

## Paraoxonáza a ateroskleróza

Ďuračková Z., Andrezálová L.

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK v Bratislave

### SÚHRN

Srdcovo-cievne ochorenia patria medzi vážne príčiny úmrtia ľudí. Ateroskleróza a oxidačne modifikované lipoproteíny výraznou mierou prispievajú k patológii týchto ochorení. Významnú úlohu v antiaterogénnych procesoch hrajú HDL-lipoproteíny a s nimi asociované enzýmy, najmä paraoxonáza.

Živočíšne paraoxonázy (PON1, PON2 a PON3) sú rodinou významných hydroláz závislých od  $\text{Ca}^{2+}$  a aktívnych voči celému radu rôznych substrátov. Aj keď skutočný fyziologický substrát pre jednotlivé PON sa nepozná, v súčasnosti sa považujú za významné substráty laktóny, niektoré oxidované fosfolipidy, produkty oxidácie kyseliny arachidónovej a dokozahexaénovej ako aj laktóny odvodené od N-acetyl-homoserínu. Všetky PON sa pokladajú za enzýmy s významnou antiaterogénnou aktivitou. Ich aktivity sa stanovujú voči rôznym substrátom, pričom arylesterázová aktivita PON1 sa považuje za smerodatnejší ukazovateľ antiaterogénnej aktivity ako paraoxonázová aktivita PON1. Laktonázová aktivita je pravdepodobne bližšie k fyziologickému substrátu ako paraoxon, či fenylacetát.

*Kľúčové slová:* paraoxonáza, HDL, LDL, ateroskleróza.

### SUMMARY

#### Ďuračková Z., Andrezálová L.: Paraoxonase and atherosclerosis

Cardiovascular diseases (CV) are one of the most important mortal diseases. Atherosclerosis and oxidatively modified lipoproteins are main risk factors that contribute to the pathology of CV diseases. HDL as well as HDL-associated enzyme paraoxonase play an important role in the antiatherogenic processes. Mammalian paraoxonases (PON1, PON2 and PON3) are a unique family of calcium dependent hydrolases, with enzymatic activity towards a broad range of substrates. Although PONs physiological substrates have not been identified yet, some studies suggest some lactones, or some specific oxidized phospholipids, or products of oxidation of arachidonic and docosahexaenoic acid as well as N-acyl-homoserine lactones to be suitable substrates for the enzyme. All three members of the PON family were shown to protect from atherosclerosis development. Their biological activities are determined towards different substrates and arylesterase activity is more decisive indicator of antiatherogenic activity than paraoxonase activity. However structure-reactivity studies indicate that lactonase activity of PON1 is its native activity.

*Key words:* paraoxonase, HDL, LDL, atherosclerosis.

## Úvod

V Európe zomiera na kardiovaskulárne ochorenia každý rok vyše 2 milióny ľudí. Na Slovensku sú srdcovo-cievne ochorenia príčinou až 55 % všetkých úmrtí. Napríklad v roku 2005 zomrelo na kardiovaskulárne ochorenia 23 084 ľudí, čo predstavuje jedno malé mestečko. Jednou z hlavných príčin kardiovaskulárnych ochorení je ateroskleróza. Následkom aterosklerotických zmien na vencovitých tepnách srdca dochádza k vzniku ischemickej choroby srdca s jej prejavmi ako **angína pectoris** a **infarkt myokardu**. Ak sú aterosklerózou postihnuté tepny zásobujúce krvou mozog, môže vzniknúť prechodné nedokrvenie mozgu alebo náhla **cievna mozgová príhoda**. Z toho dôvodu štúdium a poznanie procesov aterogenézy a možností ochrany pred týmito a súvisiacimi procesmi je veľmi potrebné.

## Aterogenéza

V procese aterogenézy hrajú kľúčovú úlohu oxidačne modifikované lipoproteíny. Poznanie procesov aterogenézy umožní hľadanie terapeutických prístupov na jej zmiernenie a prípadné zastavenie vzniku aterosklerózy [1, 2].

Aterogénne procesy ovplyvňuje funkcia lipoproteínov. LDL-lipoproteíny zabezpečujú transport

cholesterolu z pečene do periférie. Cholesterol, ak je v nadbytku, sa môže ukladať do cievnych stien buď voľný, alebo esterifikovaný. Masné kyseliny viazané na cholesterol sa môžu oxidačne poškodiť a modifikovať tak LDL (ox-LDL). Tieto rozoznávajú odprátavacie receptory makrofágov (CD 36) a ox-LDL sa týmto spôsobom v nich hromadia. Tento proces je základom pre tvorbu „penových buniek“ a aterogenity.

Opačnú funkciu majú HDL-lipoproteíny, ktoré zabezpečujú spätný transport cholesterolu z periférie do pečene, kde sa cholesterol metabolizuje. Takýto bezpečný transport cholesterolu a jeho esterifikovanej formy zabezpečuje niekoľko významných systémov a enzýmov asociovaných s HDL-lipoproteínmi, čím sa uplatňuje antiaterogénna funkcia HDL [3]. Acetylhydroláza faktoru aktivujúceho doštičky (Platelet-activating factor acetylhydrolase, PAF-AH) je fosfolipáza asociovaná s HDL-lipoproteínmi, ktorá hydrolyzuje faktor aktivujúci doštičky (PAF) a oxidované fosfolipidy (ox-FL) v oxidovaných LDL (ox-LDL). LCAT – lecitín-cholesterolacyltransferáza je hlavný enzým zodpovedný za esterifikáciu voľného cholesterolu v cirkulujúcich lipoproteínoch. S HDL je spojená aj paraoxonáza (PON1), ktorá v oxidovaných fosfolipidoch (ox-FL) LDL lipoproteínov hydrolyzuje oxidované polynenasýtené masné kyseliny (polyunsaturated fatty acids, ox-PUFA) [4].

V ostatných rokoch sa veľa diskutuje o postavení antioxidantných enzýmov v procesoch aterosklerózy,

špeciálne o enzýmoch patriacich do rodiny enzýmov – paraoxonáz (PON), do ktorej radíme PON1, PON2 a PON3 [3, 5].

## Paraoxonáza

Paraoxonáza je enzým, ktorý je v popredí záujmu výskumníkov nielen z oblasti oxidačného stresu a anti-oxidantov a toxikológie, ale aj kardiológie či angiológie. PON je známa tiež pod menami organofosfáthydroláza, A-esteráza, aryltrifosfatáza, organofosfáteteráza a inými. Má systémový názov aryltrifosfátialkylfosfohydroláza (E.C. 3.1.8.1). V minulosti sa tiež označovala ako arylesteráza so systémovým číslom E.C. 3.1.1.2.

Genetická rodina paraoxonáz (PON) obsahuje tri izoenzýmy: PON1, PON2 a PON3, ktoré majú kódovanú štruktúru na dlhom ramene chromozómu 7 [3]. Všetky PON majú veľmi podobné nukleotidové aj aminokyselinové zloženie. Avšak ich miesto tvorby, miesto pôsobenia a aktivita voči rôznym substrátom je rozdielna (tab. 1). Najstaršia je pravdepodobne PON2, najmladšia PON3 a najštudovanejšia je PON1. Všetky PON sú aktívne hydrolázy rôznych laktónov, prípadne tiolaktónov, takže správnejší názov pre paraoxonázy by mal byť „laktónázy“. Okrem laktónov, aj ďalšie substráty, napr. oxidované lipidy, podliehajú hydrolytickému rozkladu účinkom paraoxonáz. PON1 však rozkladá aj organofosfáty, ako napr. paraoxon (vzniká v organizme metabolickou premenou insekticídu parationu), alebo diazoxon vznikajúci z diazinonu, alebo aromatické estery, napr. fenylacetát. Na základe rozkladu neurotoxického organofosfátu tento enzým dostal svoje pomenovanie – paraoxonáza.

PON1 je  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentná fosfotriesteráza. Je to glykoproteín, ktorý sa skladá z 354 aminokyselín v dvoch proteínových podjednotkách prevažne v  $\beta$ -štruktúre, stabilizovaných disulfidovou väzbou medzi dvomi jednotkami cysteínu na pozícii 41 a 352. Molekulová hmotnosť PON1 je 43 kD. Každá podjednotka má dve väzbové miesta pre ión  $\text{Ca}^{2+}$ , ktorý má stabilizujúcu funkciu (obr. 1).

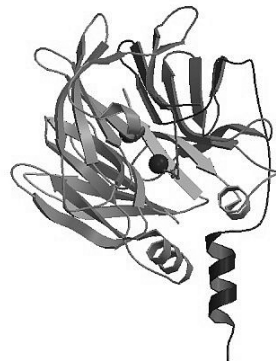


Fig. 1. The structure of PON1 (According to Harel et al. [9])

PON1 vykazuje dva hlavné polymorfizmy (obr. 2) – M/L55 (metionín za leucín) a Q/R192 (glutamín za arginín). Oba polymorfizmy sa spájajú s viacerými patofyziologickými podmienkami. M/L55 sa spája s mozgovými príhodami, koronárnymi chorobami, Parkinsonovou chorobou, rozdielmi v hladinách celkového cholesterolu a LDL-cholesterolu a v rozdielnej hladine PON1 proteínu aj jeho aktivity proti paraoxonu. Polymorfizmus Q/R192 ovplyvňuje rýchlosť hydrolýzy proti rôznym substrátom, ako paraoxon, diazoxon, soman a sarin. Hydrolýza fenylacetátu však od polymorfizmu Q/R závislá nie je. Okrem

Table 1. Basic characteristic of paraoxonases

| PON                             | MW     | Sub-units | Poly-morphisms                      | Antiox. properties                  | Formation / occurrence                           | Activity   | Comment   |
|---------------------------------|--------|-----------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|--|---|
| <b>PON1</b><br>the best studied | 43–45* | 2         | M/L 55<br>Q/R 192<br>IsoLeu/Val 102 | Protection of LDL against oxidation | Liver/HDL<br>VLDL<br>Chilomicrons in circulation | Hydrolysis – organophosphates (paraoxonase act.)<br>– aromatic esters (arylesterase act.)<br>– lactones (lactonase act.) | PON1 is inhibited by OS   |
| <b>PON2</b><br>the oldest       | 44     |           | A/G 148<br>C/S 311                  | Intracellular                       | Intracellular in many organs                     | Lactonase activity (N acetylhomoserine lacton)   | PON2 is stimulated by OS  |
| <b>PON3</b><br>the youngest     | 44     |           | S/T 311<br>G/D 324                  | 100x stronger than PON1             | Liver, kidney/ HDL in circulation                | Lactonase (aromatic, 5-6-membered lactones, drugs – lovastatin)  | PON3 is inhibited by OS<br>Species differences in quantity and activity |

MW – molecular weight (\*according to the literature source), OS – oxidative stress, HDL – high density lipoprotein, VLDL – very low density lipoprotein, M/L – methionine to leucine, Q/R – glutamine to arginine, A/G – alanine to glycine, C/S – cysteine to serine, S/T serine to threonine, G/D – glycine to aspartic acid substitution

toho vykazuje podobné asociácie ako polymorfizmus M/L55 [6]. Nedávno sa zistil ďalší polymorfizmus na 102 pozícii (izoleucín za valín), ktorý sa spája so zvýšeným rizikom výskytu rakoviny prostaty u fínskych mužov [7]. Otáznou sa stáva funkcia aminokyseliny cysteínu na pozícii 284 PON1. Niektoré práce predpokladajú jej antioxidantnú účasť na ochrane LDL lipoproteínov pred oxidáciou [8], iné túto aktivitu popierajú [9].

liny trihydrogénfosforečnej, ako insekticíd paration, diazinon a neurotoxíny sarin a soman. Okrem toho PON 1 hydrolyzuje aromatické estery, napr. fenylacetát. Posledne menovaný spolu s paraoxonom sú najčastejšie používané substráty pri stanovení aktivity enzýmu. PON1 štiepi hydrolyticky paraoxon (obr. 3) na analyticky detegovateľný p-nitrofenol a podobne fenylacetát na fenol.

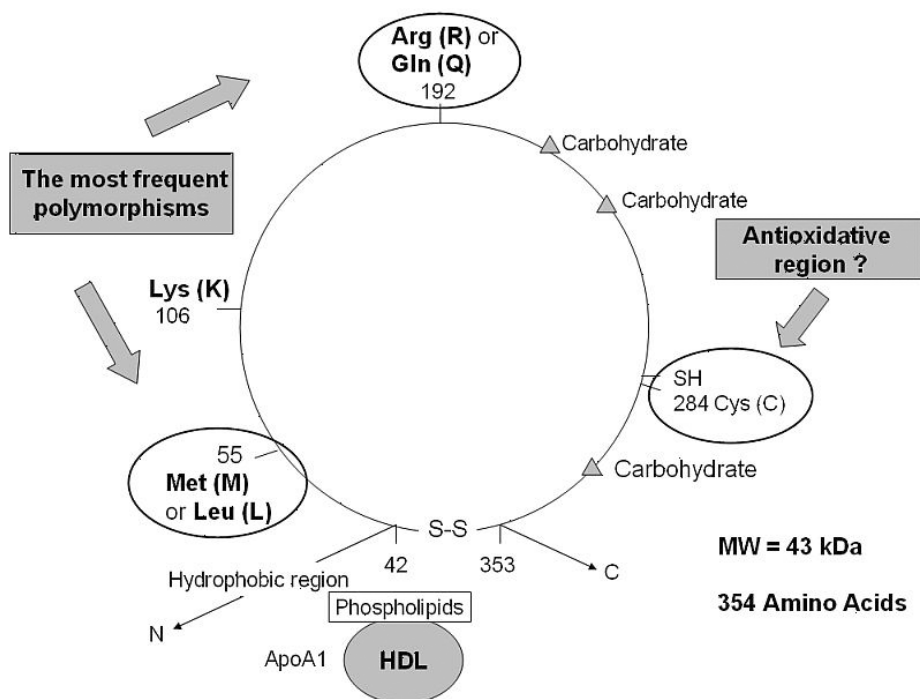


Fig. 2. PON1 polymorphisms

PON1 aktivita daná fenotypom je významnejším ukazovateľom rizika aterosklerozy a antioxidantných vlastností PON1 ako jej genotyp daný polymorfizmom.

### Aktivita PON

Aktivitu PON prvýkrát stanovil Mazur [10] ako schopnosť tkanív a séra hydrolyzovať organofosfáty. Esterázová aktivita sa definovala v dvoch podtriedach: A-esterázová aktivita zahrňujúca PON nie je inhibovaná organofosfátmi, a preto ich môže hydrolyzovať; B-esterázová aktivita blízka acetylcholinesteráze je naopak organofosfátmi inaktivovaná.

Medzi vysoko toxické deriváty organofosfátov, ktoré môže PON hydrolyzovať, patria triestery kyseliny

Pri použití paraoxonu sa aktivita definuje ako *para-oxonázová aktivita PON* a pri použití fenylacetátu ako *arylesterázová aktivita PON*. Aktívne centrá pre obe aktivity sú umiestnené na rovnakej podjednotke [11]. Aktivita PON voči paraoxonu, ale nie voči fenylacetátu, vykazuje vysokú (10–40-násobnú) interindividuálnu variabilitu medzi jedincami.

V nedávnej minulosti sa zistilo, že všetky tri PON majú schopnosť hydrolyzovať rôzne alifatické a aromatické laktóny [6, 12, 13, 14], ako aj glukokortikoidové laktónové deriváty. Autori týchto prác predpokladajú, že pôvodnou aktivitou paraoxonázy je práve laktónázová aktivita. V tomto duchu sa očakáva orientácia výskumu v nasledujúcich rokoch.

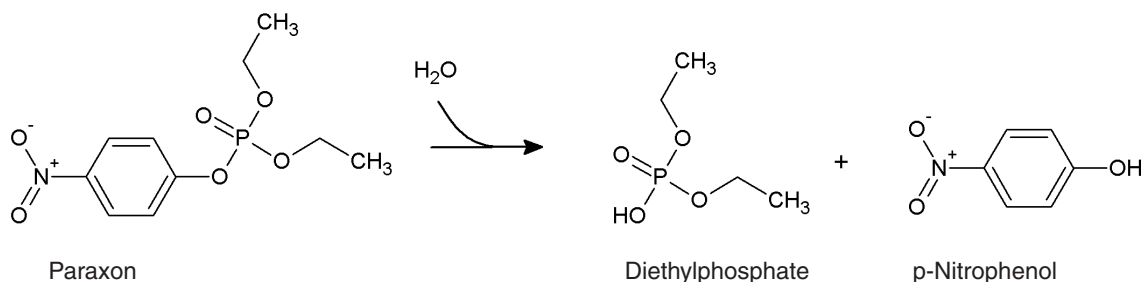
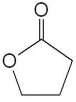
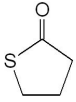
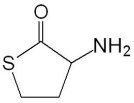
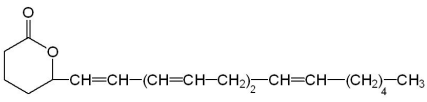
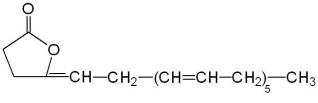
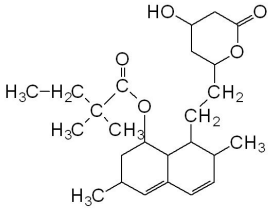


Fig. 3. Hydrolytic decomposition of paraoxon catalyzed by PON1

Keďže najmä PON2, ale aj PON3 nevykazujú významnú paraoxonázovú aktivitu, presnejší názov pre tieto tri hydrolázy (PON1, PON2 a PON3) by pravdepodobne bol „laktónázy“.

Laktónázová aktivita paraoxonáz využíva ako substráty rôzne laktóny a laktónové deriváty aminokyselín, oxidovaných lipidov alebo liekov (tab. 2).

**Table 2.** Several lactone substrates hydrolyzed by PON

|                                   |   |   |
|-----------------------------------|---|---|
| <b>Lactone</b>                    |    | $\gamma$ -butyrolactone                               |
| <b>Thiolactone</b>                |    | Thiolactone   |
| <b>Derivatives of amino acids</b> |    | Homocysteine thiolactone                              |
| <b>Oxidized lipids</b>            |    | 5-hydroxy-eicosatetraenoic acid-1,5-lactone (5-HETEL) |
|                                   |  | 4-hydroxy-docosahexaenoic acid (4-OK-DHA)             |
| <b>Drugs</b>                      |  | Silvastatin   |

### PON a ateroskleróza

Aktivita PON sa dáva do súvisu s procesmi aterogenézy v rôznych smeroch.

PON1 ochraňuje LDL pred oxidáciou tým, že rozkladá už oxidačne modifikované lipidy a proteíny, čím tiež ochraňuje HDL pred znefunkčnením [8]. Ochranou HDL tak nepriamo inhibuje aterogenézu a zvyšuje antioxidantný potenciál HDL. Aktivitu PON1 spätne inhibuje oxidačný stres, čím sa vysvetľuje znížená aktivita PON1 u pacientov s ochoreniami, v patológii ktorých sa okrem iného uplatňuje aj oxidačný stres, ako napr. pri diabetes, metabolickom syndróme, hypercholesterolémii a hyperlipidémii [12]. Paraoxonáza uplatňuje antiaterogénnu funkciu aj tým, že inhibuje tvorbu penových buniek z makrofágov, čím potláča aterogenézu [15].

Významným aterogénnym rizikom je vysoký cholesterol. Akumulácia cholesterolu v makrofágoch sa uskutočňuje viacerými cestami: zvýšeným vychytávaním oxidovaných sterolov v LDL (ox-LDL), zvýšenou biosyntézou alebo zníženým efluxom cholesterolu z HDL. Do týchto procesov zasahuje aj paraoxonáza. PON1 asociovaná s HDL môže znížiť influx cholesterolu do makrofágov napr. hydrolýzou oxidovaných lipidov, redukciou oxidácie LDL v makrofágoch, znížením hladiny ox-LDL hydrolýzou oxidovaných lipidov v ox-LDL (16), inhibíciou vychytávania (uptake) ox-LDL makrofágmi cez receptor makrofágov CD-36 a hydrolýzou oxidovaných lipidov vo vnútri makrofágov [17]. S HDL-asociovaná PON inhibuje biosyntézu cholesterolu a zvyšuje s HDL spojený eflux oxidovaných lipidov cez ATP závislý transportér A1.

Kolektív autorov vyšetroval súvislosti medzi aktivitami PON1 a niektorými parametrami lipidového profilu, lipoperoxidmi a aterogénnym indexom AI (celkový cholesterol/HDL-cholesterol) u dospelých „zdravých“ jedincov (priemerný vek 41,3, n = 30). Signifikantná korelácia sa zistila medzi PON1 – arylesterázovou aktivitou a HDL a negatívna korelácia medzi tou istou aktivitou a AI. U paraoxonázovej aktivity PON1 sa podobné asociácie nepotvrdili. Výsledky podporujú názor, že lepším ukazovateľom aterogenity a anti-oxidačnej schopnosti PON1 je arylesterázová aktivita PON1 ako paraoxonázová aktivita [18].

Sumegová et al. sledovali aktivitu PON1 u jedennástročných detí a zistili zaujímavé asociácie s HDL, aterogénnym indexom AI, oxidačne modifikovanými lipidmi (lipoperoxidy) a hmotnosťou detí reprezentovanou BMI (body mass index = hmotnosť (kg)/výška (m<sup>2</sup>)) [19]. Z výsledkov vyplýva, že nižšia hladina HDL je asociovaná so zvýšeným oxidačným poškodením lipidov a toto je vyššie u pacientov s vyšším AI. Autori ďalej zistili, že deti s vyššou hmotnosťou sú náchylnejšie na oxidačné poškodenie lipidov a súčasne vykazujú nižšiu aktivitu PON1.

### PON2 a PON3

Vzhľadom k veľmi podobnému zloženiu všetkých PON sa predpokladá, že aj PON2 a PON3 majú podobnú funkciu ako PON1 [14]. Ng et al. zistili, že mRNA a aj proteín PON2 sa tvorí v ľudských endotelových bunkách a v bunkách hladkého svalstva aorty [20]. Na základe výsledkov viacerých experimentov *in vitro* a *ex vivo* sa predpokladá, že PON2 môže účinkovať ako intracelulárny antioxidant a môže vykazovať antiaterogénnu funkciu cez redukciu oxidačného stresu, čo sa dokázalo cez zvýšenú ochranu pred oxidáciou peroxidom vodíka, zníženú tvorbu ox-LDL a lipohydroperoxidov. Na rozdiel od PON1, ktorej aktivita sa v prostredí oxidačného stresu inhibuje, aktivita PON2 sa oxidačným stresom v bunke stimuluje.

PON3 sa, ako už bolo povedané, asocioje podobne ako PON1 s HDL. Expresia PON3, na rozdiel od PON1 a PON2, nie je v podmienkach oxidačného stresu ovplyvnená, avšak jej laktónázovú aktivitu oxidačný stres inhibuje.

## Môžeme aktivitu PON ovplyvniť?

Aktivitu, prípadne expresiu PON1 ovplyvňujú rôzne faktory životného štýlu, výživových zvyklostí, užívanie liekov, najmä statínov a fibrátov, výskyt iných ochorení, ako je napr. diabetes, renálna insuficiencia, ale aj vek a pohlavie jedincov.

Expresiu a aktivitu PON1 ovplyvňujú aj dietetické komponenty. Zistilo sa, že aktivita PON1 u ľudí pozitívne koreluje s obsahom vitamínu C a E v diéte. V pracovnej skupine Avirama [21] zistili vo viacerých štúdiách pozitívny účinok polyfenolových látok, ako napr. polyfenoly v štave z granátového jablka, či kvercetín a katechín z červeného vína [21, 22, 23]. Tieto látky redukovali oxidačný stres, ktorý inhibuje aktivitu PON1. Týmto sa šetrí a zvyšuje hydrolytická aktivita PON1 voči lipoperoxidom v oxidovaných lipoproteínoch, makrofágoch a aterosklerotických léziách [24].

Rôzne experimenty na bunkových kultúrach, potkanoch a v humánnych klinických štúdiách sa zaoberali účinkom statínov, čo sú inhibítory HMG-KoA reduktázy (HMG-hydroxymetylglutaryl-) na expresiu, koncentráciu a aktivitu PON1. HMG-KoA reduktáza je kľúčovým enzýmom v syntéze cholesterolu [25]. Viacerí autori zistili zvýšenie aktivity PON1 po podávaní rôznych statínov. Mechanizmus účinku autori pripísali antioxidantným účinkom týchto látok.

Polyfenoly a statíny stimulujú expresiu PON1 v pečeni, ktorá sa potom dostáva cirkuláciou do krvi, asociuje sa s HDL, čím sa zvyšuje jej aktivita. Polyfenoly a statíny pôsobia v krvi ako antioxidanty, znižujú „oxidačný stres“ [1], čím zvyšujú aktivitu PON1 asociovanej s HDL. Vyššia aktivita PON1 zvyšuje hydrolýzu oxidačne modifikovaných lipidov v oxidovaných LDL (ox-LDL) a v makrofágoch [24]. Statíny stimulujú expresiu PON2 v makrofágoch, ktorá pôsobí hydrolyticky na intracelulárne oxidované lipidy. Všetky uvedené procesy tak spolu potláčajú aterogénne procesy [15, 21].

Okrem statínov zvyšujú rôznou mierou expresiu sérovej PON1 aj vlákniny. Tiež sa zistilo, že podávanie steroidných hormónov klimakterickým ženám zvýšilo aktivitu PON1 a znížilo tvorbu ox-LDL [21].

Iní autori zistili zvýšenú expresiu PON1 v bunkových kultúrach po ich ošetrovaní s kvercetínom a resveratrolom. Na druhej strane, pracovníci z tímu autorov zistili, že polyfenolový extrakt z kôry prímorskej borovice, Pycnogenol® v dávke 150 mg/kg a 100 mg/kg neovplyvnil arylersterázovú, ani paraoxonázovú aktivitu PON1 v sére 50 pacientov s osteoartrózou kolena a 30 žien v klimaktériu.

V inej práci sa však zistila znížená aktivita PON1 u zdravých dobrovoľníkov, ktorá negatívne korelovala s príjmom zeleninovej potravy, beta-karoténom a rozpustnými vlákninami [23].

Avšak  $\omega$ -3 polynenasýtené mastné kyseliny podávané pacientom s familiárnou hyperlipidémiou zvýšili hladinu HDL a PON1 v sére. Podobne kyselina olejová a jej fosfolipidové deriváty ochraňovali PON1 pred oxidačnou inaktiváciou [26]. Na druhej strane, tí istí autori zistili *in vitro*, že lyzofosfatidylglycerol a lyzofosfatidylinozitol majú negatívny účinok, teda znižujú aktivitu PON1. Avšak iné lyzolecitíny taký účinok nemali. Uvedené napovedá, že lipidové zloženie potravy môže významne ovplyvniť aktivitu PON1.

Názory na súvis medzi aktivitou PON a pohlavím, či vekom sú rôzne. V tíme autorov zistili rozdiel v aktivite PON1 voči fenylacetátu (arylersterázová aktivita) – ale nie voči paraoxonu – u ženského pohlavia v porovnaní s mužským [19, 27].

## Stanovenie aktivity PON

Fyziologický substrát pre paraoxonázu sa nepozná. Na základe ostatných výsledkov sa predpokladá, že PON vykazujú najmä laktónázovú aktivitu voči rôznym laktónovým substrátom. Okrem toho PON1 hydrolyzuje organofosfáty, PON3 liekové substráty (lovastatín, spirónolaktón) a PON2 prednostne hydrolyzuje N-acetylhomoserínový laktón [28].

Stručný protokol stanovenia arylersterázovej a paraoxonázovej aktivity PON1 v sére/plazme je na obrázku 4 [18, 19, 27].

Laktónázová aktivita sa stanovuje hydrolýzou rôznych substrátov, napr. dihydrokumarínu a tiobu-

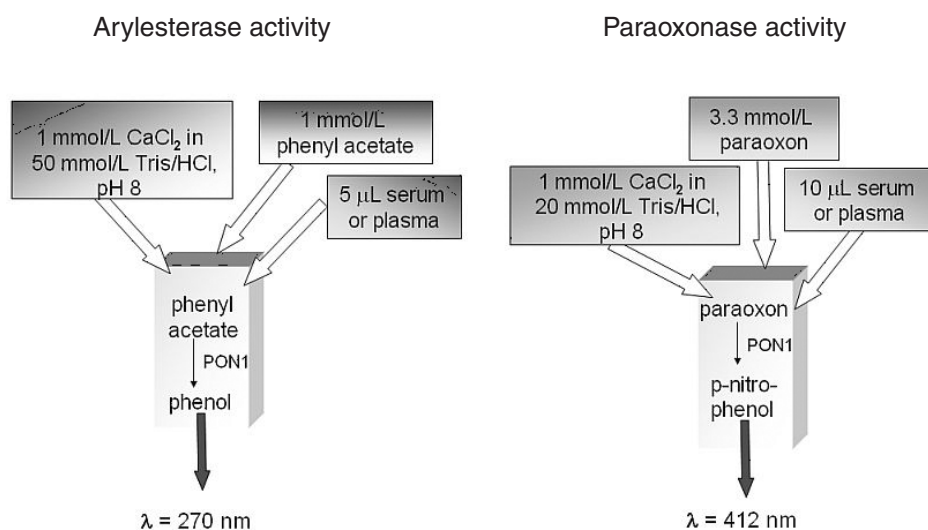


Fig. 4. The brief protocol for determination of paraoxonase and arylersterase activities of PON1

tylbutyrolaktónu (TBBL) (obr. 5), podľa Avirama a Rosenblata [28].

| Methods for determination of lactonase activity of PON  |
|---|
| <b>Lactonase activity</b> towards dihydrocoumarin at 270 nm<br>IU = $\mu\text{mol}$ of dihydrocoumarin hydrolyzed per minute<br>$E_{270} = 1295 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$<br>healthy subjects 13 – 20 U/ml of serum |
| <b>Lactonase activity</b> towards TBBL (ThioButylButyrolactone) at 412 nm<br>IU = $\mu\text{mol}$ of TBBL hydrolyzed per minute<br>healthy subjects 10 – 40 U/ml of serum   |

Fig. 5. The brief protocol for determination of lactonase activity of PON

Okrem používaných spektrofotometrických metód (viď obr. 4 a 5) sú k dispozícii aj komerčné sety. Na stanovenie paraoxonázovej aktivity PON1 je to komerčný set založený na fluorometrickej metóde s excitačným/emisným maximom 360/450 nm, ktorý využíva ako substrát fluorogénny organofosfátový analóg (EnzChek<sup>®</sup>), alebo set na stanovenie arylesterázovej/paraoxonázovej aktivity na rovnakom princípe (ZeptoMetrix corp.).

Okrem enzýmovej aktivity PON sa môže stanovovať hladina enzýmu metódou western blot s komerčne dostupnými protilátkami proti PON1, PON2 a PON3 (napr. od firmy Abfrontier).

Hladina proteínu PON2 alebo PON3 sa stanovuje technikou western blot z extrahovaných proteínov buniek. Na stanovenie PON je treba vyzolovať 40–60 mikrogramov proteínov.

Pre stanovenie sa použije primárna monoklonálna protilátka proti ľudskej alebo myšacej PON2 alebo PON3 (rabbit anti human PON antibody) riedená 1 : 5000 s 1% BSA v 1% TBST premývacom roztoku (Tris-Buffered Saline Tween-20). Po premytí membrány s TBST roztokom, sa membrána inkubuje so sekundárnou protilátkou (anti rabbit antibody) konjugovanou s peroxidázou (HRP) riedenou 1 : 5000 s TBST premývacím roztokom [28].

Podobne sú k dispozícii protilátky aj pre stanovenie proteínu PON1.

## Záver

Živočíšne paraoxonázy (PON1, PON2 a PON3) sú rodinou významných hydroláz závislých od  $\text{Ca}^{2+}$  a aktívnych voči celému radu rôznych substrátov. Aj keď skutočný fyziologický substrát pre jednotlivé PON sa nepozná, v súčasnosti sa považujú za významné substráty laktóny, niektoré oxidované fosfolipidy, produkty oxidácie kyseliny arachidónovej a dokozaehexaénovej ako aj laktóny odvodené od N-acetyl-homoserínu. Všetky PON sa pokladajú za enzýmy s významnou antiaterogénnou aktivitou. Ich aktivity sa stanovujú na rôzne substráty. Arylesterázová aktivita PON1 sa

považuje za smerodatnejší ukazovateľ antiaterogénnej aktivity ako paraoxonázová aktivita PON1. Laktónázová aktivita je pravdepodobne bližšie k fyziologickému substrátu ako paraoxon, či fenylacetát.

## Literatúra

1. **Ďuračková, Z.** Oxidačný stres, oxidanty a antioxidanty. In: Ďuračková, Z. (Ed.) *Príroda a zdravie človeka (Prírodné látky a ich význam v prevencii a liečbe ochorení)*. Bratislava: SAP, 2008 s. 13-45, ISBN 978-80-8095-032-3.
2. **Liptáková, A.** Ateroskleróza a voľné radikály. In: Ďuračková, Z., Bergendi, L., Čársky, J. (Eds.) *Voľné radikály a antioxidanty v medicíne (II)*. Bratislava : SAP, 1999 s. 135-176, ISBN 80-88908-46-9.
3. **Aviram, M., Rosenblat, M.** Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, 37, 9, p. 1304–1316.
4. **Fuhrman, B., Volkova, N., Aviram, M.** Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis*, 2005, 180, 1, p. 55–61.
5. **Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.C., Teiber, J., La Du, B.N.** The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*, 1996, 33, 3, p. 498–507.
6. **Draganov, D. I., La Du, B. N.** Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 2004, 369, 1, p. 78–88.
7. **Marchesani, M., Hakkarainen, A., Tuomainen, T.-P. et al.** New paraoxonase 1 polymorphism I102V and the risk of prostate cancer in Finnish men. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003, 95, 11, p. 812–818.
8. **Mackness, M. I., Arrol, S., Abbott, C., Durrington, P. N.** Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*, 1993, 104, 1–2, s. 129–135.
9. **Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L. et al.** Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004, 11, 5, p. 412–419.
10. **Mazur, A.** An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkylfluorophosphates. *J. Biol. Chem.*, 1946, 164, 1, p. 271–289.
11. **Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R. et al.** 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.*, 1998, 18, 10, p. 1617–1624.
12. **James, R. W.** A long and winding road: defining the biological role and clinical importance of paraoxonases. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006, 44, 9, p. 1052–1059.
13. **Khersonsky, O., Tawfik, D. S.** Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry*, 2005, 44, 16, p. 6371–6382.
14. **Draganov, D. I., Teiber, J. F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., La Du, B. N.** Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J. Lipid Res.*, 2005, 46, 6, p. 1239–1247.

15. **Ďuračková, Z.** Paraoxonáza: čo o nej vieme. *CEVA Education* [online]. 2009 [cit. 2009-05-29]. Dostupné na www: <http://www.cevaedu.cz/moodle/mod/resource/view.php?id=426> >. ISSN 1803-8999
16. **Racek, J., Holeček, V.** Enzymy a antioxidační ochrana organismu. *Klin. Biochem. Metab.*, 1999, 7, 28, 4, p. 232–238.
17. **Flekač, M., Škrha, J., Novotný, Z.** Faktory ovlivňující aktivitu a koncentraci antioxidačního enzymu paraoxonáza 1. *Klin. Biochem. Metab.*, 2006, 14, 35, 1, p. 33–39.
18. **Sumegová, K., Blažíček, P., Waczulíková, I., Žitňanová, I., Ďuračková, Z.** Activity of paraoxonase 1 (PON1) and its relationship to markers of lipoprotein oxidation in healthy Slovaks. *Acta Biochim. Pol.*, 2006, 53, 4, p. 783–787.
19. **Sumegová, K., Nagyvová, Z., Waczulíková, I., Žitňanová, I., Ďuračková, Z.** Activity of paraoxonase 1 and lipid profile in healthy children. *Physiol. Res.*, 2007, 56, 3, p. 351–357.
20. **Ng, C. J., Shih, D. M., Hama, S. Y., Villa, N., Navab, M., Reddy, S. T.** The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.*, 2005, 38, 2, p. 153–163.
21. **Aviram, M., Rosenblat, M.** Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2005, 16, 4, p. 393–399.
22. **Aviram, M., Fuhrman, B.** Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002, 957, p. 146–161.
23. **Kleemola, P., Freese, R., Jauhiainen, M., Pahlman, R., Alfthan, G., Mutanen, M.** Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis*, 2002, 160, 2, p. 425–432.
24. **Mackness, B., Quarck, R., Verreth, W., Mackness, M., Holvoet, P.** Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006, 26, 7, p. 1545–1550.
25. **Nagyová, Z.** *Cholesterol – treba ho sledovať už v detskom veku?* In Ďuračková, Z. (Ed.) *Príroda a zdravie človeka (Prírodné látky a ich význam v prevencii a liečbe ochorení)*. Bratislava: SAP, 2008 s. 203–217, ISBN 978-80-8095-032-3.
26. **Nguyen, S. D., Sok, D. E.** Beneficial effect of oleoylated lipids on paraoxonase 1: protection against oxidative inactivation and stabilization. *Biochem J.*, 2003, 375, Pt 2, p. 275–285.
27. **Sumegová, K., Blažíček, P., Fuhrman, B., Waczulíková, I., Ďuračková, Z.** Paraoxonase 1 (PON1) and its relationship to lipid variables, age and gender in healthy volunteers. *Biologia*, 2006, 61, 6, p. 699–704.
28. **Aviram, M., Rosenblat, M.** Paraoxonases (PON1, PON2, PON3) analyses in vitro and in vivo in relation to cardiovascular diseases. *Methods Mol. Biol.*, 2008, 477, p. 259–276.

Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0224/08.

Ďakujeme za technickú spoluprácu pani Lýdii Míkovej, Lubici Chandogovej a Daniele Opálenej.

Do redakcie došlo 15. 6. 2009.

Adresa pro korespondenci:

Prof. Ing. Zdeňka Ďuračková, PhD.

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK

Sasinkova 2

811 08 Bratislava

Slovenská republika

e-mail: [zdenka.durackova@fmed.uniba.sk](mailto:zdenka.durackova@fmed.uniba.sk)