

Clinical Chemistry 50:12, 2309-2315, (2004)

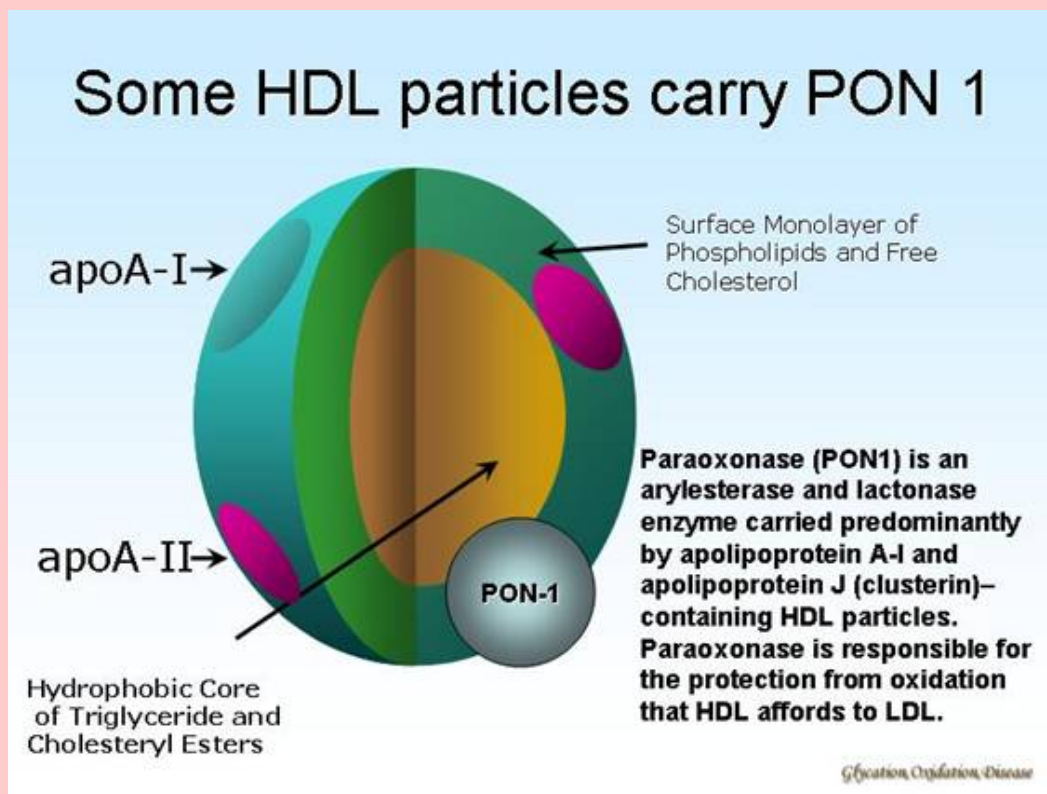
HDL FRAKSİYONLARINDAKİ PON AKTİVİTESİNİN DAĞILIM SPEKTRUMU

Christoph Bergmeter, Rüdiger Siekmeter,
Werner Gross

Çeviren: Dr.TÜLAY KAVAK

Background

-İnsan serum paraoksonazı (PON1; EC 3.1.1.2 ve EC 3.1.1.8) birçok organofosfatlar ve lipid oksitlerini hidroliz eder. Kalsiyum, aktivitesi ve stabilitesi için kofaktördür. Enzimin bilinen üç ayrı polimorfizmi vardır: Q192R, L55M ve T(-107)C

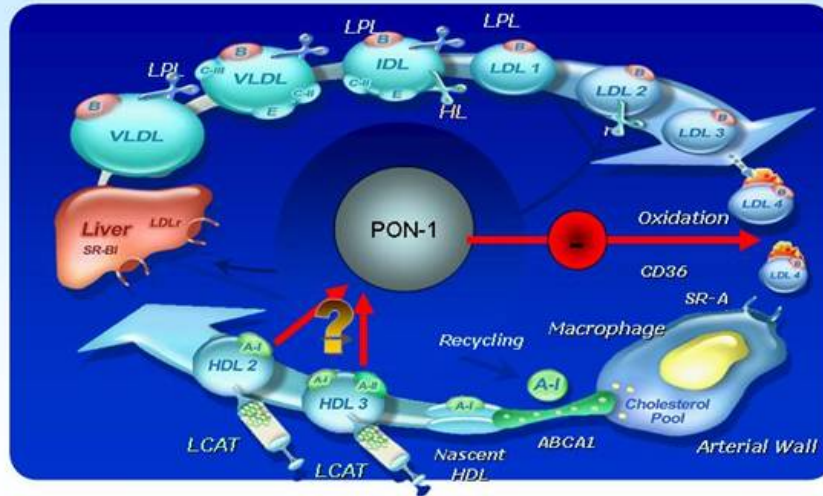


-HDL içindeki PON1 aktivite dağılımı, dört ayrı araştırma grubu tarafından incelenmiştir.

-PON1, başlangıçta HDL₂'de ve daha sonra HDL₃'te lokalize varsayıldı; fakat bu araştırmacıların santrifugasyon prosedürü veya HDL subfraksiyonlarındaki PON1 in dağılım profili üzerinde verdikleri ayrıntılı değildi.

-Diğer çalışmalar, PON1 aktivite ölçümlerinin HDL₃ quantifikasyonu için uygun olduğunun kabul edilmesine yol açmıştır; fakat bu sadece polietilen glikol presipitasyonu temelinde doğrulanmıştır.

- Bu çalışmalara rağmen, HDL yoğunluk türleri içindeki PON1 lokasyonu üzerine düşünceler halen belirsizlik taşımaktadır ve VHDL fraksiyonunun ($\rho=1.216-1.256$ kg/L) göz önünde bulundurulması gerekir. **Bu çalışmanın hedefi, aktif paraoksonaz içeren HDL altgruplarını tayin etmek ve apolipoprotein kompozisyonlarını analiz etmek idi.** Ek bir amaç, HDL altfraksiyonları içindeki PON1 aktivitesi dağılımının PON1 polimorfizmine bağımlı olma olasılığını incelemek idi.



Do PON-1 HDL subclasses vary in disease?

Materyal ve metod

Örnekler

- Çalışma için 245 bireylik bir çalışma grubu hazırlandı ve bunların klinik muayenelerle sağlıklı oldukları doğrulandı.
- Ultrasantrifugasyon analizi için serum, 49 bireylik bir alt gruptan (%20 kadın) elde edildi.
- Bu grubun yaş medyanı 36, vücut kitle indeksi medyanı 24,5 kg/m² ve kan basıncı medyanı 126/70 mmHg idi. **Tüm bireyler normolipidemik** idi ve medikal tedavi almamıştı. Totalin %39'u sigara içen (%22'si ≥ 10 paket/yıl), %29'u ≥ 15 gr/gün alkol kullanan idi.

-Örnek toplanmasında lipid ve PCR ölçümleri için EDTA lı tüpler, ultrasantrifugasyon analizi için serum tüpleri kullanıldı.

-Tüm örnekler hemen santrifuj edildi (2880g'de 10dk) ve bileşenler -80°C'de donduruldu.

-Çözülme sonrasında ölçümlerin tümü, kullanılan yoğunluk gradienti solusyonundaki ApoE'nin dayanıksız olması yüzünden 57 saat içinde tamamlandı.

PON1 aktivitesi

-PON1 aktivitesi substrat olarak fenil asetat kullanılarak tayin edildi. Orijinal prosedürden farklı olarak dilusyon için, su yerine substratsız tampon solusyonu kullanıldı. İki ay üzerindeki çalışmalar arası CV %8.2 idi (n=112, ortalama konsantrasyon 0.6 U/ml, dilüsyon 1:101).

-PON1 aktivitesi fosfotungstik asit (PTA)/MgCl₂ ile presipitasyondan anlamlı derecede etkilenmedi.

Kinetik nefelometry

-ApoA-1 ve ApoB, Beckmann protein ölçüm sisteminde, firma tarafından sağlanan reaktifler kullanılarak ve firmanın yönergelerine göre ölçüldü.

-ApoA-II, aynı sistemde, Dade-Behring'den sağlanan insan ApoA-II'ne karşı N-antiserum, uygun standartlar ve kontrollerle tayin edildi.

ELISA

- ApoE ve ApoJ, DPC Bierman'dan alınan poliklonal antikolar ile nonkompetitif sandwic ELISA yöntemiyle ölçüldü.

-ApoE tutucu antikor olarak, 0.2 mol/L karbonat tamponunda (pH 10) 1:2001 oranında dilüe edilmiş anti-h-ApoE kullanıldı. ApoE tanıyıcı olarak biotinle konjuge anti-h-ApoE (0.5 mL/L Tween 20 ve 10 g/L bovin serum albumin içeren Dulbecco PBS ile 1:10001 oranında dilüe) kullanıldı.

-ApoJ tutucu antikor olarak, 0.2 mol/L karbonat tamponunda (pH 10) 1:2001 oranında dilüe edilmiş anti-h-ApoJ kullanıldı. ApoE tanıyıcı olarak biotinle konjuge anti-h-ApoJ (0.5 mL/L Tween 20 ve 10 g/L goat serum albumin içeren Dulbecco PBS ile 1:20001 oranında dilüe) kullanıldı.

-İnkubasyon süreleri, tutucu antikörlerin yüzeyine bağlanması için plağın gece boyunca bırakılması dışında oda sıcaklığında 2 saat idi.

-ApoE-ApoE ELISA'nın saptama sınırı 60 pmol/L ve ApoJ-ApoJ ELISA'nın ise 2 nmol/L idi.

-Tüm ölçümler çift yapıldı.

-Çalışmalar arası CV ApoE-ApoE ELISA için %5 ve ApoJ-ApoJ ELISA için %11 idi (n=62 ortalama konsantrasyonlar ApoE-ApoE ELISA için 13nmol/L, ApoJ-ApoJ ELISA için 81 nmol/L).

Ultrasantrifügasyon

-Santrifügasyon öncesi, ApoB içeren lipoproteinler, PTA/MgCl₂ kullanılarak presipite edildi. PTA/MgCl₂ presipitasyonunun doğruluğu, ardışık flotasyonla onaylandı.

-Örneklerin dansitesi (presipitasyon sonrası $\rho=1.0285$ kg/L ki doğal serumunkinden daha yüksek) gazlardan arıtılmış belirli yoğunluktaki solusyonların (NaCl/NaBr) ilave edilmesiyle artırıldı. Her bir solusyon 1.32 mmol/L CaCl₂ içerir.

-Yeterli PTA süpernatant (2.22mL) ve yoğunluk solüsyonu (1.58 mL; $\rho =1.3425$ kg/L) karıştırıldı, 1.1600 kg/L dansite elde edildi.

-Ultrasantrifugasyon şartları aşağıda gösterildiği şekildedir:

santrifuj, Kontron T-1080

rotor, Beckman Ti 50.4

tüpler, Beckman open-top thick-walled polikarbonat

doldurma dansitesi, 1.1600 kg/L

rotor ısısı 15° C

relatif santrifugal güç, 241 336 g

zaman, 22 saat

hızlanma, maksimum

yavaşlama, maksimum 500 rpm'in altında

Bilgisayar kontrollü fraksiyonel emme

-Ultrasantrifugasyon sonrası tüpleri boşaltma için yüksek yenilenebilme sağlayan yeni bir prosedür geliştirildi.

-Bu, sıvı yüzeyine santral bir kanül (Hamilton kanülü) yerleştirmeyi ve iğne içinden emme suretiyle tüpün içeriğinden farklı volümleri uzaklaştırmayı kapsamaktadır.

-Belirlenen şartlarda dokuz 420 μ L fraksiyon elde edildi.

Genetik tiplleme

- PON1₁₉₂ ve PON1₅₅ genotipleri, bir Eppendorf Thermal Cycler'de restriksiyon enzim analizi sonrası PCR ile tayin edildi.

-50 μ L final volümde 60 pmol oligonükleotid primerleri, 62.5 mM KCl, 12.5mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 μ M herbir deoksinükleotid trifosfat ve 1.5 U Taq-DNA polimeraz içeren PCR reaksiyon karışımının her birine 0.1 μ g DNA eklendi.

-T(-107)C polimorfizmi, amplifikasyon refrakter mutasyon sistem (ARMS) kullanılarak tanımlandı.

-İki eksternal primer kullanıldı; PONpromotor A ve PONpromotor B. İki tane de 5' internal allel-spesifik primer kullanıldı; PONpromotor-107C ve PONpromotor-107T kullanıldı.

-Amplifikasyon protokolü, 100mL/L'den daha fazla dimetil sulfoksit eklenmesiyle tanımlanan standart reaksiyon karışımının oluşmasından ibarettir.

-Eksternal 5' ve 3' primerler ve bir internal primer (her biri 30 pmol) herbir reaksiyon karışımına eklendi. ve 30 siklus 94°C'de 30 s, 64°C'de 30 s, 72°C de 1 dk ve son olarak 72°C'de 6 dk yapıldı.

-PCR fraksiyonları %2 agaroz jelinde analiz edildi.

Sonuçlar

Fraksiyonasyon

-Santrifugasyon sonrası tüp içeriğinin fraksiyonasyonu için kullanılan genelde iki işlem vardır. Bunlar kolayca yenilenebilir dilimleme tekniği (readily reproducible slicing technique) ve çıkarma metodu (expulsion method)'dur. Birincisi, sadece iki fraksiyon sağlar ve zaman alıcıdır; ikincisi FC70 gibi ağır flurohidrokarbonların kullanımına bağlıdır.

-Bu çalışmada geliştirilen işlem, yüksek yenilenmeyle (CV yaklaşık %2) küçük parçacıkların (250 μ L'nin altında) hızlı izolasyonuna (8 tüp için 30 dk'nın altında) imkan vermektedir

Dolum yoğunluğu 1.1377 kg/L

- Spektrum içinde uniform bir fraksiyon olarak HDL₂ elde edilmeye çalışıldı.

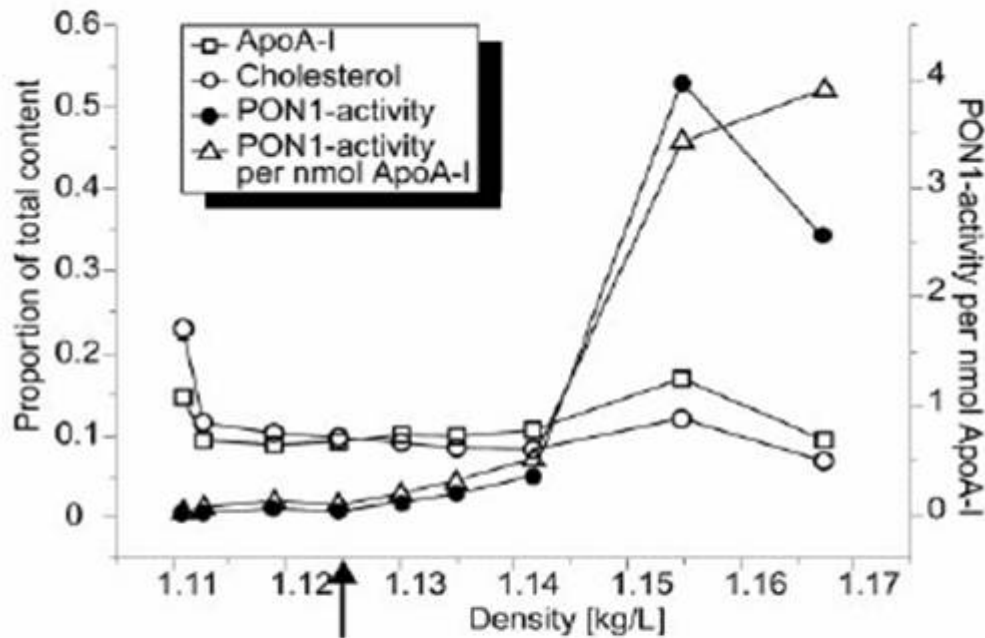


Fig. 1. Density distributions of cholesterol and ApoA-I concentration and PON1 activity after centrifugation for 22 h at 240 000g using a filling density of 1.1377 kg/L.

The arrow indicates the operational density between HDL₂ and HDL₃. The first fraction (mean density, 1.1109 kg/L) contains HDL₂ ($1.063 < \rho < 1.1119$ kg/L), and the last fraction (mean density, 1.1673 kg/L) contains the more dense HDL₃ and the VHDL ($1.1610 < \rho < 1.256$ kg/L).

-Absolu PON1 aktivitesi değerleri ve dansite gradiyenti içindeki apolipoprotein konsantrasyonları başlangıç miktarlarına bağımlı olduğundan dolayı ordinat skalasında relatif değerler baz alındı.

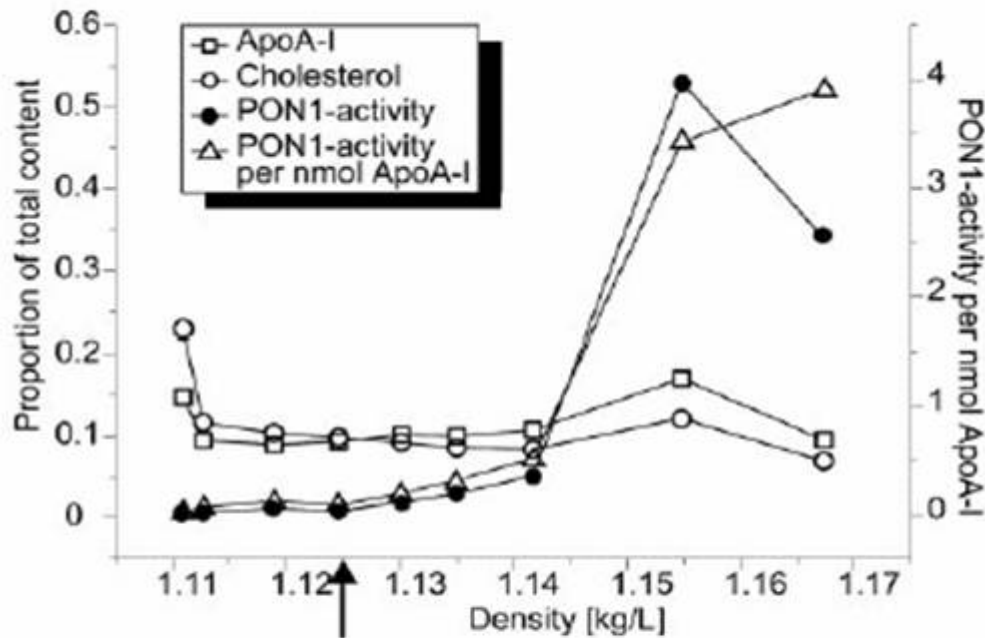


Fig. 1. Density distributions of cholesterol and ApoA-I concentration and PON1 activity after centrifugation for 22 h at 240 000g using a filling density of 1.1377 kg/L.

The arrow indicates the operational density between HDL₂ and HDL₃. The first fraction (mean density, 1.1109 kg/L) contains HDL₂ ($1.063 < \rho < 1.1119$ kg/L), and the last fraction (mean density, 1.1673 kg/L) contains the more dense HDL₃ and the VLDL ($1.1610 < \rho < 1.256$ kg/L).

-Apo A-1 ve kolesterol, sıklıkla bir en alt nokta $\rho = 1.125$ kg/L'de beklenen dağılım paternlerini gösterdiler.

-PON1 aktivitesinin dağılımı sadece >1.145 kg/L dansitelerde fark edilebilen bir artış nedeniyle farklı idi.

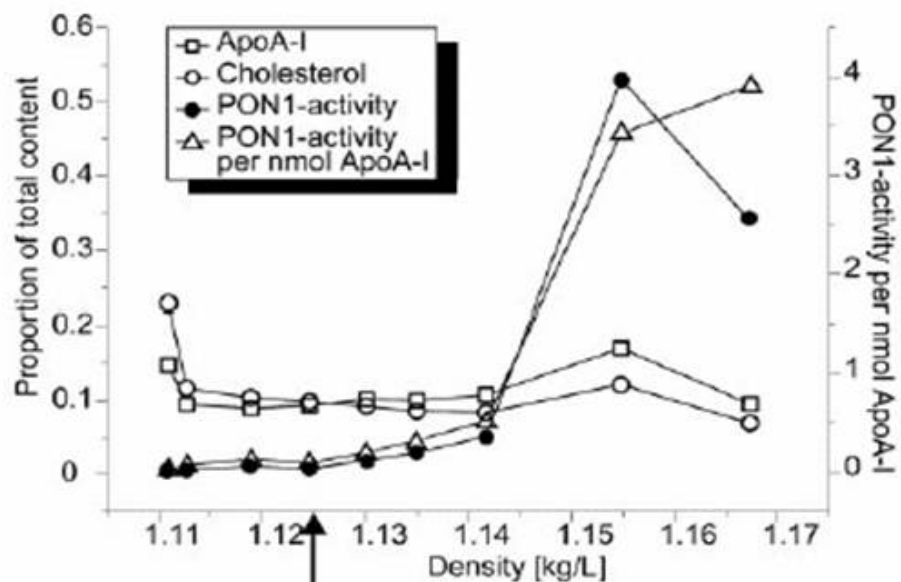


Fig. 1. Density distributions of cholesterol and ApoA-I concentration and PON1 activity after centrifugation for 22 h at 240 000g using a filling density of 1.1377 kg/L.

The arrow indicates the operational density between HDL₂ and HDL₃. The first fraction (mean density, 1.1109 kg/L) contains HDL₂ ($1.063 < \rho < 1.1119$ kg/L), and the last fraction (mean density, 1.1673 kg/L) contains the more dense HDL₃ and the VHDL ($1.1610 < \rho < 1.256$ kg/L).

-Son fraksiyondaki azalma Apo A-I ile ilişkiliydi ve aktif PON1 serum protein fraksiyonunda (sediment) gösterilemedi. **HDL₃ fraksiyonu, HDL₂ fraksiyonundakinden 25 kat daha fazla PON1 aktivitesi içeriyordu.**

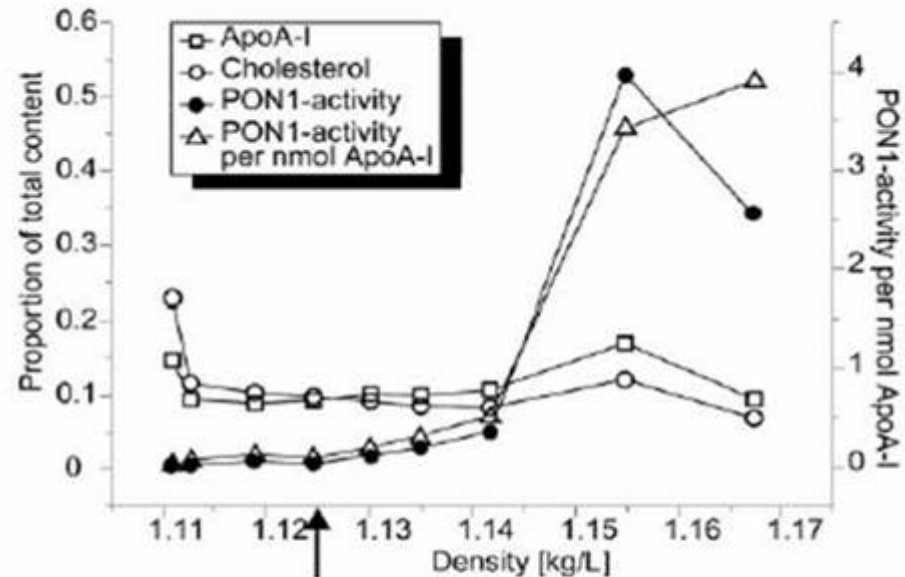


Fig. 1. Density distributions of cholesterol and ApoA-I concentration and PON1 activity after centrifugation for 22 h at 240 000g using a filling density of 1.1377 kg/L.

The arrow indicates the operational density between HDL₂ and HDL₃. The first fraction (mean density, 1.1109 kg/L) contains HDL₂ (1.063 < ρ < 1.1119 kg/L), and the last fraction (mean density, 1.1673 kg/L) contains the more dense HDL₃ and the VHDL (1.1610 < ρ < 1.256 kg/L).

-Aktivite/apolipoprotein (U/nmol) olarak ifade edilen Apo A-I'deki PON1 aktivitesi, daha az yoğun fraksiyonlarda PON1 aktivitesi ile orantılı, fakat son fraksiyonda değildi. Burada her iki değer düşmüş, oran artmıştır.

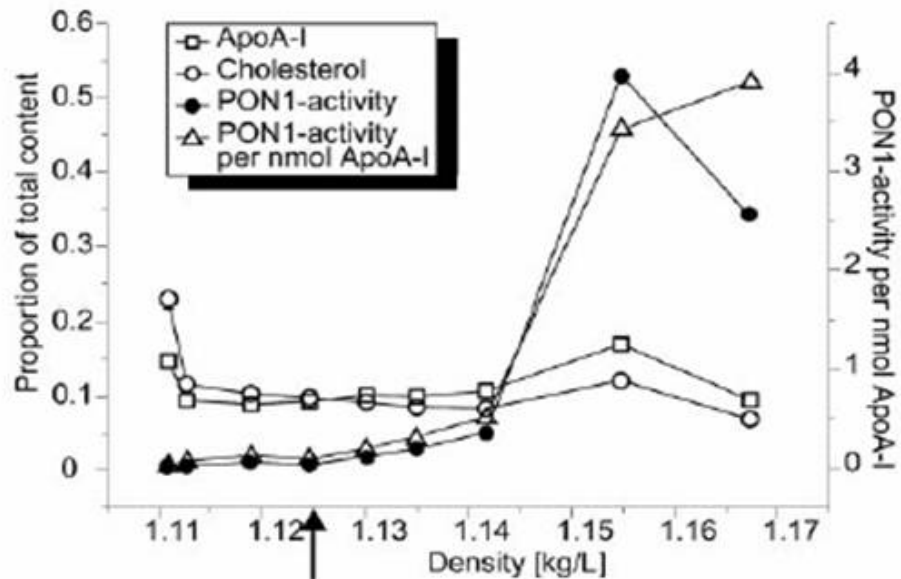


Fig. 1. Density distributions of cholesterol and ApoA-I concentration and PON1 activity after centrifugation for 22 h at 240 000g using a filling density of 1.1377 kg/L.

The arrow indicates the operational density between HDL₂ and HDL₃. The first fraction (mean density, 1.1109 kg/L) contains HDL₂ (1.063 < ρ < 1.1119 kg/L), and the last fraction (mean density, 1.1673 kg/L) contains the more dense HDL₃ and the VHDL (1.1610 < ρ < 1.256 kg/L).

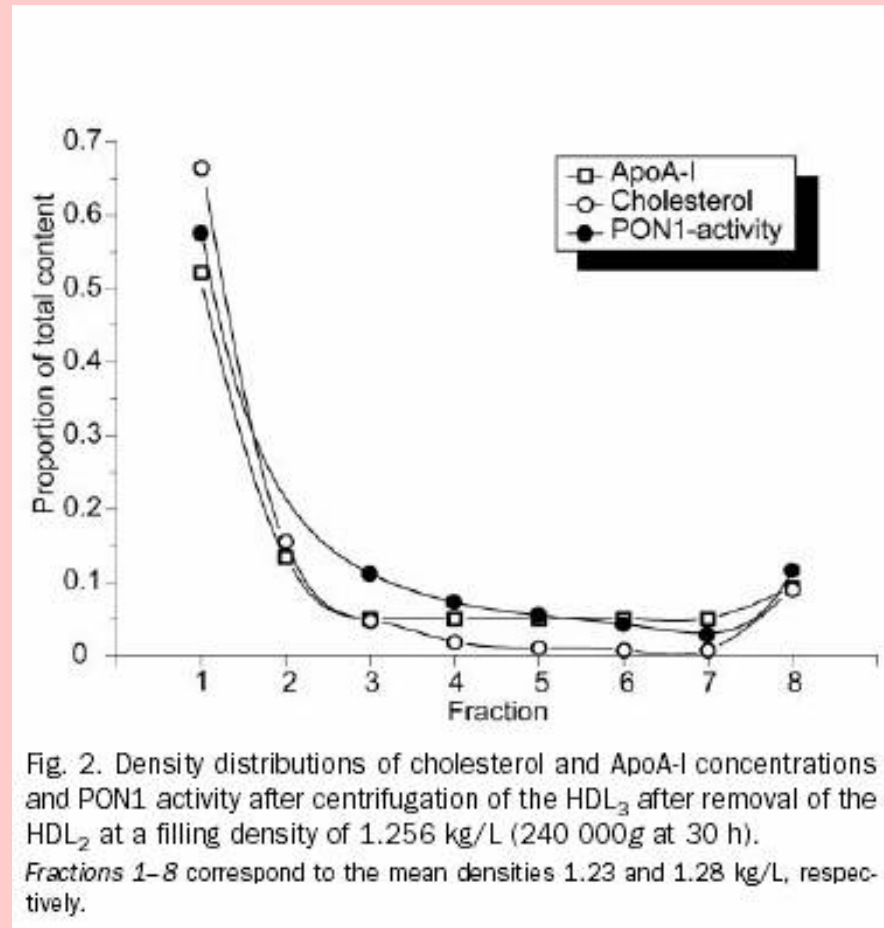
HDL₃ ve VHDL'nin flotasyonu

-HDL'den aktif PON1'un ayrılması için geçerli dağılım paternleri olup olmadığını kontrol etmek için, yüksek dansitelerde ($\rho=1.216$ ve 1.256 kg/L) santrifugasyonlar yapıldı.

-Bu amaç için HDL₂ slicing tekniği kullanılıp ultrasantrifugasyon aracılığıyla uzaklaştırıldı ve alt fraksiyon ya 1.216 ya da 1.256 kg/L yoğunlukta santrifuj edildi.

--ApoA-I ve kolesterol, $\rho=1.216$ kg/L'da tamamen yüzeyde kaldılar fakat aktif PON1 in yüzdesi (oranı), kullanılan yoğunluk aralığının üzerinde nispeten sabit (%12) idi.

-VHDL ($\rho=1.256$ kg/L) ile flotasyon çalışmaları, bu fraksiyonun, ApoA-I'in tümündeki ve kolesterolün tümündeki gibi PON1 aktivitesinin tümünü içerdiğini göstermiştir. İki santrifugasyon sonrası PON1 geri kazanım ortalaması %87.5 idi (n=5).



Dolum yoğunluğu 1.16 kg/L

-ApoA-I, %6.5 ve %16 arasında yüzdelerle incelenen yoğunluk aralığında diğer tarafla eşit olarak dağılmıştır.

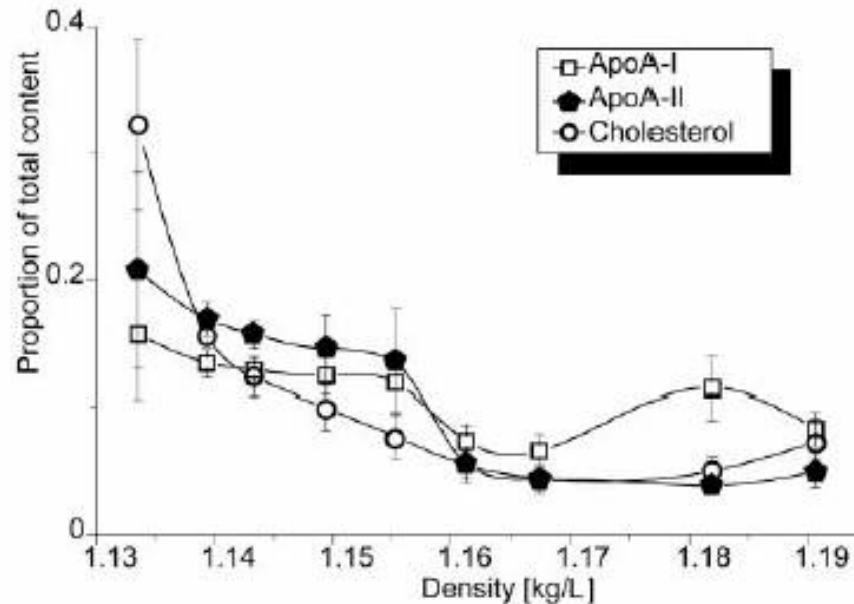


Fig. 3. Density distributions of ApoA-I, ApoA-II, and cholesterol concentrations (filling density, $\rho = 1.1600$ kg/L; centrifugation for 22 h at 240 000g).

The *error bars* indicate the interindividual mean variation. The first fraction (mean density, 1.1335 kg/L) contains HDL₂ and less dense HDL₃ ($1.063 < \rho < 1.1366$ kg/L), and the last fraction (mean density, 1.1907 kg/L) contains the more dense HDL₃ and the VHDL ($1.1854 < \rho < 1.256$ kg/L).

-En yüksek yüzde, 1.063-1.1366 kg/L yoğunluk aralığında gözlemlendi. HDL'nin tümünün santrifuj edilmesinden dolayı bu, 1.1335 kg/L ortalama dansite ile daha az yoğun HDL₃ kadar HDL₂ içeren ilk fraksiyona uyar.

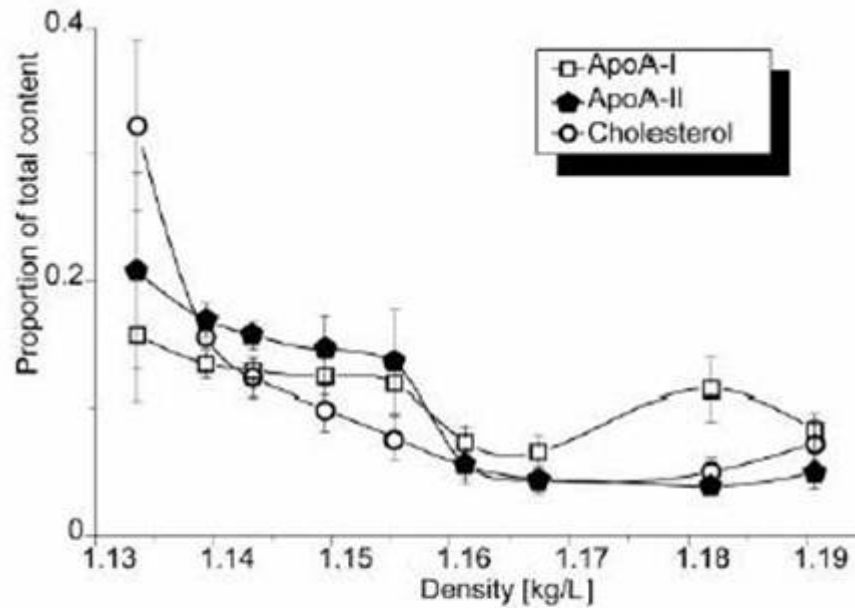


Fig. 3. Density distributions of ApoA-I, ApoA-II, and cholesterol concentrations (filling density, $\rho = 1.1600$ kg/L; centrifugation for 22 h at 240 000g).

The *error bars* indicate the interindividual mean variation. The first fraction (mean density, 1.1335 kg/L) contains HDL₂ and less dense HDL₃ ($1.063 < \rho < 1.1366$ kg/L), and the last fraction (mean density, 1.1907 kg/L) contains the more dense HDL₃ and the VLDL ($1.1854 < \rho < 1.256$ kg/L).

-ApoA-I dağılımındaki en alt nokta (%6.5) dikkat çekici idi. Bu yaklaşık $\rho = 1.1675$ kg/L idi. Dansitesi 1.158 kg/L den büyük fraksiyonlarda ApoA-II nin oranı, ApoA-I'inkinden daha az idi.

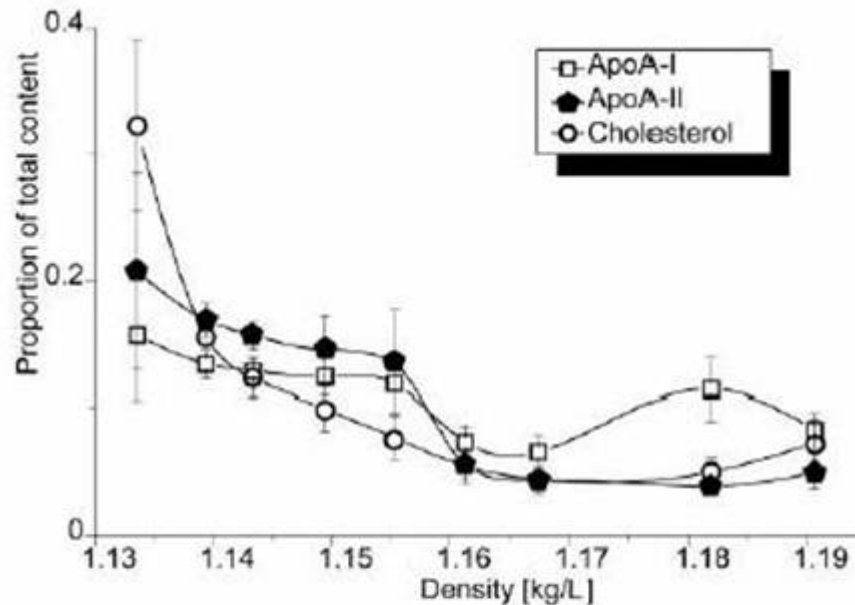


Fig. 3. Density distributions of ApoA-I, ApoA-II, and cholesterol concentrations (filling density, $\rho = 1.1600$ kg/L; centrifugation for 22 h at 240 000g).

The *error bars* indicate the interindividual mean variation. The first fraction (mean density, 1.1335 kg/L) contains HDL₂ and less dense HDL₃ ($1.063 < \rho < 1.1366$ kg/L), and the last fraction (mean density, 1.1907 kg/L) contains the more dense HDL₃ and the VLDL ($1.1854 < \rho < 1.256$ kg/L).

-En yoğun HDL₃ fraksiyonunda ($\rho=1.1907$ kg/L) Apo A-II %5'in altında gösterildi, halbuki en az yoğunluktaki fraksiyonda ($\rho=1.1335$ kg/L) oran en yüksekti (%20'nin üstünde)

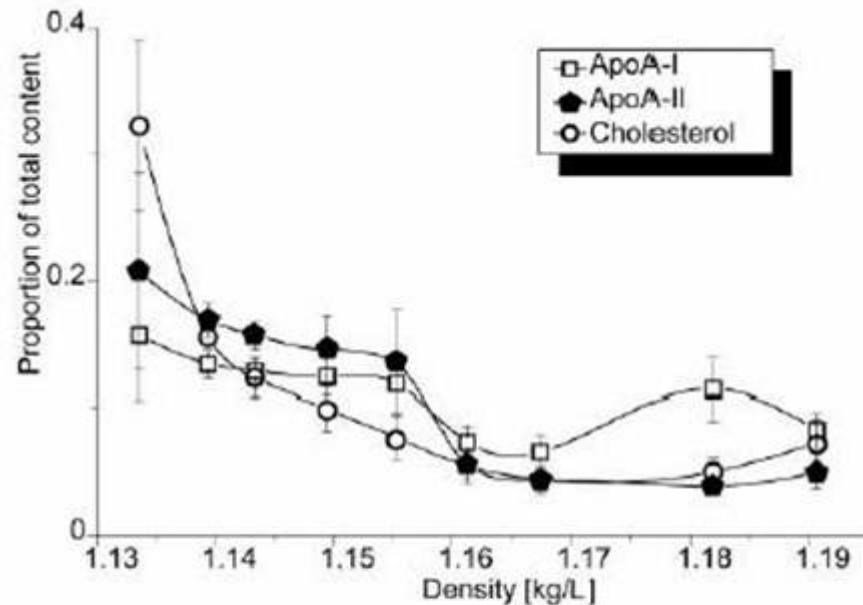


Fig. 3. Density distributions of ApoA-I, ApoA-II, and cholesterol concentrations (filling density, $\rho = 1.1600$ kg/L; centrifugation for 22 h at 240 000g).

The *error bars* indicate the interindividual mean variation. The first fraction (mean density, 1.1335 kg/L) contains HDL₂ and less dense HDL₃ ($1.063 < \rho < 1.1366$ kg/L), and the last fraction (mean density, 1.1907 kg/L) contains the more dense HDL₃ and the VHDL ($1.1854 < \rho < 1.256$ kg/L).

- Diğer HDL proteinlerin (ApoE, ApoJ ve PON1) dağılımı yukarıda tanımlanan apolipoproteinlerden oldukça farklıdır. Apoll'nin küçük miktarlarda gösterildiği bu fraksiyonlarda sadece üçü meydana gelmiştir. ApoE'nin yüzdesi, sadece 1.1675 kg/L'lik bir yoğunluğun üzerinde platoya eriştiği zaman artmıştır.

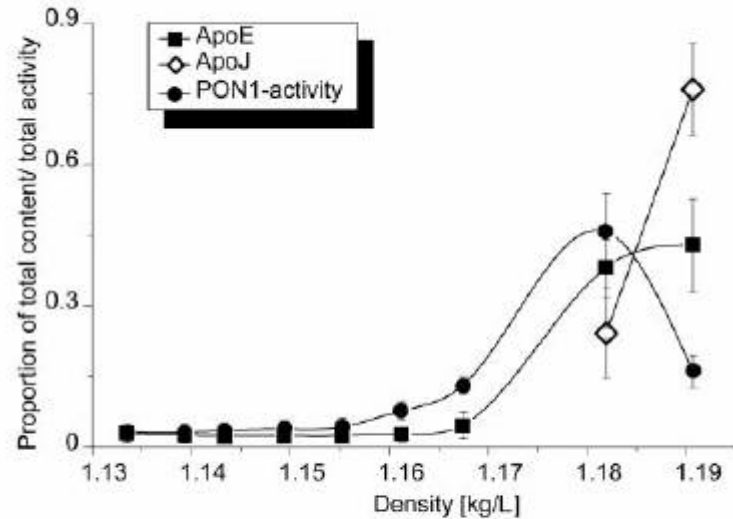
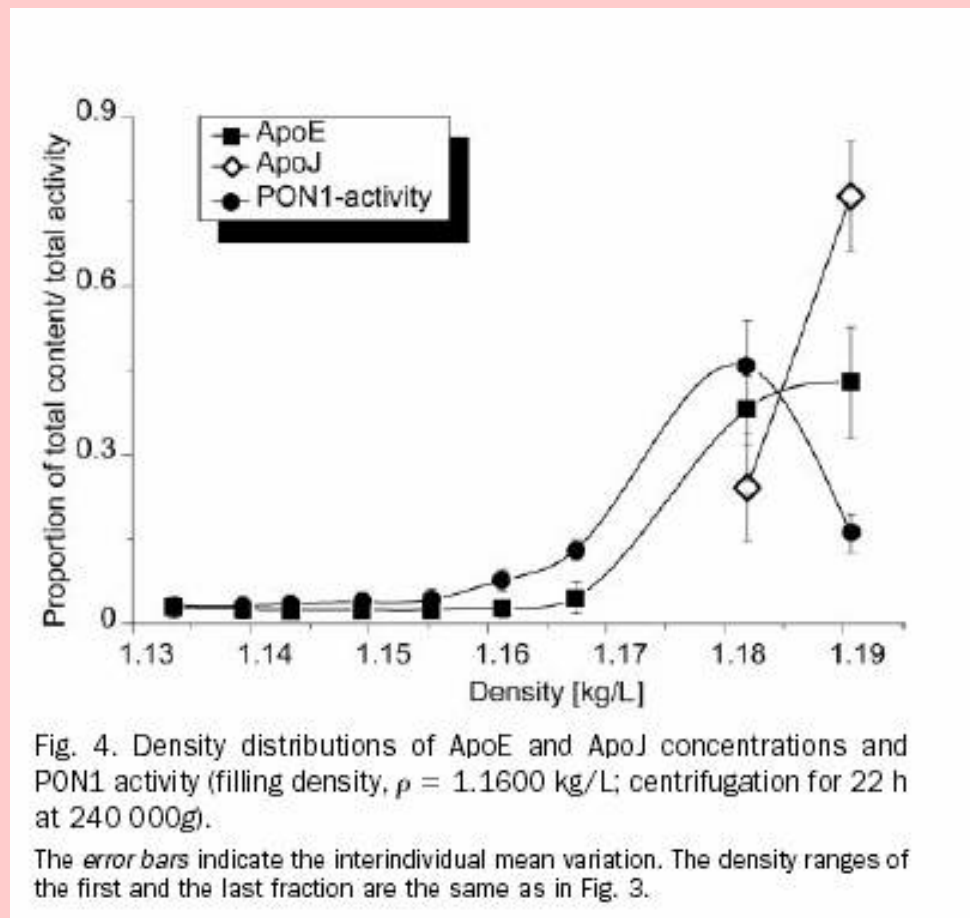


Fig. 4. Density distributions of ApoE and ApoJ concentrations and PON1 activity (filling density, $\rho = 1.1600$ kg/L; centrifugation for 22 h at 240 000g).

The *error bars* indicate the interindividual mean variation. The density ranges of the first and the last fraction are the same as in Fig. 3.

-HDL içindeki ApoJ'nin %99'undan fazlası, son iki fraksiyonda bulunmuştur.

-PON1 aktivite dağılımı, $\rho=1.16$ kg/L'de artar ve aktivitesi $\rho=1.18$ kg/L'de maksimuma erişir.



-Total PON1 aktivitesinin sadece %18'i daha küçük yoğunluk bölgesinde bulunmuştur yani aktivitesindeki artışın başlamasından önce. Farklı dağılım paternlerinde dikkate değer bir özellik ApoJ konsantrasyonu ve PON1 aktivitesi arasında ters bir ilişki olmasıdır.

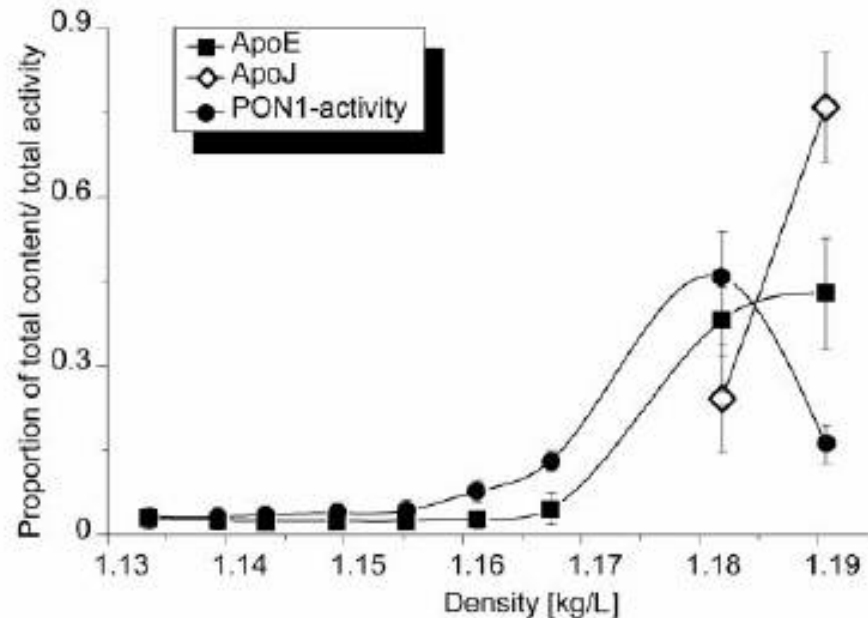


Fig. 4. Density distributions of ApoE and ApoJ concentrations and PON1 activity (filling density, $\rho = 1.1600$ kg/L; centrifugation for 22 h at 240 000g).

The *error bars* indicate the interindividual mean variation. The density ranges of the first and the last fraction are the same as in Fig. 3.

Genetik faktörlerle PON1 aktivitesi ilişkisi

-Araştırılan gruplar içinde Hardy-Weinberg'e göre gen frekansı aşağıdaki gibidir.

Q192: %72 (n=245),

L55: %66 (n=158)

T(-107): %44 (n=239)

-Dansite gradienti içindeki dağılıma dikkatle bakıldığında, ne L55M ne de promoter polimorfizmin kaynağı dağılım paterni üzerinde etkilidir.

-homozigot R192 taşıyıcısındaki aktivite oranı, dansiteleri 1.063- 1.16 kg/L'deki fraksiyonlar içindeki wild tip alelinkinin sadece %43'ü ve en yüksek PON1 aktivitesindeki fraksiyon içindeki wild tip alelinkinden %25 daha yüksektir.

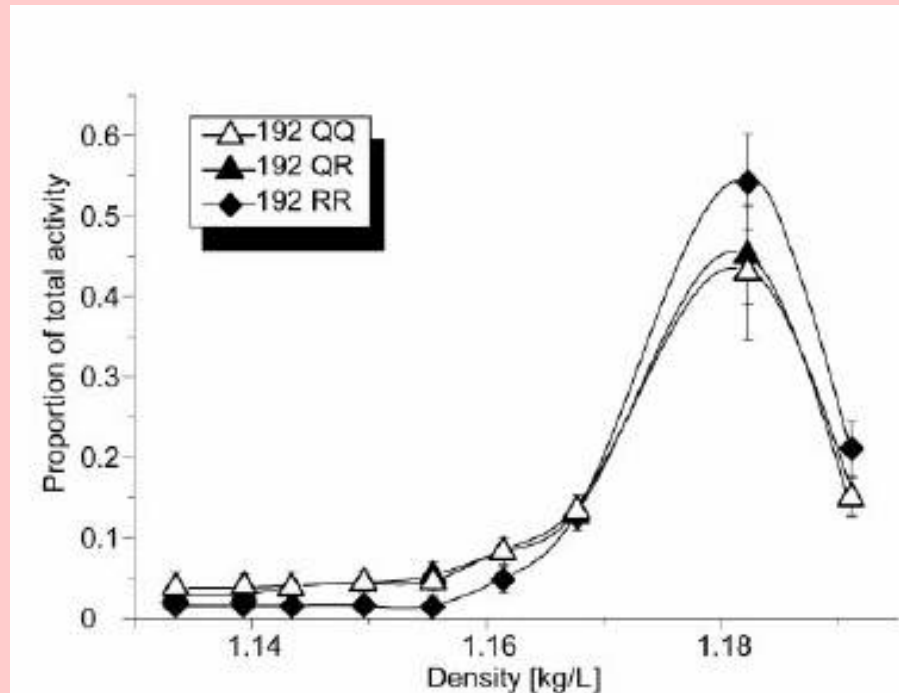


Fig. 5. Relationship between the density distributions of PON1 activity and Q192R polymorphism (filling density, $\rho = 1.1600$ kg/L; centrifugation for 22 h at 240 000g).

The *error bars* indicate the interindividual mean variation. The density ranges of the first and the last fraction are the same as in Fig. 3.

Molar apolipoprotein oranlarının dağılımı

-ApoA-IV miktarlarının oranı ile ,ApoA-II'ninkilerden sadece onda biri ihmal edilebilir. Lipoprotein (LP) A-II:A-II partikülleri, HDL sahası içinde nispeten azdır. Bu sebeple HDL içeriği esasen Lp A-I:A-I ve Lp A-I:A-II parçacıkları olarak farz edilir.

- ApoA-I ve ApoA-II sonuçlarının molar oranı için eğimin devamından dolayı HDL partikül sayısı ve partikül kompozisyonu dikkat çekmektedir. Daha kompleks Lp A-I;A-II partikülleri ile basit LpA-I;A-I partiküllerinin oranı yoğunluğun artmasıyla azalır.

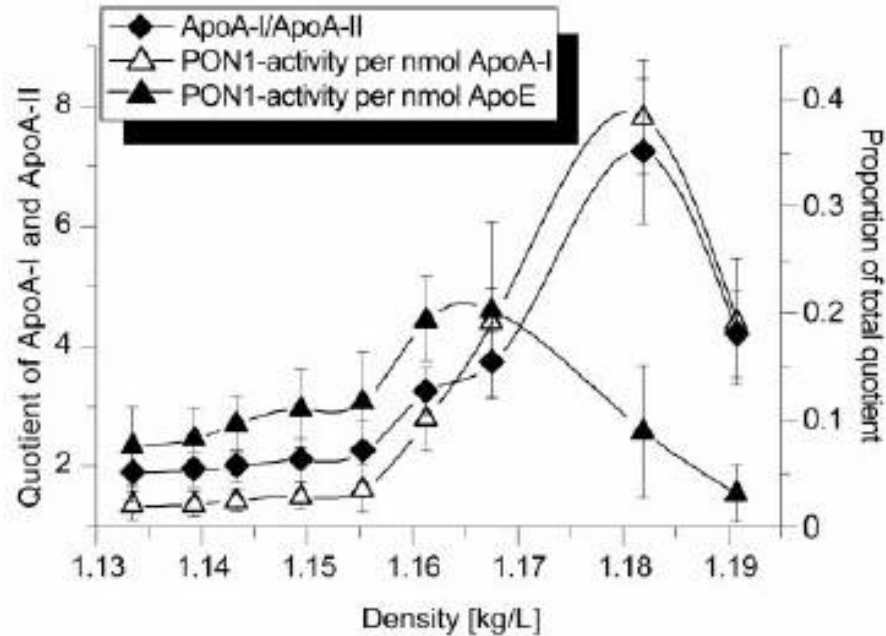


Fig. 6. Density distributions of the molar ApoA-I/ApoA-II ratio and the PON1 activity per nmol of ApoA-I and ApoE (filling density $\rho = 1.1600$ kg/L; centrifugation for 22 h at 240 000g).

The *error bars* indicate the interindividual mean variation. The density ranges of the first and the last fraction are the same as in Fig. 3.

ApoA-I, Apo A-II, Apo-E ve ApoJ için apolipoprotein miktarı ile PON1 aktivitesi oranının profili

-PON1 aktivitesi 1.18 kg/L'lik bir yoğunlukta maksimuma erişir.

- ApoA-I ünitesi başına total PON1 aktivitesinin maksimum değerine (%38'e) uymaktadır

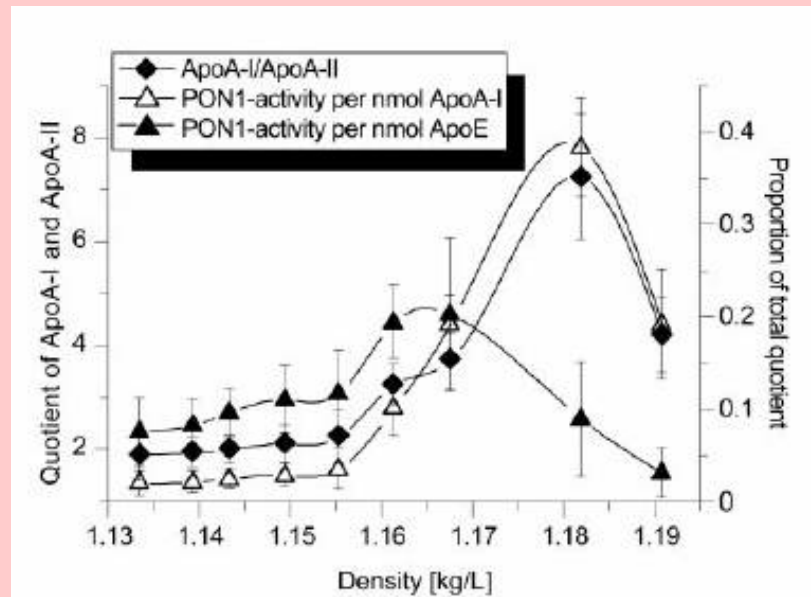


Fig. 6. Density distributions of the molar ApoA-I/ApoA-II ratio and the PON1 activity per nmol of ApoA-I and ApoE (filling density $\rho = 1.1600$ kg/L; centrifugation for 22 h at 240 000g).

The error bars indicate the interindividual mean variation. The density ranges of the first and the last fraction are the same as in Fig. 3.

-PON1/ApoA-I dağılım paterni ile karşılaştırılırsa, PON1/ApoA-II ninkinden daha az bir peak göstermiştir (veriler gösterilmemiştir).

-Bu çalışmadaki bulgular temelinde biz HDL partikülü başına PON1 aktivitesinin ünitesi olarak PON1 aktivitesi ekspresyonu aldık. En yüksek PON1 aktiviteli HDL fraksiyonunda, oran 14 ünite/nmol HDL partikülü ve son kısımda aktivite 7 ünite/partikül idi.

-En küçük yoğunluktaki HDL₃ kısımlarında ($\rho < 1.158$ kg/L) partikül başına aktivite 1 ünitenin altında idi (< 1 ünite). En yüksek PON 1 aktiviteli kısımda sonuçta partikül başına en yüksek spesifik aktivite gösterilmiştir.

- Her nmol ApoE başına PON1 aktivitenin profili, ApoE konsantrasyonu ve PON1 aktivitesi profillerinden oldukça farklıdır. En yüksek noktada (%20) yoğunluk spektrumunun sonunda değildir. Fakat kısıdan sonra orta olur ($\rho=1.1675$ kg/L).

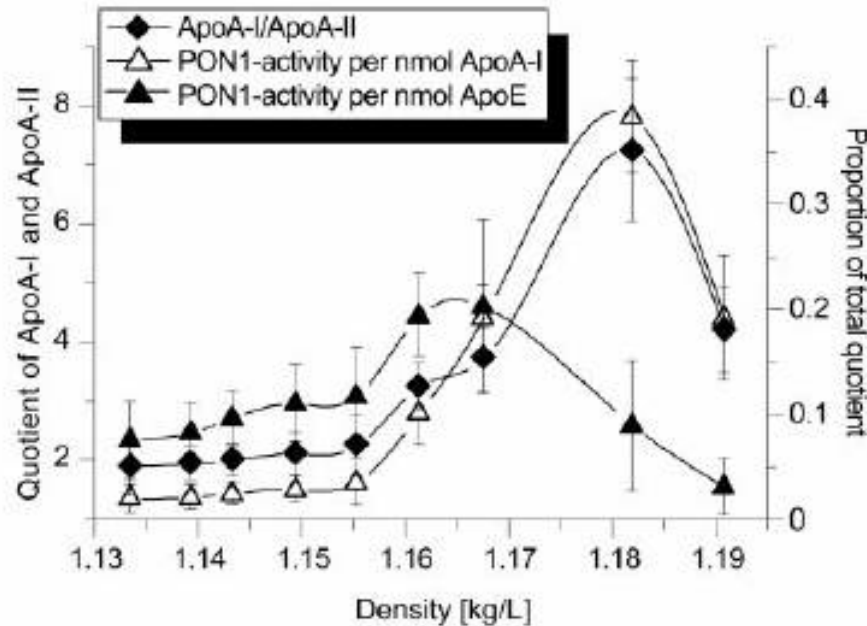


Fig. 6. Density distributions of the molar ApoA-I/ApoA-II ratio and the PON1 activity per nmol of ApoA-I and ApoE (filling density $\rho = 1.1600$ kg/L; centrifugation for 22 h at 240 000g).

The *error bars* indicate the interindividual mean variation. The density ranges of the first and the last fraction are the same as in Fig. 3.

- Her bir ApoJ nmol için PON1 aktivite değerleri gösterilemedi. Çünkü sadece son iki kısımda ApoJ tanımlanabilir konsantrasyonda idi. En yüksek PON1 aktiviteli kısımlarda, en yüksek ApoJ içeren kısımlardakinden 10 kez daha yüksek PON1 aktivitesi vardır.

TARTIŐMA

- Bu alıŐmadaki HDL fraksiyonları $\rho=1.063- 1.256$ kg/L dansite aralığında yayılmıŐtır.
- HDL₂ izole fraksiyon olarak elde edildiğinde bile, HDL₂ deki PON1 aktivitesi, HDL₃ ve VHDL nin sadece 1/25 i idi. Bu ilk araştırmalarda sonuçları saptamak Graham ve ark.ca rapor edilmiŐtır.
- Bununla beraber, HDL₃ in bir kısmında dűŐük PON1 aktivitesi içermesiyle, bu fraksiyon yűksek yoĐunlukta daha yűksek PON1 aktivitesi gűstermesiyle HDL₂ ye benzerlik vardır.

- HDL₂ ve HDL₃ deki PON1 aktivitesinin oranı üzerinde korunma koşullarının etkisi önemlidir.
- Tekrar dondurulma ile değerler 1/25 ile 1/200 artırılmıştır fakat tüm aktivitede görülebilir değişiklikler olmamıştır.
- Değişikliğe görünüşte depolama sırasında HDL₂ deki PON1 aktivitesinde bir düşme sebep olur.

- Değişik dansitelerde demonstre edilmiş solusyonların içindeki HDL₃ ve VHDL nin floating (yer değiştirme/ yüzeyde kalma, batmama) karakterleri üzerine araştırmalarda; sadece HDL₃ün ApoA-I asıl kısmı değil VHDL($\rho=1.256\text{kg/L}$) de aktif PON1 yüzeyde kalıp, floatasyonu meydana getirmektedir.
- HDL₃ için yoğunluk aralığında, PON1 aktivitesi ve Apo A-I konsantrasyonu arasında korelasyon yoktur, PON1 genellikle Apo A-I ile birlikte dir. PON1 aktivitesinin gösterildiği araştırmalarda, partiküllerden ayrıştırılmamıştır. 2 santrifugasyondan sonra aktivite kaybı ortalama %12.5 idi.

- Serum protein fraksiyonunda bu yüzden PON1 aktivitesi serbesttir,
- HDL deki önemli miktarda PON1 aktivitesinin ultrasantrifugasyonla ayrılma işlemiyle gösterildiği ve bu farklılık daha yüksek santrifugasyon kuvvetlerine atfedilebilir.

- Sorenson ve ark.na göre, HDL bağlamada PON1 aktivitesi önemli değildir, bu akılda tutulmalıdır,
- partiküllerin ayrışması uzanım peryotlarının üzerine kafi derecede yüksek güçler denendiği zaman ortaya çıkar.
- $\rho=1.256$ kg/L de santrifugasyon, PTA/MgCl₂ ile presipitasyon kombinasyonu pratikte uygulanabilir görünür ve HDL proteinleri hariç tüm plasma proteinleri elimine olur.

- En yüksek PON1 aktivitesi $\rho=1.1600\text{kg/L}$ de santrifugasyonla açığa çıkar.
- ilk fraksiyonlardaki Apo A-I ve kolesterolün yüksek oranları (HDL_2) daha düşük yoğunluktaki fraksiyonların kompresyonu ile izah edilebilir ve bu doyma yoğunluğunda 1.18 kg/L lik bir yoğunluktaki fraksiyonlar izole edilebilir.
- Bu fraksiyonlardaki diğer HDL apolipoproteinleri, değerlendirilen HDL partikülleriyle ölçülebildi.
- Molar Apo A-I/Apo A-II bölümlerinin dağılımı PON1 aktivitesinin dağılımına benzer bu yüzden PON1 aktif partiküllerinin daha düşük Apo A- II içeriğiyle tanımlanabileceği sonucuna vardık.

- En yüksek PON1 aktiviteli fraksiyonda, sadece Apo A-II içeriği en düşük değil Lp A-I:A-II meydana gelişi de minimumdur.
- çalışmadaki tüm Apo E ler HDL ye bağlanıp değişmeden kalmışlardı çünkü albumin fraksiyonunda Apo E bulunamamıştır.
- Apo E ve Apo J nin her ikisi de en yoğun HDL₃ ve VHDL partikülleriyle birlikte apolipoproteinler gibi düşünülebilir.

- **Apo J/ PON1** (aktivite, paraoxan kullanılmasıyla belirlenir) **oranının aterosklerozisin ortaya çıkışını önceden haber vermek için kolesterol / HDL kolesterol oranından daha uygun olabileceği rapor edilmiştir.**
- Bununla beraber, paraoksonaz aktivitesi içeren HDL partiküllerin tümü Apo J içermez.
- En yüksek PON1 aktiviteli fraksiyonlar, total HDL-Apo J nin sadece onda birini kapsar.
- Apo J den zengin HDL fraksiyonları total PON 1 aktivitesinin sadece %15 ne sahiptir.

- Q192 aleli dansite profili içinde geniş bir yayılma gösterdi.
- Bu surprizdi çünkü sadece L55M polimorfizminin PON1 aktivitesinin yayılımı üzerinde bir etkiye sahip olabileceği şüphesi vardı fakat L55M polimorfizminin PON1 aktivitesinin yayılımı üzerine etkisinin olmadığı gösterildi

- Leviev ve ark PON1 aktivitesi ve L55M polimorfizmi arasında bir ilişki bulmuşlardı.
- Dansite aralığındaki yayılımda %25 lik bir değişim Q192 R polimorfizmi için değişik bir stabiliteye işaret etmektedir ve bu "çok aktif" alel (R192)nin invivo olarak inhibe etmesi demek olacaktır.
- Üstelik çeşitli dansitelerde PON1 aktivitesinin yayılımı çalışmaları, ayrı tutulan ilerleyici (promoter) polimorfizme bağlı değildir çünkü polimorfizmi sadece enzim miktarı belirler.

Özetle;

- **PON1 aktivitesi, HDL₃ ve VHDL içinde daha yüksektir, bununla beraber maksimum aktivite $\rho=1.18$ kg/L dansiteli fraksiyonda ortaya çıkar**
- ApoA-II, HDL₂ ve HDL₃ içinde gösterilen bir proteindir.
- Apo E sadece daha yoğun HDL₃ ün bir componentidir. her 12 HDL partiküllerinden sadece 1'i Apo E taşır

- Apo J , sadece en yüksek dansiteye ve daha fazla miktarda protein içeriğine sahip HDL örneklerinde ortaya çıkar.
- Her 42 HDL partikülünden sadece biri, Apo J-taşıır

$\rho=1.18$ kg/L fraksiyon içindeki HDL ye gelince tespit edilen gerçekler

- a. En yüksek PON1 aktivitesini ve HDL partikülü başına en yüksek spesifik aktiviteyi gösterir.
- b. En düşük Apo A-II konsantrasyonuna ve en düşük sayıda Lp A-I:A-II partikül sayısına sahiptir.
- c. Apo E ve Apo J fraksiyon içeriği maksimum konsantrasyonlarda meydana getirilmemiştir. Buna karşın diğer fraksiyonlar, bu görünen yoğunluk aralığında genellikle değişmiş HDL partiküllerinin bir toplamını içerir

Sonuçta;

- PON1 aktivitesi ölçümü HDL₃' ün ultrasantrifugasyonu üzerine belirleyici basit bir alternatif değildir
- Fakat HDL nin farklı bölümlerini belirleme ve izole etmek için basit bir metoddur.