

Paraoksonaz geninde Leu-Met (55) ve Gln-Arg (192) polimorfizmleri ile koroner arter hastalığı arasındaki ilişki

The relationship between paraoxanase gene Leu-Met (55) and Gln-Arg (192) polymorphisms and coronary artery disease

Dr. Pınar Taşkiran,¹ Dr. Sırrı F. Çam,¹ Dr. Cevat Şekuri,² Dr. Nurullah Tüzün,³
Dr. Emin Alioğlu,³ Dr. Nuray Altıntaş,⁴ Dr. Afig Berdeli⁴

¹Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Manisa;

²Kent Hastanesi Kardiyoloji Bölümü, İzmir; ³Central Hospital Kardiyoloji Bölümü, İzmir;

⁴Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

Amaç: Paraoksonaz (PON1), lipit peroksitleri hidroliz eden, yüksek yoğunluklu lipoproteine bağlı bir esterazdır. PON1, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidatif modifikasyonuna karşı ve aterosklerotik süreçleri önlemede önemli bir rol oynamaktadır. PON1 geninde iki polimorfizm yaygın şekilde çalışılmıştır. Bunlar, 55. kodonda lösinin (L aleli) yerine metiyoninin (M aleli) geçmesi ve 192. kodonda glutaminin (Q aleli) yerine arjininin (R aleli) geçmesidir.

Çalışma planı: Çalışmada, erken koroner arter hastalığı (KAH) tanısı konan 120 hastada (92 erkek, 28 kadın; ort. yaş 48.2±4.3) ve KAH öyküsü olmayan ve elektrokardi-yografileri normal bulunan 102 sağlıklı bireyde (80 erkek, 22 kadın; ort. yaş 46.8±5.2) PON1 geninde 55 ve 192. kodonlardaki aminoasit değişiklikleri polimeraz zincir reaksiyonu ve kısıtlayıcı enzimler kullanılarak incelendi.

Bulgular: Hasta ve kontrol gruplarında PON 55 bölgesinde genotip dağılımı MM için sırasıyla %6.7 ve %4.9, LM için %46.7 ve %29.4, LL için ise %46.7 ve %65.7 bulundu. PON 192 bölgesinde ise genotip dağılımı şöyleydi: RR %4.2 ve %2, QR %40 ve %35.3, QQ %55.8 ve %62.8. PON 55 M alel frekansı hasta grubunda kontrollere göre daha fazla bulunurken (0.3 ve 0.2), 192 R alel frekansı kontrollerle farklılık göstermedi (0.2). PON1 M/L55 polimorfizmi ile KAH arasında anlamlı ilişki görüldü (p=0.017); R/Q192 polimorfizmi ile KAH arasında ise anlamlı ilişki bulunmadı (p=0.445).

Sonuç: Bulgularımız, PON 55 M/L polimorfizmi ile KAH arasında ilişki olduğunu, 192 R/Q polimorfizminin toplumumuzda KAH'ye yatkınlık sağlamada risk faktörü olmadığını göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Kolesterol, HDL/metabolizma; koroner arter hastalığı/enzimoloji/genetik; esteraz/genetik; genotip; paraokson/metabolizma; polimeraz zincir reaksiyonu; polimorfizm, genetik.

Objectives: Paraoxanase (PON1) is a high-density lipoprotein (HDL)-associated esterase that hydrolyses lipoperoxides. PON1 serves as a protective factor against oxidative modification of LDL, suggesting that it may play an important role in the prevention of atherosclerotic process. Research has focused on two polymorphisms: leucine (L allele) to methionine (M allele) substitution at codon 55, and glutamine (A allele) to arginine (B allele) substitution at codon 192.

Study design: We examined amino acid changes at codon 55 and 192 in the PON1 gene by polymerase chain reaction and using restriction enzymes in 120 patients (92 men, 28 women; mean age 48.2±4.3 years) with premature coronary artery disease (CAD) and in 102 healthy subjects (80 men, 22 women; mean age 46.8±5.2 years) with no history of CAD and a normal electrocardiogram.

Results: Distribution of genotypes in the patient and control groups at codon 55 were 6.7% and 4.9% for MM, 46.7% and 29.4% for LM, 46.7% and 65.7% for LL, respectively. The frequency of genotypes at codon 192 were as follows: 4.2% and 2% for RR, 40% and 35.3% for QR, and 55.8% and 62.8% for QQ, respectively. While the frequency of PON1 55M allele was higher in the CAD group (0.3 vs. 0.2), PON1 192R allele frequency did not differ (0.2). There was a significant relationship between the PON1 M/L55 polymorphism and CAD (p=0.017), whereas the R/Q192 polymorphism was not associated with CAD (p=0.445).

Conclusion: These data suggest that the PON1 M/L55 polymorphism shows a significant relationship with CAD and the R/Q192 polymorphism is not a major risk factor causing susceptibility to CAD in our population.

Key words: Cholesterol, HDL/metabolism; coronary artery disease/enzymology/genetics; esterases/genetics; genotype; paraoxon/metabolism; polymerase chain reaction; polymorphism, genetic.

Geliş tarihi: 29.07.2008 Kabul tarihi: 04.05.2009

Yazışma adresi: Dr. Nurullah Tüzün. Central Hospital Kardiyoloji Bölümü, 35580 Bayraklı, İzmir.
Tel: 0232 - 341 67 67 e-posta: nurullahtuzun@hotmail.com

Paraoksonaz (PON1) enzimi yüksek yoğunluklu lipoproteinlerde (HDL) bulunan, kalsiyuma bağımlı bir ester hidrolazdır.^[1] Karaciğerde sentezlenmektedir. Organik fosforlu bir insektisit olan parationun aktif metaboliti paraoksonu hidroliz etme özelliği vardır.^[2,3] İnsanlarda PON1 ayrıca böbrekler, beyin, kalp, ince bağırsak ve akciğerde de bulunmaktadır.^[4,5]

PON1 enzimi 43kDA molekül ağırlığında, 354 aminoasitten oluşan bir proteindir.^[6] PON1, kromozom 7q21.3-q22.1 bölgesinde bulunan gen tarafından kodlanmaktadır.^[7] PON1 geni, aynı kromozom üzerinde bulunan ve PON2 ile PON3'ün de yer aldığı bir multigen ailesinin üyesidir. PON1'in diğerlerinden farkı, N-terminalinde hidrofobik bir sinyal dizisinin bulunmasıdır.^[8]

PON'un başlıca iki fonksiyonu bulunmaktadır. Bunlar, bir pestisid olan paraokson gibi organofosfat bileşiklerin detoksifikasyonuna katılmak ve lipit peroksidlerini hidrolize ederek LDL'yi oksidasyondan korumaktır.^[9]

PON1'in enzimatik aktivitesi bireysel farklılıklar göstermektedir. HDL-kolesterol konsantrasyonunun çok düşük olduğu durumlarda, serum PON1 düzeyi de düşük gözlenir.^[8] Serum PON1 aktivitesinin, miyokart enfarktüsü, ailesel hiperkolesterolemi, balıkgözü hastalığı, Tangier hastalığı ve diabetes mellitus (DM) gibi ateroskleroz riskinin yüksek olduğu, lipit metabolizması ile ilgili hastalıklara yakalanan bireylerde düşük olduğu görülmüştür.^[10] PON1 aktivitesindeki değişimler bu enzimi kodlayan gen bölgesindeki polimorfizmler nedeniyledir.^[6]

PON1 geninin iki bölgesinde oluşan aminoasit değişiklikleri serum PON1 aktivitesini etkilemektedir. Bu bölgelerden 55. kodonda Leu → Met, 192. kodonda ise Gln → Arg değişimi meydana gelmektedir.^[8]

PON1, LDL lipit oksidasyon ürünlerinin birikimini ve kolesterol taşınmasına etki ederek periferik dokularda kolesterol birikimini önler.^[10] Bu özellikleri nedeniyle PON1 geninin, öncelikle koroner arter hastalığı (KAH) olmak üzere kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde rolü olduğu ileri sürülmektedir.^[11-13]

PON1 polimorfizmi ve KAH arasındaki ilişki üzerine birçok çalışma yapılmıştır.^[11,13-15] Bu çalışmalarda, aynı etnik nüfusta elde edilen bulgularda bile farklılıklar olduğu görülmüş; bu farklılık nedeniyle, genin çevreyle ve/veya genin genle etkileşiminin PON1 polimorfizmi ve KAH arasındaki ilişkiyi etkilediği ileri sürülmüştür.^[6,15,16] Yapılan çalışmalarda,

55 ve 192. kodonlardaki polimorfizmlerin KAH riski ile bağlantılı olduğu ileri sürülmektedir.^[11,12] Zama ve ark.^[13] PON1 192R alelinin ateroskleroz için bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir. Asyalı 200 bireyde yapılan benzer bir çalışmada, PON1 192R alel sıklığının KAH olanlarda daha yüksek olduğu bulunmuştur.^[17] PON1 55Leu polimorfizmi de DM'li 408 hastada çalışılmış ve KAH için bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir.^[18] Ülkemizde bu konuda yapılan bir çalışmada KAH ile Arg192Gln polimorfizmi arasında negatif ilişki saptanmıştır.^[19]

Bu çalışmada, KAH ile PON1 Leu55Met ve Gln192Arg polimorfizimleri arasındaki ilişki incelendi.

HASTALAR VE YÖNTEMLER

Çalışmada, Kardiyoloji polikliniğine başvuran ve erken KAH tanısı konan 120 hasta ile özgeçmişinde KAH öyküsü olmayan, rutin laboratuvar incelemeleri ve elektrokardiyografileri normal bulunan 102 sağlıklı birey (kontrol grubu) incelendi. Erkeklerde 55 yaş ve altında, kadınlarda ise 65 yaş ve altında olan olgularda, anjiyografide ana koroner arter ya da dallarından birinde en az %50 darlık bulunması erken KAH olarak kabul edildi. Koroner anjiyografi Judkins tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Miyokart enfarktüsü tanısı, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ölçütlerine uygun olarak, semptomlar, kardiyak enzimlerin yüksekliği ve elektrokardiyografik değişikliklere göre kondu. Hastalar çalışma hakkında bilgilendirildi ve çalışma için etik kurul onayı alındı.

Hastalar, DM, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve sigara gibi koroner risk faktörleri açısından değerlendirildi. Trigliserit, total kolesterol, HDL- ve LDL-kolesterol değerleri klasik biyokimyasal yöntemlerle ölçüldü. Arteriyel hipertansiyon, birden çok ölçümde sistolik basıncın ≥ 140 mmHg ve/veya diyastolik basıncın ≥ 90 mmHg bulunması olarak kabul edildi. Diyabet öyküsü olanlar ya da başlangıç glukoz değeri ≥ 120 mgr/dl olanlar DM'li olarak değerlendirildi. Sigara içen ve içmeyenler belirlendi. Beden kitle indeksi ≥ 25 kg/m² olanlar kilolu olarak değerlendirildi. Hasta ve kontrollerle yapılan görüşmelerde KAH aile öyküleri araştırıldı.

Doğuştan kalp hastalığı, kardiyomiyopati, kalp kapağı hastalığı, böbrek veya karaciğer hastalığı olanlar ve steroid kullanan ve aşırı alkol kullanan olgular çalışmaya alınmadı.

Genetik analiz. Hastaların önkoldan alınan periferik venöz kanları K2 EDTA'lı hemogram tüplerinde

Tablo 1. Hasta ve kontrol gruplarında demografik özellikler ve risk faktörleri

	Hasta (n=120)			Kontrol (n=102)			p
	Sayı	Yüzde	Ort.±SS	Sayı	Yüzde	Ort.±SS	
Yaş			48.2±4.3			46.8±5.2	>0.05
Cinsiyet							>0.05
Erkek	92	76.7		80	78.4		
Kadın	28	23.3		22	21.6		
Beden kütle indeksi (kg/m ²)			27.1±1.8			23.9±2.2	0.01
Diabetes mellitus	45	37.5		3	2.9		0.01
Aile öyküsü (Koroner arter hastalığı)	50	41.7		12	11.8		0.01
Hipertansiyon	45	37.5		15	14.7		0.01
Sigara içenler	78	65.0		37	36.3		0.01
Total kolesterol (mgr/dl)			205.6±31.3			178.3±22.6	0.01
HDL-kolesterol (mgr/dl)			40.7±3.1			43.4±3.8	0.024
LDL-kolesterol (mgr/dl)			131.5±24.2			121.6±25.2	0.039
Trigliserit (mgr/dl)			179.8±71.2			156.2±49.4	0.001
Tekdamar hastalığı	44	36.7		–			
Çokdamar hastalığı	65	54.2		–			

toplandı. NucleoSpin DNA izolasyon kiti kullanılarak, EDTA'lı tüpe alınan 1 ml periferik kandan 200 µl alınarak genomik DNA elde edildi. Elde edilen DNA örnekleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak amplifiye edildi. Amplifikasyonda şu primerler kullanıldı:

PON 192 Q/R polimorfizmi için:

5'-TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3' (forward),
5'-CACGCTAAACCCAAATACATCTC-3' (reverse),

PON 55 L/M polimorfizmi için:

5'-GAAGAGTGAATAGCCCCAG-3' (forward),
5'-TTTAATCCAGAGCTAATGAAAGCC-3' (reverse)^[20,21]

Reaksiyon için 25 µl hacimde PZR karışımı hazırlandı. Karışım için 2.5 µl 10xPZR tamponu, 10 µM dNTP karışımı, 10 pmol/µl primer, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi, 1.0 µl DNA kalıbı ve ddH₂O kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu, 95 °C'de 5 dakika, 95 °C'de 40 saniye, 61 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 1 dakika (35 siklus), 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde, ısı döngüleyici kullanılarak gerçekleştirildi.

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerine 192 Q/R polimorfizmi için Alw I, 55 L/M polimorfizmi için Nla III kısıtlayıcı enzimleri kullanıldı. Kesim ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek ultraviyole altında görüntüledi.

İstatistiksel değerlendirme. İstatistiksel incelemeler SPSS 10.0 sürümü kullanılarak gerçekleştirildi. Değişkenler, ortalama±standart sapma (SD) olarak ifade edildi. P değeri için anlamlılık düzeyi ≤0.05 olarak kabul edildi. Tekdeğişkenli analizler, ki-kare

testi ve Mann-Whitney U-testi kullanılarak yapıldı. Genotip dağılımı için Hardy-Weinberg eşitliği ki-kare testi ile belirlendi.

BULGULAR

Hasta (%76.7) ve kontrol grubunun (%78.4) büyük çoğunluğu erkeklerden oluşmaktaydı. Aile öyküsü, hipertansiyon, DM, sigara, aşırı kilo, yüksek total kolesterol, LDL-kolesterol ve trigliserit sıklığının KAH grubunda daha fazla olduğu gözlemlendi (Tablo 1).

Hasta ve kontrollere ait PON 55 M/L ve 192 R/Q genotipleri ve frekansları Tablo 2'de gösterildi. Hasta grubunda PON 55 bölgesinde M homozigotların oranı %6.7, L homozigotların oranı %46.7, ML heterozigotların oranı ise %46.7 idi. PON 192 bölgesinde R homozigotların oranı %4.2, Q homozigotların oranı %55.8 ve RQ heterozigotların oranı %40 bulundu. PON 55 M alel frekansının hastalarda (0.3), kontrollere (0.2) göre daha fazla bulunması, PON 55 M/L polimorfizmi ile KAH arasında anlamlı bir ilişki olduğunu gösterdi ($\chi^2=8.131$, $p=0.017$). Hastalarda 192 R alel frekansı bir miktar artmış bulunsada da (0.2), PON 192 R/Q polimorfizmi ile KAH arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($\chi^2=1.620$, $p=0.445$).

TARTIŞMA

Koroner arter hastalığı, gelişmiş ülkelerde çevresel ve genetik faktörlerin birleşimi sonucu oluşan karmaşık bir hastalıktır. Epidemiyolojik çalışmalarda KAH için birçok risk faktörü saptanmıştır. Bu risk faktörlerinden olan 'düşük HDL-kolesterol' düzeyi, en önemli risk faktörü olarak ön plana çıkmaktadır.^[22] HDL-kolesteroldeki her %1'lik azalma, KAH riskini

Tablo 2. Hasta ve kontrol gruplarında PON1 genotip dağılımı

	Hasta (n=120)		Kontrol (n=102)		p
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	
PON1 55 L/M genotipleri					
LL	56	46.7	67	65.7	
LM	56	46.7	30	29.4	
MM	8	6.7	5	4.9	
PON1 55 L/M frekansı	0.7/0.3		0.8/0.2		0.017
PON1 192 Q/R genotipleri					
QQ	67	55.8	64	62.8	
QR	48	40.0	36	35.3	
RR	5	4.2	2	2.0	
PON1 192 Q/R frekansı	0.8/0.2		0.8/0.2		0.445

%2-3 artırmaktadır.^[23] Bundan dolayı, koruyucu bir etkiye sahip olan HDL-kolesterol ile ilgili mekanizmalar yoğun bir şekilde araştırılmıştır.

Serum paraoksonaz enzimi HDL'ye bağlı bir enzim olarak HDL'nin antioksidatif özelliğinden sorumludur. PON1 birçok organofosfat bileşiğini hidroliz edebilmektedir. *In vitro* çalışmalarda, HDL-bağımlı PON1'in LDL oksidasyonunu önlediği ve okside LDL'deki biyolojik olarak aktif olan lipitleri parçaladığı gösterilmiştir.^[24] PON1 ayrıca, normal arter duvarında da bulunmakta ve aterosklerotik süreçte konsantrasyonları giderek artmaktadır. Aviram ve ark.^[25] PON1'in, koroner arter ya da karotisten alınan aterosklerotik lezyonlarda okside olmuş lipitleri azaltma kapasitesine sahip olduğunu göstermişlerdir.

PON1 enzimini kodlayan gen olan PON1, başlıca iki önemli polimorfizm içermektedir. Bunlar, 55. pozisyonda leusin (Leu-L) yerine metiyonin'in (Met-M) yer aldığı 55 L/M polimorfizmi ile 192. pozisyonda glutamin (Gln-Q) yerine arjinin'in (Arg-R) yer aldığı 192 Q/R polimorfizmidir. 192 Q/R polimorfizminde, Gln aeline sahip kişilerde, Arg aelinesi taşıyanlara göre daha düşük PON1 enzim aktivitesi gözlenmektedir.^[20,26] 55 L/M polimorfizminde ise, MM homozigot bireylerde, LL homozigotlara kıyasla paraoksone karşı daha düşük PON1 aktivitesi bulunmaktadır.^[27]

PON1'in *in vitro* ve *in vivo* LDL oksidasyonunu önlemesi, ayrıca PON1'i kodlayan PON1 genindeki polimorfizmlerin serum aktivitelerine olan etkisi nedeniyle, PON1 enziminin KAH'yi oluşturan bağımsız bir risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür.^[8] PON1 enzimini kodlayan genlerdeki polimorfizmlerin KAH riski ile ilişkili olup olmadığı konusunda farklı görüşler vardır. Çalışmaların bir kısmında olumlu bir ilişki saptanırken, bazılarında herhangi bir ilişki ortaya konmamıştır.^[11,12,28] Bu ilişkili sonuçlar, incelenen

nüfus, diyet alışkanlıkları, çevresel faktörler ve çalışma tipindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

PON1 192 R polimorfizminin Q polimorfizmine göre KAH ile daha çok ilişkili olduğunu ileri süren birçok olgu-kontrol çalışması bulunmaktadır.^[4-6] Bu çalışmaların bazılarında PON1 R aelinin, DM, sigara ve yaş gibi diğer KAH risk faktörlerine karşı yatkınlığı artırdığı ileri sürülmektedir. Bazı çalışmalarda ise 192 R polimorfizmi ile KAH arasında herhangi bir ilişki gösterilmemiştir.^[29,30] PON1 55 L alloenzimi de M alloenzimine göre LDL oksidasyonunu önlemede daha fazla etkilidir. PON1 55 polimorfizmi ile ilgili yapılmış olgu-kontrol çalışmalarında PON1 55 L aleli ile ateroskleroz arasında ilişki saptanmamıştır.^[31]

Çalışmamızda KAH, PON 55 L/M polimorfizmi ile ilişkili bulunurken, 192 Q/R polimorfizmi ile ilişkili bulunmamıştır. Türk toplumunda yapılan bir başka çalışmada da, çalışmamıza benzer şekilde, KAH ile PON 192 R/Q polimorfizmi arasında anlamlı ilişki gözlenmemiştir. Anılan çalışmada Gaziantep'te KAH'li 96 hasta incelenmiş ve R alel frekansı %38.5, kontrollerde ise %31 bulunmuştur.^[19] Aynacıoğlu ve ark.^[32] tarafından Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde 381 sağlıklı Türk üzerinde yapılan bir çalışmada ise PON 192 ve 55 polimorfizmlerine ait genotip dağılımı QQ 0.49, QR 0.40, RR 0.11 ve LL 0.52, LM 0.39, MM 0.09 şeklinde bulunmuştur. Elde edilen sonuçlardaki bu farklılık, birinci olarak olgu-kontrol çalışmalarında örnek seçiminde gözlenen değişikliklerden kaynaklanabilir. İkinci olarak ise etnik gruplar ve hatta bireyler arasındaki farklılıktan olabilir. Gen polimorfizmlerinde bulunan etnik farklılıklar nedeniyle, her bir etnik altgruptaki yüksek veya düşük riskli bütün bireylerde, KAH ile ilgili olabilen polimorfizmlerin araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada bazı kısıtlamalar bulunmaktadır. Bunlardan birincisi enzim aktivitesinin ölçüle-

miş olmasıdır. Özellikle heterozigot olgularda enzim düzeyleri, yani fenotipik görünüm değişiklik göstermekte, ayrıca sigara kullanımı ve DM PON1 aktivasyon düzeyini etkilemektedir. İkincisi ise, olgu sayısının sınırlı olmasıdır. Üçüncü kısıtlama da RR ve MM aleli taşıyan birey sayılarının az olmasıdır. Koroner arter hastalığı ile bu polimorfizmler arasındaki ilişkiyi doğrulamak için daha büyük örnek sayılarına sahip araştırmaların planlanması uygun olacaktır. Çalışmamızın bu kısıtlılıklarına rağmen, toplumlar arasında ve içinde çok büyük varyasyonlar gösteren polimorfik yapıların incelendiği her çalışmanın, bir toplumdaki genel bilgi birikimine sağlayacağı katkı ortadadır. Ayrıca, multigenik ve kompleks bir hastalık olan KAH'de etkili olan gen bölgelerinin çeşitliliği göz önüne alındığında, yapılan çalışmaların değeri bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Böylece, biriken bu bilgiler, büyük bir halk sağlığı sorunu olan KAH'nin tanı ve tedavisi ile risk altındaki bireylere erken safhada önlem alınabilme ortamı sunabilecektir.

Sonuç olarak bulgularımız, PON 55 L/M polimorfizmi ile KAH arasında anlamlı ilişki olduğu, 192 Q/R polimorfizmi ile KAH arasında ilişki olmadığı yönündedir. Bu sonuç, PON 55 L/M polimorfizminin KAH gelişiminde risk faktörü olarak değerlendirilmesinin uygun olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Antikainen M, Murtomäki S, Syväne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhiainen M, et al. The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest* 1996;98:883-5.
2. Juretić D, Tadijanović M, Rekić B, Simeon-Rudolf V, Reiner E, Baricić M. Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study. *Croat Med J* 2001;42:146-50.
3. Li WF, Furlong CE, Costa LG. Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett* 1995; 76:219-26.
4. La Du BN, Adkins S, Kuo CL, Lipsig D. Studies on human serum paraoxonase/arylesterase. *Chem Biol Interact* 1993;87:25-34.
5. La Du BN. Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nat Med* 1996;2:1186-7.
6. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:473-80.
7. Motti C, Dessì M, Gnasso A, Irace C, Indigeno P, Angelucci CB, et al. A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis* 2001;158:35-40.
8. Aviram M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Mol Med Today* 1999; 5:381-6.
9. Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995;115:243-53.
10. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1067-73.
11. Ruiz J, Blanché H, James RW, Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, et al. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995;346:869-72.
12. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995;96:3005-8.
13. Zama T, Murata M, Matsubara Y, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, et al. A 192Arg variant of the human paraoxonase (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3565-9.
14. Suehiro T, Nakauchi Y, Yamamoto M, Arai K, Itoh H, Hamashige N, et al. Paraoxonase gene polymorphism in Japanese subjects with coronary heart disease. *Int J Cardiol* 1996;57:69-73.
15. Imai Y, Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, Kato N, Ebihara A, et al. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 2000;149:435-42.
16. Saha N, Roy AC, Teo SH, Tay JS, Ratnam SS. Influence of serum paraoxonase polymorphism on serum lipids and apolipoproteins. *Clin Genet* 1991;40:277-82.
17. Pati N, Pati U. Paraoxonase gene polymorphism and coronary artery disease in Indian subjects. *Int J Cardiol* 1998;66:165-8.
18. Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanché H, Passa P, Froguel P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 1997;99:62-6.
19. Aynacıoğlu AS, Kepekçi Y. The human paraoxonase Gln-Arg192 (Q/R) polymorphism in Turkish patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2000;74:33-7.
20. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993;3:73-6.
21. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol* 1998;31:329-36.
22. Castelli WP. Lipids, risk factors and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* 1996;124 Suppl:S1-9.
23. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD,

- Castelli WP, Knoke JD, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989;79:8-15.
24. Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, et al. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;95:774-82.
25. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 2000; 101:2510-7.
26. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993;52:598-608.
27. McElveen J, Mackness MI, Colley CM, Peard T, Warner S, Walker CH. Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem* 1986;32:671-3.
28. Qin Q, Li YL, Zhao FM, Wang H, Li Y, Cui RZ, et al. Association of paraoxonase polymorphisms and serum homocysteine thiolactone complex with coronary heart disease. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2006;34:803-7. [Abstract]
29. Sentí M, Tomás M, Vila J, Marrugat J, Elosua R, Sala J, et al. Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase1 gene: the REGICOR study. *Atherosclerosis* 2001; 156:443-9.
30. Herrmann SM, Blanc H, Poirier O, Arveiler D, Luc G, Evans A, et al. The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. *Atherosclerosis* 1996; 126:299-303.
31. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 1998;62:36-44.
32. Aynacıoğlu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Nacak M, Tapanyigit EE, Roots I. Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 157:174-7.