresyon görülmüştür ve diyetle akciğer dokusunda görülen relatif artış dışında herhangi bir değişiklik izlenmemiştir. Bu sonuçlar sitoplazmik bir enzim olan PON2'nin kolesterol diyeti ve sonuçlarından etkilenmeyebileceğini gösterir. PON1 ve PON3 oksidatif stres altında inaktif olsa da makrofaj PON2 ekspresyonu ve aktivitesi oksidatif stres altında oksidatif strese karşı kompanse bir mekanizma olarak artar. Paraoksonazın artışı farmakolojik anlamda makrofaj köpük hücre formasyonunun azalışı ve ateroskleroz gelişiminde düşüş olarak anlamlandırılabilir (Aviram ve Rosenblat 2004).

PON3 ekspresyonu ise deney grubunda karaciğer ve böbrek dokularında artış gösterirken akciğer ve aort dokularında büyük oranda azalma göstermiştir. PON3 ekspresyonunun karaciğer dokusunda kolesterol diyetiyle artışı PON1 de olduğu gibi kolesterol diyeti sonucunda ortaya çıkan oksidatif stres veya bu dokularda PON1 geninin diyete bağlı olarak transkripsiyonel aktivitenin artmasına bağlı olabilir. PON1 ve PON3 genel olarak karaciğerde sentezlenip HDL ile seruma taşındığından kolesterol diyetiyle artan serum ve dokularda oksidatif stres artışına bağlı olarak ekspresyonları artmış olabilir.

PON1 serum seviyeleri bireyler arasında on üç kattan fazla farklılık gösterir. Bu varyasyon patofizyolojik faktörlerin farklılığına bağlı olarak genotip çeşitliliği ile gösterilebilir. Aterosklerozlu fare modellerinde (C57BL/6) aterojenik diyete cevap olarak hepatik PON1 mRNA seviyesi kontrol gruba göre azalmıştır (Godfrey ve Reardon 2004). Sıçan karaciğer dokusunda paraoksonaz enzim aktivitesi kolesterol diyeti ile beslenen grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermektedir ($p < 0,05$). Böbrek, incebarsak, kalp, beyin dokularında da kolesterol diyeti ile beslenen sıçan grubunda istatistiksel anlamda anlamlı olmasa da paraoksonaz aktivitesi azalma göstermiştir. Serum paraoksonaz enzim aktivitesinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubunda deney grubuna oranla azalma gözlenmektedir. Akciğer dokusunda ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da paraoksonaz enzim aktivitesinde kontrol grubunda artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar çalışılan sıçan karaciğer dokularında gözlenen PON1 ve PON3 genlerinin kolesterol diyetiyle ortaya çıkan ekspresyon artışlarıyla uyum göstermemekle birlikte kolesterol diyetiyle beslenen sıçan serumlarında paraoksonaz aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bu durum karaciğerde sentezlenen PON1 ve PON3 enzimlerinin karaciğer hücresinden serumda HDL partiküllerine taşınmasından ve sitoplazmada enzim miktarının düşük olmasından kaynaklanabilir. Bu hipotezi desteklemek için çalışılan dokularda PON enzimlerinin varlığının western blot yöntemiyle gösterilmesi planlanmaktadır.

Sıçan beyin dokusunda arilesteraz enzim aktivitesinde kolesterol diyeti ile beslenen grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir ($p < 0,05$). Böbrek, incebarsak, karaciğer ve akciğer dokularında da istatistiksel anlamda anlamlı olmasa da kolesterol diyeti ile beslenen sıçan grubunda arilesteraz aktivitesi azalma göstermiştir. Serum arilesteraz enzim aktivitesinde ise istatistiksel anlamda anlamlı olarak ($p < 0,05$)

kontrol grubunda deney grubuna oranla artma gözlenmektedir. Bu sonuçlar Paraoksonaz aktivitesi sonuçlarıyla uyumlu olup benzer mekanizmalarla ortaya çıkmış olabilir. Yapılan bir çalışmada yağlı diyet ile beslenmiş on iki sağlıklı erkekte sekiz saat sonunda PON1 aktivitesi yüzde yirmi yedi azalmıştır on iki saat sonunda normal değerlere dönmüştür (Sutherland vd 1999). Balık yağı yüzde otuz dokuz oranında PON1 aktivitesinde azalışa neden olmuştur (Kudchodkar vd 2000). Fosfolipitlerin yağ asidi kompozisyonu PON1 aktivitesinde etkili olabilir. Zeytinyağlı yemekler ise PON1 aktivitesini arttırlar (Wallace vd 2001). Polienoik yağ asidi PON1 aktivitesini inhibe eder, monoenoik asit ve oleik asit PON1'i oksidatif inaktivasyondan korumada etkilidir (Nguyen vd 2003). Serum PON1 aktivitesi yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda % 24-26 oranında kontrol gruba göre azalmıştır. Serum arilesteraz aktivitesinde ise bir değişim gözlenmemiştir (Shih 1996).

Sıçan beyin, incebarsak ve akciğer dokularında MDA değerlerinde kolesterol diyeti ile beslenen grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artış gözlenmiştir. Karaciğer dokusunda ise kontrol grubu ve deney grubu arasında MDA değerleri değişmemiştir.

Oksidasyona duyarlılık testinde deney ortamında bulunan biyolojik moleküller yüksek konsantrasyonda bakır klorürle oksidasyona tabi tutulmaktadır. Antioksidan mekanizmalarla korunmuş olan doku örneklerinde oksitlenebilir moleküller daha fazla olacağından test sonucunda artmış MDA düzeyleri antioksidan potansiyelin dolaylı bir göstergesi olarak ele alınmıştır. Sıçan karaciğer, böbrek beyin ve akciğer dokularında istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da deney grubunda kontrol gruba oranla oksidasyona duyarlılık artış gözlenmiştir. Beyin ve akciğer dokularındaki oksidasyona duyarlılık ise deney grubunda kontrol gruba oranla artış göstererek istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu sonuçlar kolesterol diyetiyle artma eğilimi gösteren oksidatif stresin yine kolesterol diyetiyle artan antioksidan defans sisteminin aktivitesiyle oksidatif stresin önlendiğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda kolesterolce zengin diyet ile beslenen obez farelerin adipoz dokularında hidrojen peroksit üretiminin arttığı gösterilmiştir. Bu sonuç reaktif oksijen türlerinin oluşmasında adipoz dokunun etkisinin göstergesidir (Furukawa vd 2004). Yapılan diğer bir çalışmada diyet ile oluşturulan aterosklerozlu hiperkolesterolemik tavşanlarda ksantin oksidaz aktivasyonu ile oksidatif stres ortaya çıkmıştır (Nageswara vd 2004).

6. SONUÇ

Bu çalışmada tüm sıçan (*Rattus norvegicus*) dokularında PON1, PON2 ve PON3 mRNA ekspresyonlarını semikantitatif olarak saptanmış ve paraoksonaz enzim aktivitesi ve ekspresyonu arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Ayrıca sıçanlarda kolesterol diyeti uygulanarak oluşturulan ateroskleroz modelinde paraoksonaz enzim ekspresyonlarıyla aktiviteleri arasındaki ilişkinin nasıl etkilendiği incelenmiş ve deney ve kontrol gruplarında malondialdehit miktar tayini ve oksidasyona duyarlılık testleri yapılmıştır.

Beta aktin geni pozitif kontrol olarak kullanılarak PON1, PON2 ve PON3 genlerinin relatif ekspresyonları belirlenmiştir. Kolesterol diyeti ile beslenen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deney grubunda PON1 ve PON3 enzim ekspresyonlarının arttığı, PON2 ekspresyonlarının değişmediği gösterilmiştir.

Sıçan beyin, incebarsak ve akciğer dokularında MDA değerlerinde kolesterol diyeti ile beslenen grupta artış gösterirken, karaciğer dokusunda kontrol grubu ve deney grubu arasında MDA değerleri değişmemiştir.

Sıçan karaciğer, böbrek beyin ve akciğer dokularında deney grubunda kontrol gruba oranla oksidasyona duyarlılık artış gözlenmiştir.

Sıçan karaciğer, böbrek, incebarsak, kalp, beyin dokusunda paraoksonaz enzim aktivitesi kolesterol diyeti ile beslenen grupta azalma göstermiştir. Serum paraoksonaz enzim aktivitesinde kontrol grubunda deney grubuna oranla azalma gözlenmiştir. Akciğer dokusunda ise paraoksonaz enzim aktivitesinde kolesterol grubunda artış göstermiştir. Bu sonuçlarla bağlantılı olarak arilesteraz aktivitesi de tüm dokularda ve serumda kolesterol diyeti ile beslenen grupta artış göstermiştir. Bu sonuçlar çalışılan sıçan karaciğer dokularında gözlenen PON1 ve PON3 genlerinin kolesterol diyetiyle ortaya çıkan ekspresyon artışlarıyla uyum göstermemektedir. Bu durum karaciğerde sentezlenen PON1 ve PON3 enzimlerinin karaciğer hücresinden serumda HDL partiküllerine taşınmasından ve sitoplazmada enzim miktarının düşük olmasından

kaynaklanabilir. Bu hipotezi desteklemek için çalışılan dokularda PON enzimlerinin varlığının western blot yöntemiyle gösterilmesi planlanmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R. (2000) Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr.*, 71:1062–76.
- Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, A., Billicke, S., Draganov, D., Rosenblat, M. (2000) Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation.*, 101: 2510-17.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Billecke, S., Erogul, J., Sorenson, R., Bisgaier, CL. (1999) Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radical Biol Med.*, 26:892–904.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Scott, B., Erogul, J., Sorenson, R., Bisgaier, C. I., Newton, R. S., La Du, B. (1999) Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radical Biol & Med.*, 26: 892-904.
- Aviram, M., Rosenblat, M. (2004) Paraoxanases 1,2 and 3 oxidative stres, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radical Biology&Medicine.*, 37:1304-1316.
- Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R. S., Rosenblat, M., Erogul, J., Hsu, C., Dunlp, C., La Du, B. N. (1998) Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18:1617– 1624.
- Balci, Ö., Donma, O., Ekmekçi, H. (2004) Paraoxonase. *Cerrahpaşa J Med.*, 35: 78-82.
- Beltowski, J., Wojcicka, G., Jamroz, A. (2004) Effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors (statins) or tissue paraoxonase 1 and plasma platelet activating factor acetylhydrolase activities. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 43:121–7.
- Mackness, B., Quarck, R., Verreth, W., Mackness M., Holvoet, P. (2006) Model of Metabolic Syndrome Human Paraoxonase-1 Overexpression Inhibits Atherosclerosis in a Mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26:1545-1550.
- Blatter-Garin, M.C, Kalix, B., De Pre, S., James, R.W. (2003) Aspirin use is associated with higher serum concentrations of the antioxidant enzyme, paraoxonase-1. *Diabetologia.*, 46:593–4.

- Carey, J., Diana, M., Shih, S., Hama, Y., Villa, N., Navab, M., Srinivasa, T. (2005) The Paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine.*, 38: 153– 163.
- Cole, T. B., LiWF, Richter, R. J, Furlong, C.E., Costa, L. G. (2002) Inhibition of Paraoxonase (PON1) by heavy metals. *Toxicol Sci.*, 66 (11) :312.
- Costa, L. G., Cole, T. B., Jarvik, G. P., Furlong, C. E. (2003) Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev Med.*, 54:371–92.
- Dahle, K. L., Hill, G. E., Holman, T. R. (1962) The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, 98: 253–261.
- Dantoine, T. F., Debord, J., Charmes, J.P., Merle, L., Marquet, P., Lachatre, G., (1998) Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.*, 9:2082-2088.
- Debord, J., Dantoine, T., Bollinger, J. C., Abraham, M. H., Verneuil, B., Merle, L. (1998) Inhibition of arylesterase by aliphatic alcohols. *Chem Biol Interact.*, 113:105–15.
- Durak, I. (2004) Effect of cholesterol supplementation on antioxidant enzyme activities in rat hepatic tissues: possible implication of hepatic paraoxonase in atherogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, 14:211-214
- Ecobichon, D. J., Stephens, D. S. (1973) Perinatal development of human blood esterases. *Clin Pharmacol Ther.*, 14:41–7.
- Elena, T. M, Gianotti, M., Proenza, A.M., Lladó, I. (2007). Paraoxonase 1 Response to a High-Fat Diet: Gender Differences in the Factors Involved. *Mol Med.*, 13 :(3-4) 203 – 209.
- Godfrey, S., Getz Catherine A. Reardon. (2004) Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Current Opinion in Lipidology.*, 15:261-267.
- Gouedard, C., Koum-Besson, N., Barouki, R., Morel, Y. (2003) Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol.*, 63:945–56.
- Gülden, B., Köse, K. (2004) Paraoksonaz: Biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. *Erciyes 75 Medical Journal.*, 26 (2) 75-80.
- Hedrick, C. C. (2000) Short-term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by an immune mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20:1946-1952.

- Heijmans, B. T., Westendorp, R. G. J., Lagaay, A. M., Knook, D. L., Klufft, C., Slagboom, P. E. (2000) Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis.*, 149: 91-7.
- Jang, Y. Y., Song, J. H., Shin, Y. K., Han, E.S., Lee, C. S. (2000) Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res.*, 42(4):361–371.
- Karanth, S., Pope, C. (2000) Carboxylesterase and A-esterase activity during maturation and aging: relationship to toxicity of chlorpyrifos and parathion in rats. *Toxicol Sci.*, 58:282–9.
- Kelso, G.J., Stuart, W. D., Richter, R. J., Furlong, C. E., Jordon-Starck, T. J., Harmony, J.A.K. (1994) Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry.*, 33: 832-39.
- Kudchodkar, B. J., Lacko, A. G., Dory, L., Fungwe, T. V. (2000) Dietary fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. *J Nutr.*, 130:2427–33.
- Kumon, Y., Suehiro, T., Ikedo, Y., Hashimoto, K. (2003) Human paraoxonase-1 gene expression by HepG2 cells is down-regulated by interleukin-1b and tumor necrosis factor-a, but is upregulated by interleukin6. *Life Sci.*, 73:2807–15.
- Louis-Philippe, P., Seidmanb, E., Delvinc, E., Amred, D., Deslandresd, C., Domingueza, M., Sinnett, D., Levya, E. (2009) Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*, 41:1628–1637.
- Lourdes, R., Antonio, F., Hernández, J., Caballero, L., Gil, F., Pla, A. (2001) Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. implications for its physiological role. *Chemico-Biological Interactions.*, 137: 123–137.
- Mackness, B., Durrington, P., McElduff, P., Yarnell, J., Azam, N., Watt, M., Mackness, M. (2003) Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation.*, 107:2775–2779.
- Mackness, B., Durrington, P. N., Boulton, A. J. M., Hine, D., Mackness, M. I. (2002) Serum paraoxonase activity in patients with type I diabetes compared to healthy controls. *Eur J Clin Invest.*, 32:259–64.
- Mackness, B., Durrington, P. N., Mackness, M. I. (1998) Human serum Paraoxonase. *Gen Pharm.*, 3: 329-36.
- Marsillach, J., Mackness, B., Mackness, M., Riu, F., Beltran, R., Joven, J., Camps, J. (2008) Immunohistochemical analysis of paraoxonase-1, 2 and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radical Biology & Medicine.*, 45: 146-157.

- Milochevitch, C., Khalil, A. (2001) Study of the paraoxonase and plateletactivating factor acetylhydrolase activities with aging. *Prostagl Leukot Essent Fatty Acids.*, 65:241–6.
- Moser, V. C., Chanda, S. M., Mortensen, S. R., Padilla, S. (1998) Age -and genderrelated differences in sensitivity to chlorpyrifos in the rat reflect developmental profiles of esterase activities. *Toxicol Sci.*, 46:211–22.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2000) Lehninger principles of Biochemistry. *Worth Publishers*, Üçüncü Baskı, New York s 1152.
- Nguyen, S. D., Sok, D. E. (2003) Beneficial effect of oleoylated lipids on paraoxonase I: protection against oxidative inactivation and stabilization. *Biochem J.*, 375:275–85.
- Nishio, E., Watanabe, Y. (1997) Cigarette smoke extracts inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem Biophys Res Comm.*, 236:289–93.
- Paragh, G., Balla, P., Katona, E., Seres, I., Egerhazi, A., Degrell, I. (2002) Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*, 252:63–7.
- Peter, M., Albertini, A. R. (2001) Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta.*, 306 :1–17.
- Raiszadeh, F., Solati, M., Etemadi, A., Azizi, F. (2004) Serum paraoxonase activity before and after treatment of thyrotoxicosis. *Clin Endocrinol.*, 60:75–80.
- Rao, M. N., Marmillot, P., Gong, M., Palmer, D. A., Seeff, L. B., Strader, D. B. (2003) Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolism.*, 52:1287–94.
- Rodrigo, L., Hernandez, A. F, Lopez-Caballero, J. J., Gil, F., Pla, A. (2001) Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. Implications for its physiological role. *Chem Biol Interact.*, 137:123–37.
- Sanvanich, P., Mackness, B., Gaskell, S. J., Durrington, P., Mackness, M. (2003) The effect of high-density lipoproteins on the formation of lipid/protein conjugates during in vitro oxidation of low-density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300: 501–506.
- Shigetada, F., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation.*, 114(12) : 1752-1761.

- Shih, D. M., Gu, L., Hama, S., Xia, Y. R., Navab, M., Fogelman, A. M. (1996) Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest.*, 97:1630–9.
- Sierksma, A., Van der Gaag, M. S., Van Tol, A., James, R. W., Hendriks, H. F. J. (2002) Kinetics of HDL cholesterol and paraoxonase activity in moderate alcohol consumers. *Alcohol Clin Exp Res.*, 26:1430–5.
- Steinberg, D. (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem.*, 272: 20963-66.
- Sutherland, W. H. F., Walker, R. J., de Jong, S. A., van Rij, A. M., Phillips, V., Walker H. L. (1999) Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 19 (5) :1340–7.
- Şimşek, F. (1999) Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar ve Lipit Peroksidasyonu., *T Klin J Pediatr.*, 8:42-47.
- Van der Gaag, M. S., van Tol, A., Scheek, L.M., James, R. W., Urgest, R., Schaafsma, G. (1999) Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomized intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis.*, 147:405–10.
- Wallace, A. J, Sutherland, W. H. F., Mann, J. I., Williams, S. M. (2001) The effect of meals rich in thermally stressed olive and safflower oils on postprandial serum paraoxonase activity in patients with diabetes. *Eur J Clin Nutr.*, 55:951–8.
- Wehner, J. M., Murphy-Erdosh, C., Smolen, A., Smolen, T. S. (1987) Genetic variation in paraoxonase activity and sensitivity to disopropylphosphofluoridate in inbred mice. *Pharmacol Biochem Behav.*, 28:317–20.
- Weitman, S. D., Vodcnik, M. J., Lech, J. J. (1983) Influence of pregnancy on parathion toxicity and distribution. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 71:215–24.
- Young, I. S., J Mc Eneny (2001) Lipoprotein oxidation and atherosclerosis, *Biochemical Society Transactions* ., 29 : 358-362

8. ÖZGEÇMİŞ

Seda SABAH 1985 yılında Gördes'te doğdu. İlkokulu Manisa'da okuduktan sonra, liseyi Manisa Dünder Çiloğlu Anadolu Lisesinde tamamladı. 2004-2008 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü bitirdi. 2008 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.