Paraoksonaza 1 u bolesnika sa šećernom bolesti

Knežević, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:005692

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Josip Knežević

Paraoksonaza 1 u bolesnika sa šećernom bolesti

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Opća i klinička biokemija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom dr. sc. Marije Grdić Rajković.

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Mariji Grdić Rajković na stručnom vodstvu tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima što su me podupirali i onda kada sam mislio da više ne mogu.

Issa hvala ti, voli te tvoj Josip.

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Paraoksonaza 1

1.2. Obitelj *pon* gena i distribucija paraoksonaza 3

2. OBRAZLOŽENJE TEME 4

3. MATERIJALI I METODE 5

4. REZULTATI I RASPRAVA 6

4.1. PARAOKSONAZA 1 6

4.1.1. Struktura paraoksonaze 1 (PON1) 6

4.1.2. Enzimska aktivnost PON1 9

4.1.2.1 Kemijski supstrati 9

4.1.2.2 Fiziološki supstrati 11

4.1.2. PON1 i HDL 13

4.1.3. Aktivnost PON1 i ne genski čimbenici 15

4.1.4. Polimorfizmi PON1 20

4.2.OKSIDACIJSKI STRES I POVEZANOST SA ŠEĆERNOM BOLESTI 23

4.2.1. Oksidacijski stres 23

4.2.2. Tip 1 Šećerne bolesti 26

4.2.3. Tip 2 Šećerne bolesti 28

4.2.4. Komplikacije šećerne bolesti 30

4.2.5. Šećerna bolest i oksidativni stres 31

4.3. PON1 i tip 1 Šećerne bolesti 34

4.4. PON1 i tip 2 Šećerne bolesti 38

5. ZAKLJUČAK 41

6. LITERATURA 42

7. SAŽETAK/SUMMARY 46

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 48

BASIC DOCUMENTATION CARD 49

1. UVOD

1.1. Paraoksonaza

Paraoksonaze su enzimi koji pripadaju obitelji kalcij-ovisnih hidrolaza. Članovi obitelji su: paraoksonaza 1 (PON1), paraoksonza 2 (PON2) i paraoksonaza 3 (PON3). Ime enzima potječe od njegove sposobnosti da metabolizira organofosfat paraokson, aktivni metabolit insekticida parationa. Paraokonaze su otkrivene 1946. godine u životinjskom tkivu od strane Abrahama Mazura. Pokazalo se zadnjih godina da PON1 igra bitnu ulogu u prevenciji ateroskleroze.

PON1 je dokazana u različitim organima, kao što su pluća, mozak i bubreg, ali se najvećim dijelom sintetizira u jetri nakon čega se izlučuje u krv. PON1 je u cirkulaciji najvećim dijelom vezana za lipoproteine visoke gustoće (HDL), a povezanost PON1 s HDL-om nužna je za održavanje normalne serumske aktivnosti ovog enzima. PON1 posjeduje organofosfataznu, paraoksonaznu i laktonaznu aktivnost, te hidrolizira niz supstrata. PON1 djeluje antiaterogeno i antioksidacijski, štiti HDL i lipoproteine niske gustoće (LDL) od oksidacije i uništava biološki aktivne oksidirane lipide na lipoproteinima i u arterijskim stanicama. (Grdić Rajković i sur., 2011).

Na protuupalno djelovanje PON1 ukazali su Watson i sur. Na temelju rezultata *in vitro* pokusa u kojem je PON1 značajno smanjila sposobnost oksidiranih LDL čestica da potaknu vezanje monocita za endotelne stanice i njihovu migraciju kroz endotelne stanice u usporedbi s kontrolom. Pretpostavili su da je protuupalno djelovanje PON1 zapravo posljedica njene sposobnosti da metabolizira oksidirane lipide u sastavu LDL čestice. (Watson i sur., 1995).

Aktivnost i koncentracija PON1 pokazuju značajnu interindividualnu varijaciju. Aktivnost PON1 varira do 40 puta, dok koncentracija PON1 varira do 13 puta. Brojni čimbenici mogu utjecati na aktivnost PON1. Do sad je istraživan utjecaj genetskih polimorfizama, dobi, spola, prehrane, lijekova, različitih životnih navika (pušenje,alkohol), patoloških stanja i drugih čimbenika. (Kumar i sur., 2010; Soran i sur., 2009).

Aktivnost humane PON1 minimalna je prije rođenja, ali značajno raste do 15 mjeseci starosti kad dolazi u fazu platoa. Ekspresija samog enzima u jetri pod kontrolom je spolnih hormona i hormona rasta. Istraživanja na miševima pokazala su da smanjenje razine hormona rasta u muških ispitanika povećava ekspresiju PON1. Iako i hormon rasta i PON1 djeluju prevencijski na razvoj ateroskleroznih poremećaja, zaključak provedene studije je mehanizam međusobne kompenzacije. (Cheng i sur., 2012)

PON1 ima učinkovitu esteraznu aktivnost prema nekim sintetskim supstratima. Osim spomenutih fizioloških uloga pretpostavlja se da PON1 ima fosfolipaznu A2 aktivnost koja je odgovorna za hidrolizu oksidiranih fosfolipida. Također pripisuje joj se i uloga da hidrolizira i inaktivira homocistein laktone koji su čimbenici razvoja ateroskleroznih poremećaja. (Harel i sur., 2004).

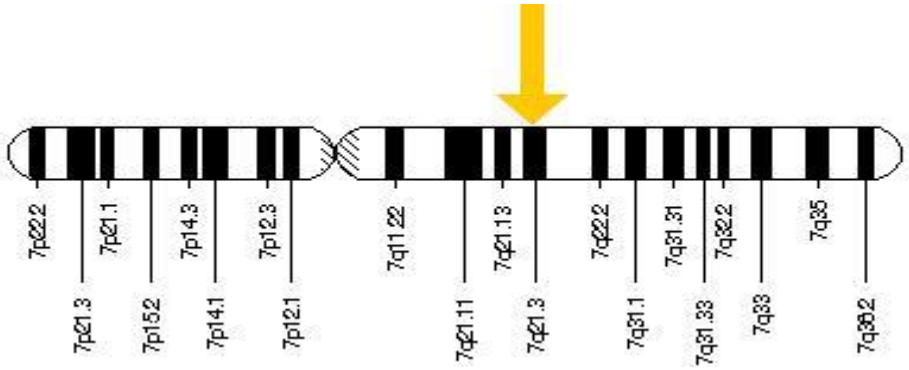
PON1 je polimorfan enzim zastupljen u dvije izoforme A (ili Q) tip i B (ili R) tip. Kloniranjem cDNA zečije i humane PON1 izvedena je aminokiselinska sekvenca. U humanom serumu na PON1 nađena su dva polimorfna mjesta: zmjena Met/Leu na poziciji 55 te Arg/Gln na poziciji 192. Glutamin na poziciji 192 odgovoran je za A fenotip enzima, a arginin za B fenotip enzima. (Kuo i sur., 1998).

Za enzimsku aktivnost humane serumske PON1 potreban je kalcij, pa zbog toga naziv kalcij ovisna hidrolaza. Inaktivacija samog enzima najčešće je posljedica djelovanja kelatirajućih tvari, drugih metala ili spojeva sa sulfhidrilnom skupinom. Najpotentniji inhibitori su kationi rijetkih metala cerija, gadolinija, lantana, samarija, itrija, kadmija, žive i srebra. Erdos i sur. pokazali su da kalcij i lantan štite PON1 od denaturacije prilikom obrade enzima gvanidinom i urejom. Marton i sur. predložili su da kalcij omogućava formiranje enzim-supstrat kompleksa i ubrzava nastajanje produkta same enzimske reakcije. (Kuo i sur,. 1998).

Bolesti u kojima se razmatra aktivnost i koncentracija PON1 su šećerna bolest, metabolički sindrom, pretilost, reumatoidni artritis, neurološke i mnoge druge.

1.2. Obitelj *pon* gena i distribucija paraoksonaza

Obitelj *pon* gena sastavljena je od tri člana *pon1*, *pon2* i *pon3* lociranih jedan do drugog na dugom kraku 7. kromosoma 7q21.3-22 (slika 1.). Sva tri gena dobro su očuvana u sisavaca i dijele 79-95% sličnosti na razini aminokiselinske sekvence te 81-95% sličnosti na razini nukleotida između različitih vrsta. Filogenetska analiza pokazala je da je *pon2* najstariji član obitelji. Također, *pon2* i *pon3* cDNA koje su sekvencirane u mnogim istraživanjima ukazuju na nedostatak tri nukleotida na kodonu 106, dok *pon1* gen nema taj nedostatak. (Draganov i sur., 2005).



Slika 1 - Pon1 gen je lociran na dugom kraku 7. kromosoma (preuzeto i prilagođeno s http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PON1)

Pon1 mRNA eksprimirana je najviše u jetri, *pon3* mRNA u jetri i bubrezima, dok je *pon2* mRNA eksprimirana u plućima, bubrezima, placenti, testisima, tankom crijevu, slezeni, jetrama i želucu. Također, *pon2* mRNA pronađena je i u stanicama stijenke arterija uključujući endotelne stanice, stanice glatkih mišića i makrofage. (Grdić Rajković i sur., 2011).

PON1 isključivo je ekstracelularni enzim povezan u kompleks s HDL česticom u krvnom optjecaju zaslužan za antioksidativno i protuupalno djelovanje lipoproteina visoke gustoće. Nasuprot tome, PON2 i PON3 su intracelularni enzimi nastanjeni na mitohondrijskoj membrani djelujući na način da stimuliraju mitohondrijsku proizvodnju superoksida i apoptozu. Prekomjerna ekspresija *pon2* i *pon3* gena štiti mitohondrij i endoplazmatski retikulum od antimicina A i oligomicina, antibiotika čiji metabolizam ide preko mitohondrija. (Devarajan i sur., 2015).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U mnogim istraživanjima je pokazano da se PON1 može koristiti kao neovisni pokazatelj ateroskleroze te je dokazana uloga ovog enzima u bolestima povezanim s upalom i oksidativnim stresom. Ovim preglednim radom željelo se prikazati dosadašnje spoznaje o povezanosti PON1 s tip 1 i 2 šećernom bolesti te vidjeti može li se koncentracija i aktivnost kao i polimorfizmi PON1 u budućnosti koristiti kako bi se predvidjeo rizik razvoja šećerne bolesti i njezin tijek.

3. MATERIJALI I METODE

U ovom teorijskom diplomskom radu proučavana je stručna i znanstvena literatura vezana uz PON1 i povezanost statusa PON1 s tip 1 i 2 šećernom bolesti. Dan je pregled dosadašnjih spoznaja o ovom enzimu te pregled radova koji su se bavili tematikom PON1 i tip 1 i 2 šećerne bolesti.

Do relevantnih podataka došlo se pregledavanjem Medline i PubMed baze prema ključnim riječima: *paraoxonase, diabetes mellitus, oxidative stress.*

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PARAOKSONAZA 1

4.1.1. Struktura paraoksonaze 1 (PON1)

Gen za PON1 kodira protein od 355 aminokiselina molekularne mase 43 kDa. Sami enzim započinje sa N-terminalnom hidrofobnom sekvencom koja je odgovorna za veznje s HDL česticom. Primarna struktura enzima također sadrži cisteinske ostatke na položajima 42, 284 i 353. (She i sur., 2012).

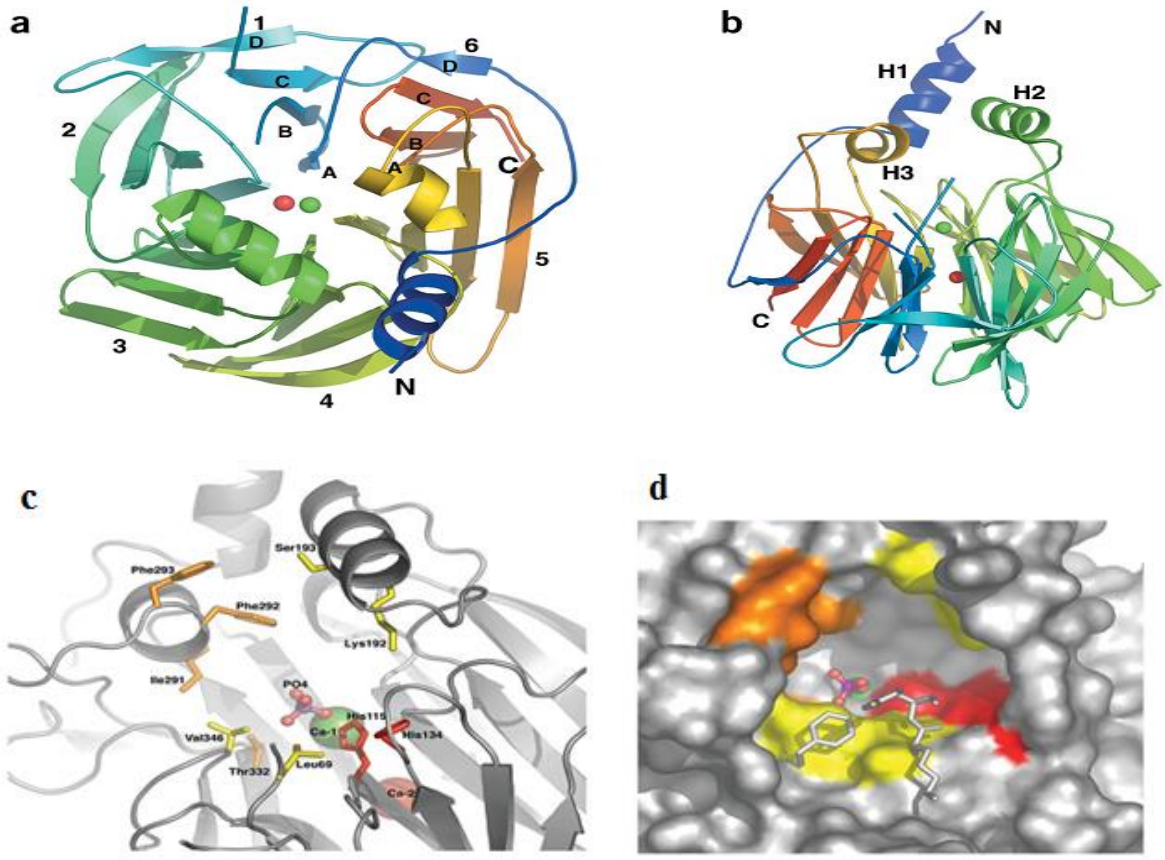
PON1 ima izgled šesterokrilnog β-propelera (slika 2.a,b), a svaki kraj ima četiri smjera. Struktura samog enzima posljedica je disulfidnog mosta između Cys42 i Cys353. Kovalentno povezivanje N i C kraja je rijetko kod konformacije β-propelera, ali evolucijski je sačuvano u PON1. Dva iona kalcija nalaze se u središnjem tunelu β-propelera na udaljenosti od 7,4 Å, jedan na početku, a drugi u središnjem dijelu tunela. Kalcij koji se nalazi u središnjem dijelu tunela odgovoran je za stabilnost samog enzima, jer njegovom disocijacijom dolazi do ireverzibilne denaturacije PON1. Ion kalcija koji se nalazi na početku središnjeg tunela β-propelera odgovoran je za katalitičku aktivnost PON1 i u interakciji je s kisikom pet aminokiselinskih ostataka Asn220, Asn270, Asn168, Asp269 te Glu53. Druga dva potencijalna liganda su dvije molekule vode i jedan od kisika fosfatnog iona. (Harel i sur., 2004).

PON1 sadrži dva katalitička mjesta (slika 2.c,d). Svako od tih katalitičkih mjesta ima svoju enzimsku ulogu, jedno hidrolitičku, a drugo antioksidacijsku. Također postoje dva vezna mjesta za kalcij. Rezultat vezanja kalcija za mjesto većeg afiniteta je stabilnost enzima dok je drugo mjesto važno za njegovu hidrolitičku aktivnost. Pod utjecajem kelatirajućih agenasa dolazi do izdvanjanja kalcija iz enzimske strukture te ireverzibilne destrukcije enzimske aktivnosti. S druge strane, kalcijevi ioni nisu nužni za sprječavanje oksidacije LDL-a koja je izazvana bakrovim ionima. Dvovalentni kationi nekih metala kao što su cink i magnezij mogu zadržati stabilnost samog enzima, ali ne i njegovu aktivnost. Esencijalni aminokiselinski ostatci bitni za aktivnost PON1 jesu His115, His134, His155, His243 i Trp281. (She i sur., 2012; Josse i sur., 1999).

PON1 u životinjskim stanicama je glikolizirana. Glikolizacija nije bitna za hidrolitičku aktivnost, ali može biti bitna za topljivost i stabilnost enzima, ili za spriječavanje

nespecifičnog vezanja na stanične membrane. Postoje četiri potencijalna mjesta na PON1 gdje dolazi do glikolizacije. Dva se nalaze u središnjem tunelu β-propelera (Asn227 i Asn270), a druga dva se nalaze na površini enzima (Asn253 i Assn324). (Harel i sur., 2004).

Strukturu humane PON1 vrlo je teško očistiti do potpune homogenosti. Pokušaji da se dobiju informacije o strukturi i funkcionalnosti divljeg tipa proteina kristalografskim metodama do danas su neuspješni. Jedina kristalna struktura do danas istražena je dobivena rekombinantnom tehnologijom ljudskog, zečijeg i mišjeg gena za PON1. Ova varijanta poznata je kao G2E6 i dijeli 86% sličnosti sa divljim tipom PON1. Kristalna struktura G2E6 dobivena je na 2,2Å rezoluciji. Zbog nepotpune sličnosti s divljim tipom PON1 nemoguće je donijeti zaključak o mehanizmu djelovanja samog enzima. Pretpostavljen je mehanizam da do hidrolize samog supstrata dolazi zbog aktivacije molekule vode ili aktivacije nukleofilnog ostatka u aktivnom mjestu samog enzima. Mogući izvori za proizvodnju hidroksida uključuju H115/H134 i D269/H285 parove ili izravno koordinativno aktiviranje molekule vode na katalitičkom mjestu blizu kalcijeva iona. (Toby i sur., 2012).



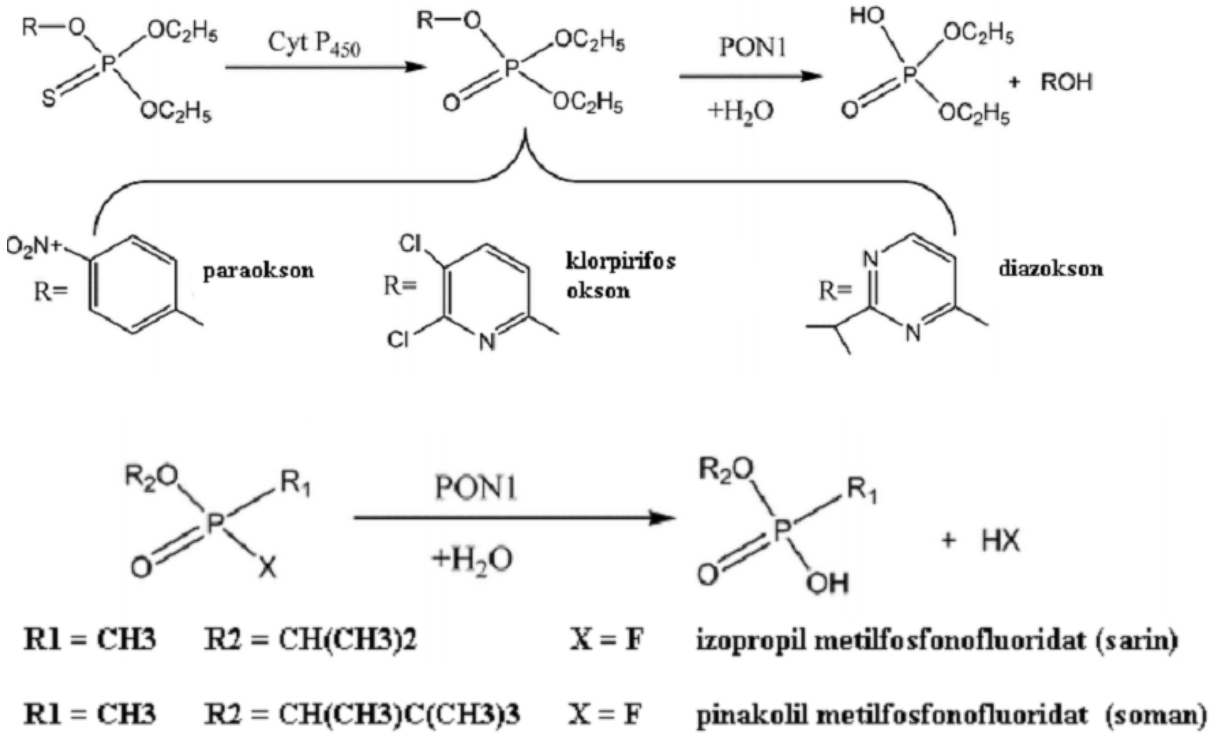
Slika 2 – (A) Pogled na strukturu PON1 odozgo; vanjski dijelovi svake uzvojnice (D) povezani su s unutarnjim dijelovima slijedeće uzvojnice (A). N- i C kraj te dva iona kalcija (prvi kalcij je zelen, a drugi crven) nalaze se u središnjem tunelu. 1-6 su šest uzvojnica PON1. (B) Jedna strana propelera. H1, H2 i H3 uzvojnice nalaze se na vrhu. U ovom strukturnom modelu ne vide se aminokiselinski ostatci 1-15 N kraja te ostatci 72-79 površinske petlje između dijelova 1B i C. (C) Pogled na aktivno mjesto PON1 odozgo; središnji tunel β-propelera sa dva kalcijeva iona. Bočni aminokiselinski ogranci mutirane varijante PON1 za esteraznu i laktonaznu aktivnost (narančasto) te fosfotriesteraznu aktivnost (žuto), uključujući R192Q polimorfizam. Pretpostavljeni katalitički par Hys-Hys (crveno). (D) Pogled na površinu PON1; Lys70, Tyr71 i Phe347 su prikazani strukturom štapića kako bi se omogućio bolji pogled na aktivno mjesto. U najdubljem mjestu šupljine nalazi se drugi kalcij (zeleno) na kojeg je vezan fosfatni ion (Harel u sur., 2004).

4.1.2. Enzimska aktivnost PON1

4.1.2.1 Kemijski supstrati

Ime paraoksonaza potječe od sposobnosti enzima da hidrolizira paraokson (dietil p-nitrofenil fosfat), toksični metabolit parationa. PON1 je enzim koji hidrolizira mnoge supstrate kao što su organofosforni spojevi (slika 3.), arilesteri i laktoni. Također, PON1 posjeduje nisku razinu peroksidne aktivnosti i aktivnost sličnu fosfolipazi A2. (Ceron i sur., 2014).

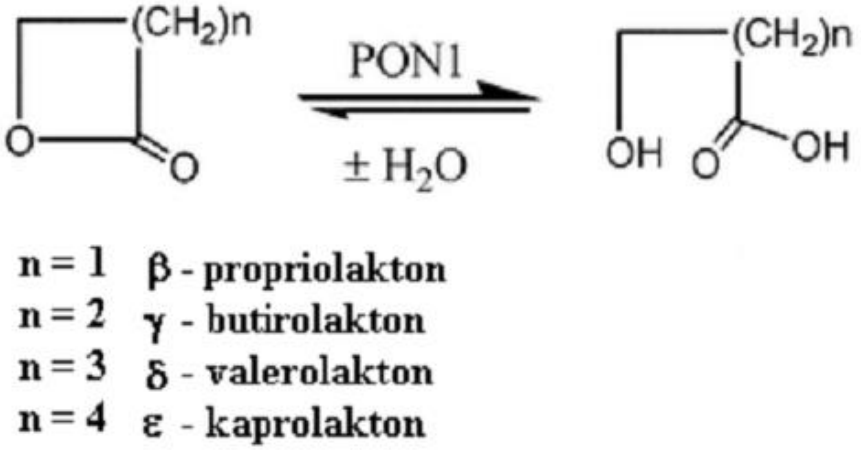
PON1 hidrolizira oksone paraokson, klorpirifos i diazokson, toksične metabolite organofosfornih insekticida parationa, klorpirifosa i diaziniona. PON1 također hidrolizira neurotoksične agense kao što su sarin i soman. (Ceron i sur., 2014; Draganov i sur., 2004).



Slika 3 - Hidroliza oksona i neurotoksičnih agensa (Draganov i sur., 2004)

Također, PON1 ima sposobnost hidrolize aromatskih estera primjerice tiofenilacetata, fenilacetata i 2-naftilacetata. Nadalje, PON1 hidrolizira alifatske i aromatske

laktone te cikličke karbonate (slika 4.), primjerice lakton homogentizinske kiseline, γ-butirolakton i homocistein tiolakton. Nadalje, kataliza reverzibilne reakcije laktonizacije γ i δ-hidroksikarboksilnih kiselina rezultat je katalitičke aktivnosti PON1. (Draganov i sur., 2004).



Slika 4 - Hidroliza laktona i laktonizacija hidroksikarboksilnih kiselina uz katalitičku aktivnost PON1 (Draganov i sur.,2004).

Nadalje, PON1 sudjeluje u metabolizmu nekih lijekova koji u svojoj strukturi sadrže lakton ili ciklički karbonat. Naprimjer, PON1 hidrolizira aktivni kinolinski antibiotik prulifloksacin koji u svojoj strukturi sadrži nezasićeni ciklički karbonat, diuretik spironolakton te inhibitore hidroksimetilglutaril-CoA reduktaze (mevastatin, lovastatin i simvastatin). (Rajković i sur., 2011).

4.1.2.2 Fiziološki supstrati

Još uvijek nije poznat fiziološki supstrat PON1 te isto tako nije poznat točan mehanizam njegovog antiaterogenog i antiinflamatornog djelovanja. Poznato je da je PON1 enzim koji ima sposobnost hidrolize raznih supstrata uključujući one koji cirkuliraju organizmom živih bića.

Uvjeti za hidrolitičku i antioksidacijsku aktivnost PON1 nisu jednaki. PON1 posjeduje dva vezna mjesta za kalcij. Naime, kalcij je bitan za paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost PON1 te vezanje kalcija s kelatirajućim sredstvima dovodi do inhibicije enzimske aktivnosti. U strukturi PON1 mnogo je aminokiselinskih ostataka koji su važni za organofosfataznu i arilesteraznu aktivnost. Među ostalim, potrebno je izdvojiti tri cisteinska ostatka, cisteinski ostatak na poziciji 284 (C284) koji je slobodan i cisteinske ostatke na pozicijama 42(C42) i 353(C353) koji su vezani disulfidnom vezom. C284 nije ključan za paraoksonaznu/arilesteraznu aktivnost budući da zamjena ovoga aminokiselinskog ostatka sa serinom ili alaninom smanjuje, ali ne dovodi do potpunog gubitka ovih aktivnosti. S druge pak strane, ovaj je aminokiselinski ostatak nužan za sprječavanje oksidacije LDL-a. Smatra se da je C284 smješten u blizini aktivnoga središta enzima te da je bitan za orijentaciju i vezanje supstrata. Zamjena C42 i C353 alaninom rezultirala je inaktivacijom i smanjenim izlučivanjem enzima te se stoga ovi aminokiselinski ostatci smatraju važnima za izlučivanje i katalitičku aktivnost PON1. Dosadašnja istraživanja nisu uspjela dokazati postojanje dva katalitička mjesta pa Aviram i suradnici smatraju da se katalitičko mjesto odgovorno za hidrolitičku i ono odgovorno za antioksidacijsku aktivnost preklapaju (Aviram i sur., 1998.; Draganov i sur., 2004.; Grdić Rajković i sur., 2011., Josse i sur., 1999.; Kuo i sur., 1998.; Yeung i sur., 2004.)

Dosadašnje studije pokazale su da je nativna fiziološka aktivnost PON1 laktonazna, a kao potencijalni supstrati predloženi su neki od laktona prisutni u hrani, lijekovima ili derivatima masnih kiselina koji nastaju oksidacijom, npr. lakton 5–hidroksi–6E,8Z,11Z,14Z–eikosatetraenoične kiseline (5-HETE lakton) koji se nalazi na HDL-u. (Aviram i sur., 2004).

Zbog nedovoljnog znanja o fiziološkim supstratima PON1, aktivnost PON1 se najčešće određuje hidrolizom supstrata paraoksona (paraoksonazna aktivnost) i fenilacetata (arilesterazna aktivnost). Na temelju sposobnosti hidrolize svojih supstrata aktivnost PON1 može se mjeriti spektrofotometrijskim testovima ili se može direktno kvantificirati

imunokemijskim metodama sa specifičnim antitijelima. Istraživanja provedena na ljudima bavila su se usporedbom aktivnosti PON1 prema određenim supstratima. U jednoj od provedenih studija uspoređivala se aktivnost PON1 prema paraoksonu, fenilacetatu i 4-nitrofenilacetatu kod bolesnika sa kroničnim zatajanjem bubrega u usporedbi sa zdravom populacijom (tablica 1.). Pokazalo se da je hidroliza 4-nitrofenilacetata mnogo manja u pacijenata u odnosu na pozitivnu kontrolu. Drugim istraživanjem utvrđeno je da je fenilacetat osjetljiviji supstrat od paraoksona kod pacijenata sa kroničnom bolesti jetre. Jača povezanost između smanjene aktivnosti PON1 u djece koja boluju od metaboličkog sindroma pronađena je kod hidrolize 5-tiobutil butirolaktona (TBBL) u usporedbi s hidrolizom paraoksona. (Ceron i sur., 2014).

Supstrat	Serum		Pročišćeni enzim	
	QQ	RR	QQ	RR
Paraoxon	0.001	0.005	0.467	2.1
Phenyl acetate	1.26	1.52	845	720
4-nitrophenyl acetate	0.022	0.04	6.4	7.3
1-naphtyl acetate	0.023	0.032	<0.01	<0.01

Tablica 1- Koncetracije različitih supstrata i pročišćene PON1 u serumu (=mikromol supstrata/min/mg proteina). (Ceron i sur., 2014).

Eventualno u budućnosti bi dodatni testovi koji bi izravno kvantificirali PON1 pomogli u dijagnostici poremećaja kod ljudi. Svakako bi bilo potrebno provesti niz istraživanja s ciljem rasvjetljivanja uloge PON1 u uvjetima povezanim sa oksidativnim stresom i upalnim stanjima te ulogu PON1 kao biomarkera u dijagnostici, terapiji i praćenju bolesti. (Ceron i sur., 2014).

4.1.2. PON1 i HDL

Serumska PON1 se gotovo isključivo nalazi u sastavu lipoproteina visoke gustoće (HDL). Lipidni sastav HDL čestice, utjecaj okolišnih čimbenika te vrsta prehrane utječu na veličinu, strukturu te aktivnost samog enzima. (Boshtam i sur., 2013).

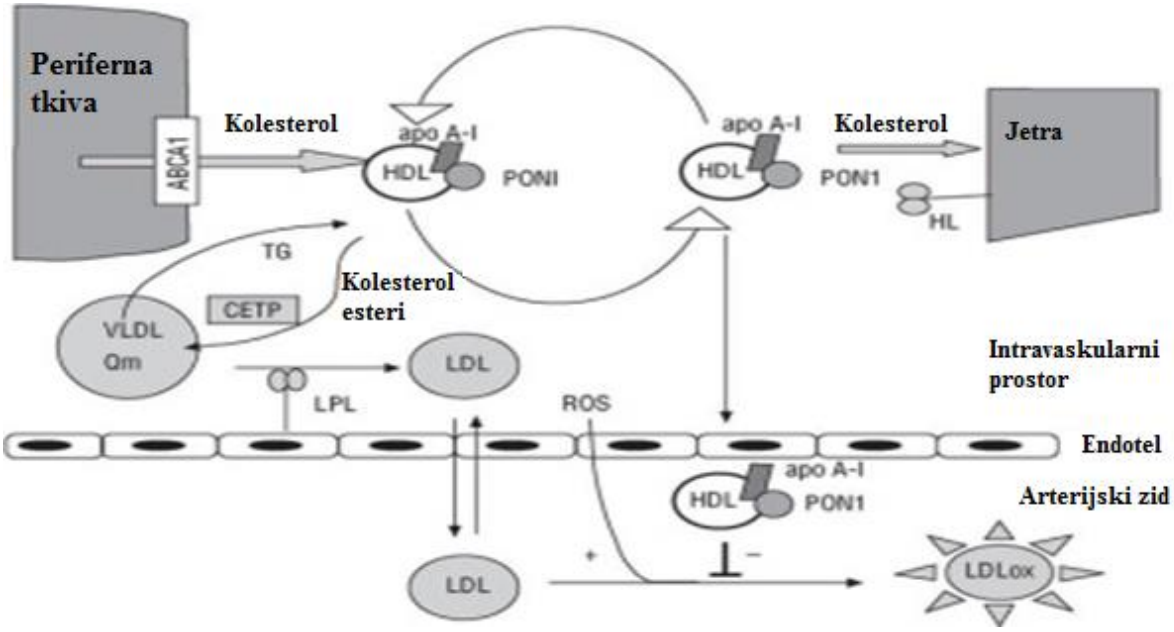
HDL apolipoproteine izlučuju jetra i crijeva. Većina lipida potječe iz površinskih slojeva hilomikrona i lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL) koji se oslobađaju tijekom lipolize. HDL pribavlja kolesterol i iz perifernih tkiva, štiteći kolesterolsku homeostazu stanica. Opisane su dvije podskupine čestica, HDL2 i HDL3. Dominantni apolipoproteini u česticama HDL su apoA-I i apoA-II. Jedna od temeljnih uloga HDL-a je redistribucija kolesterola između stanica i lipoproteina. Ovaj proces se naziva reverzni prijenos kolesterola. HDL preuzima kolesterol iz stanica i prenosi ga u jetru ili u druge stanice u kojima je kolesterol potrebit u sintetskim procesima. (Katzung i sur., 2011; Kujundžić i sur., 2003).

Jedna od dodatnih uloga HDL čestice je antioksidativna i protuuplana. Izolirani HDL može smanjiti razinu hidroperoksida masnih kiselina određene molekularne mase vezanih na LDL česticu. Zanimljivo je da rekonstruirane čestice koje sadrže apolipoprotein A-1 (apoA-I) mogu rekapitulirati neke od aktivnosti HDL-a. Danas se smatra da postoji veliki broj subpopulacija HDL čestica koje su sagrađene od niza specifičnih proteina koji toj subpopulaciji daju niz specifičnih funkcija. (Huang i sur., 2013).

Brojne studije ukazale su na blisku fiziološku povezanost između PON1 i HDL čestice. N- terminalni kraj PON1 esencijalan je za vezanje na HDL česticu. James i sur. pretpostavili su teoriju HDL posredovanog oslobađanja PON1 iz stanice. HDL je na stanice vezan pomoću SR-BI receptora. PON1 se nakon sinteze prebacuje na vanjsku stranu stanične membrane gdje ga skuplja HDL čestica. Vektorska uloga HDL-a omogućuje prenošenje enzima cirkulacijom u hidrofobnom dijelu lipoproteina nudeći mu tako stabilnost i nativnu konformaciju. Hidrofobno okruženje lipoproteina moglo bi biti važno za samu funkciju enzima. Zauzvrat, PON1 spriječava ili ograničava oksidaciju HDL-a kao glavnog prijenosnika primarno oksidiranih lipida u plazmi. Štoviše, nedavne studije sugeriraju da PON1 utječe na koncentraciju HDL-a u sistemskom krvotoku. Međutim, te studije su provedene na pacijentima koji boluju od obiteljske hiperkolesterolemije s velikim rizikom od razvoja ateroskleroze. Antioksidacijsko i antiaterogeno djelovanje HDL čestice pripisuje se stoga

proteinima koji se nalaze na HDL-u, a jedan od njih je i PON1. (Garin i sur., 2014; Rajković i sur., 2011).

PON1 je prvenstveno odgovorna za antioksidativna svojstva HDL-a u sprječavanju oksidacije lipoproteina niske gustoće (LDL) i staničnih membrana (slika 5.). Moduliranjem oksidacije LDL-a, PON1 spriječava stimuliranu indukciju monocit-kemotaksičnog proteina1 proizvedenu od strane endotelnih stanica, te na taj način preventira interakciju monocita i endotelnih stanica u jednoj od najranijih faza ateroskleroze. Kod šećerne bolesti dolazi do inverznog odnosa između razine aktivnosti PON1 i oksidiranog LDL-a. Nedavna istraživanja na mišjem modelu kod kojeg je pretjerana ekspresija humane PON1 postignuta adenovirusom pokazuju značajnu inhibiciju razvoja ateroskleroze smanjivanjem oksidiranog LDL-a u plazmi i stijenkama arterija. (Mastorikou i sur., 2008).



Slika 5 - Antioksidacijsko djelovanje PON1 u aterosklerotičkom plaku. Apolipoprotein A-I (Apo A-I), prijenosnik estera kolesterola (CETP), lipoprotein visoke gustoće (HDL), lipoprotein niske gustoće (LDL), oksidirani lipoprotein niske gustoće (LDLox), jetrena lipaza (HL), lipoprotein lipaza (LPL), paraoksonaza 1 (PON1), reaktivne kisikove vrste (ROS), trigliceridi (TG), lipoprotein vrlo niske gustoće (VLDL). (Tomas i sur., 2004).

4.1.3. Aktivnost PON1 i ne genski čimbenici

Postoje značajne interindividualne varijacije u aktivnosti PON1 u populaciji, što ukazuje na mogućnost da pojedinci koji imaju niže razine PON1 mogu lakše razviti određeno patološko stanje pod utjecajem okolišnih čimbenika. Niz istraživanja potvrdilo je ovu tvrdnju da genetski i okolišni čimbenici iznimno utječu na aktivnost i koncentraciju ovog enzima. (Rainwater i sur., 2009).

Pušenje je jedan od glavnih čimbenika rizika za razvoj kardiovaskularnih poremećaja. Oksidativni stres smatra se glavnim patološkim mehanizmom povezanim sa pušenjem. Nekoliko studija ukazalo je na povećanu osjetljivost LDL čestica na oksidaciju kod osoba koje puše. Međutim, pušenje ne utječe na oksidativni stres samo proizvodnjom reaktivnih radikala kisika iz duhanskog dima već smanjuje sposobnost antioksidativnih obrambenih mehanizama. Pušenje duhana povezano je sa niskom razinom aktivnosti PON1 u pacijenata sa koronarnom bolesti arterija, a ekstrakt duhanskog dima inhibira PON1 u *in vitro* uvjetima. Mouhamed i sur. pročavali su utjecaj pušenja na aktivnost PON1 u serumu. Koncentracija HDL kolesterola i PON1 aktivnost bili su sniženi kod pušača u odnosu na nepušače. Također, pušači su imali iznimno visoke razine triglicerida i LDL kolesterola. Smanjenu aktivnost PON1 u serumu pušača može objasniti učinak nekoliko stotina komponenata duhanskog dima od kojih najveći utjecaj na smanjenje aktivnosti imaju razni reaktivni aldehidi kao što su acetaldehid, formaldehid, α,β-nezasićeni aldehidi te aromatski ugljikovodici. Minimalne informacije dostupne su o mehanizmu djelovanja duhanskog dima na molekularnoj razini. Pretpostavlja se da inhibcija PON1 duhanskim dimom može biti uzrokovana prostornim smetnjama uslijed uvođenja velikog supstituenta na područja koja su odgovorna za održavanje stabilnosti i nativne konformacije PON1. (Mouhamed i sur., 2012).

Prema nekoliko provedenih studija zaključeno je da povećanje razine cirkulirajućih radikala izaziva smanjenu antioksidativnu obranu uključujući i razinu vitamina kod šećerne bolesti. Uzimajući u obzir sudjelovanje oksidativnog stresa i smanjenje aktivnosti PON1 u razvoju šećerne bolesti, moguće je da povećanje razine komponenata antioksidativne obrane može spriječiti inaktivaciju PON1 (tablica 2.). Vitamin E i selen kao mikronutrijenti imaju antioksidativna svojstva te štite tijelo od destruktivnih učinaka slobodnih radikala. Ghaffari i sur. proučvali su aktivnost PON1 u štakorima kod kojih je šećerna bolest izazvana streptozotocinom te aktivnost PON1 nakon četverotjedne suplementacije selenom i

vitaminom E. Pokazano je da se PON1 aktivnost smanjuje za 80% *in vitro* u stanjima oksidativnog stresa i da vitamin E može zaštiti PON1 od gubitka aktivnosti. Zaključak studije je da vitamin E i selen povećavaju aktivnost glutation peroksidaze i eritrocitne superoksid dismutaze te na taj način pomažu antioksidativnoj obrani i indirektno povećavaju aktivnost PON1. (Ghaffari i sur., 2011).

Konzumacija maslinovog ulja povećava postprandijalnu serumsku aktivnost PON1 kod dijabetičara osobito ženskog spola. Konzumacija mediteraskih obroka obogaćenih monozasićenim masnim kiselinama povećava PON1 aktivnost postprandijalno za 16 %, slični rezultati dobiveni su nakon primjene ω-3 polinezasićenih masnih kiselina u skupini osoba s obiteljskom kombiniranom hiperlipidemijom. Međutim, ω-3 polinezasićene masne kiseline mogu nakon kronične primjene povećati razinu reaktivnih kisikovih radikala koji inaktiviraju PON1. *In vitro* studije su pokazale da oleinska kiselina štiti organizam od oksidativnog stresa i inaktivacije PON1, dok polienske masne kiseline imaju suprotan učinak. (Costa i sur., 2011).

Umjerene količine alkohola imaju protektivnu ulogu od razvoja kardiovaskularnih poremećaja regulirajući razinu HDL kolesterola. Ranije izvedene *in vitro* studije pokazale su da alifatski alkoholi uključujući i etanol snizuju aktivnost PON1 u serumu. Nasuprot tome, dvije naknadne studije u ljudi dokazale su da umjerna konzumacija alkohola (~40g/dan tokom tri tjedna) izaziva blagi porast (5-10%) serumske aktivnosti PON1. Na molekularnoj razini sugerirana je teorija učinka etanola na protein kinazu C (PKC) koja ima sposobnost fosforilacije proteina Sp1 i regulacije njegovog vezanja na promotorsku regiju *pon1* gena. Za razliku od umjerenog konzumiranja alkohola, opijanje alkoholom dovodi do suprotnog učinka, odnosno značajnog pada PON1 aktivnosti. Kod ljudi potrošnja alkohola u količini od 80 g/dan kroz osam tjedana dovodi do smanjenja serumske aktivnosti PON1 za čak 45%. (Costa i sur., 2011).

Tas i sur. proučavali su utjecaj suplementacije vitamina B6 (piridoksin, piridoksa, piridoksamin) na paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost PON1 kod štakora kod kojih je šećerna bolest izazvana streptozotocinom. Vitamin B6 je učinkovit kao piridoksal-fosfat (PLP), koji se u prisutnosti oksidaze, kinaze, cinka i magnezija sintetizira iz svih triju oblika i ATP-a. PLP je uključen u metabolizam mnogih aminokiselina, djelujući kao prostetička skupina mnogih aminotransferaza, dekarboksilaza, racemaza, aminooksidaza, dehidraza, hidrolaza i sintetaza. Rezultati provedene studije ukazuju na to da, osim oksidativnog stresa i drugih metaboličkih promjena, šećernu bolest prati smanjena razina vitamina B6.

Suplementacija vitaminom B6 smanjuje oksidativni stres i povećava paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost PON1 direktno djelujući na enzim ili indirektno smanjivanjem oksidativnog stresa. (Tas i sur., 2014).

Nedavno je provedena studija u kojoj se razmatrao utjecaj ekstrakta sjemenki grožđa (GSE) na serumsku aktivnost PON1 kod štakora kod kojih je šećerna bolest izazvana streptozotocinom. GSE sadrži biološki aktivne polifenolne za koje je dokazano da sudjeluju u mnogim biološkim i farmakolškim procesima odgovornim za smanjivanje oksidativnog stresa. Također, dokazano je da polifenoli iz GSE imaju snažniji učinak na inaktivaciju slobodnih radikala nego suplementacija vitaminom C i E. Rezultati studije ukazali su da nakon tretiranja bolesnih životinja s GSE aktivnost PON1 naglo raste. Ovaj dokaz sugerira da GSE može biti koristan za terapiju dijabetičara sa sniženom aktivnošću PON1. (Kıyıcı i sur., 2009).

Nekoliko provedenih studija istraživalo je učinak derivata fibrične kiseline na serumsku aktivnost PON1. Najvažniji učinak fibrata je porast oksidacije masnih kiselina u jetrima i u skeletnim mišićima. Osim toga povisuju razinu apoA-I i apoA-II, a snizuju razine apoC-III, inhibitora lipolize. Uočeno je da terapija gemfibrozilom povećava PON1 aktivnost za 18-49% u bolesnika s tip 2 šećernom bolesti. Aviram i sur. uočili su da aktivnost serumske PON1 povećava metabolit gemfibrozila u izoliranim HDL česticama. (Costa i sur., 2011).

Meta mnogih istraživanja su i antidijabetici i njihov utjecaj na aktivnost PON1. Roziglitazon (tiazolidindion) je ligand receptora za aktivator proliferacije peroksisoma-gama (PPAR-γ) koji pripada superporodici steroidnih i tiroidnih nuklearnih receptora. PPAR-γ receptori moduliraju ekspresiju gena uključenih u metabolizam lipida i glukoze, prijenos signala potaknutih inzulinom, te diferencijaciju adipocita i drugih stanica. Utvrđeno je da roziglitazon uzrokuje blagi porast postprandijalne serumske aktivnosti PON1 (9-13%) u bolesnika sa šećernom bolesti. Slično povećanje aktivnosti PON1 (21%) potvrđeno je i kod zečeva liječenih roziglitazonom kroz šest tjedana (0.32 mg/kg/dan). (Costa i sur., 2011; Katzung i sur., 2011).

Pokazalo se da mnogi drugi lijekovi utječu na serumsku aktivnost PON1 (tablica 3.). Atropin kao antagonist muskarinskih receptora inhbira humanu PON1 u *in vitro* uvjetima pri visokim koncentracijama. Određeni antibiotici, ampicilin, ciprofloksacin i klindamicin sulfat također inhibiraju pročišćenu humanu PON1. Antitumorski lijek ciklofosfamid uzrokuje povećanje renalne aktivnosti PON1 u štakora, a povećanje aktivnosti rezultat je

kompenzacijskog mehanizma zbog oksidativnog stresa uzrokovanog lijekom. Oralni kontraceptivi (desogestrel u kombinaciji s etinil estradiolom) značajno smanjuju jetrenu aktivnost PON1 u ljudi, dok je kod miševa povećavaju. (Costa i sur., 2011).

Antioksidans	Povišenje PON1 aktivnosti
Vitamin C, Vitamin E	7 – 80%
Kvercetin	30 – 200%
Zeleni čaj	17 – 40%
Ekstrakt sjemenki grožđa	21 – 87%
Borovnice	25%
Sok od šipka	20 – 80%
Datulja	15%
Protandim	35%

Tablica 2 – Antioksidansi koji povećavaju aktivnost i ekspresiju PON1 kod ljudi. (Costa i sur., 2011).

Lijekovi	Povišenje aktivnosti PON1
Kardiovaskularni lijekovi	
Statini (simvastatin, atrovastatin)*	**5 – 23%**
Fibrati (gemfibrozil, fenofibrat)*	**18 – 59%**
Probukol	**50%**
Ezetimib	**32%**
Aspirin*	**13%**
Antidijabetici	
Roziglitazon	**10 – 67%**
Eplerenon	**60%**
Derivati sulfonilureje (glimepirid, glimenklamid)	**28 – 64%****
Ostali lijekovi	
Eritropoietin beta	**23%**

Tablica 3 – Lijekovi koji povećavaju aktivnost i ekspresiju PON1 kod ljudi. (Costa i sur., 2011).

4.1.4. Polimorfizmi PON1

Ranije studije koje su ispitivale aktivnost PON1 u plazmi na velikoj skupini ispitanika otkrile su polimorfnu aktivnost samog enzima. S obzirom na rezultate ispitivanja pojedinci su se mogli klasificirati s obzirom na razinu aktivnosti PON1. Molekularna osnova za polimorfnu aktivnost PON1 je razjašnjena nakon izolacije i izvršene sekvencije cDNA *pon1* gena. Iako postoji više od 250 polimorfizama *pon1* gena, većina istraživanja bavi se proučavanjem nekoliko funkcionalnih polimorfizama Q192R, L55M, -108C>T i -162A>G. (Costa i sur., 2006).

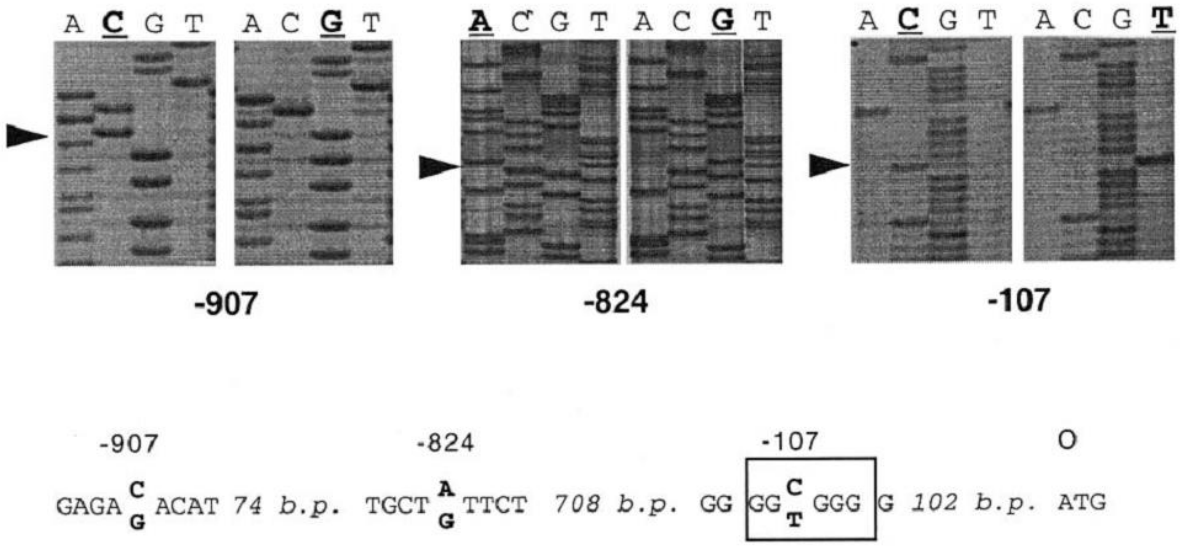
Pon1 gen ima preko 160 polimorfizama, a dva najčešće proučavana polimorfizma u kodirajućoj regiji gena su Q192R i L55M. Kod Q192R polimorfizma dolazi do supstitucije glutamina (Q) arigininom (R) na poziciji 192 te je posljedica promjene kodona CAA u CGA na egzonu 6 unutar *pon1* gena. Kod L55M polimorfizma dolazi do promjene kodona TTG u ATG na egzonu 3 unutar *pon1* gena čija je posljedica supstitucija aminokiseline leucina metioninom na poziciji 55. Posljedica ovih funkcionlnih polimorfizama je varijabilna aktivnost PON1 između pojedinaca i unutar populacije. (Costa i sur., 2006; Rajković i sur., 2009).

Polimorfizam Q192R je najviše istraživan polimorfizam *pon1* gena jer aloenzimi Q192 i R192 imaju drugačiji afinitet i katalitičku aktivnost prema različitim supstratima. Aloenzim R192 hidrolizira paraokson šest puta brže u odnosu na Q192 aloenzim, dok s druge strane aloenzim Q192 puno brže hidrolizira soman, sarin i diazokson. Nadalje, ova dva aloenzima imaju drugačiji katalitički učinak na neke od laktona i karbonilnih estera. Naprimjer, aloenzim Q192 brže hidrolizira angeliolakton i O-valerolakton, dok je aloenzim R192 učinkovitiji kod hidrolize γ-butirolaktona i tiolaktona. Q192R polimorfizam ima veliku ulogu u zaštiti LDL lipoproteina od oksidacijskog djeovanja slobodnih radikala i prevenciji razvoja KVB. Aloenzim Q192 je u *in vitro* studijama pokazao veću učinkovitost u antioksidativnoj obrani lipoproteina. (Rajković i sur., 2009).

Velike populacijske studije ukazale su na velike varijacije u frekvenciji alela za PON1 Q192R polimorfizam na etničkoj razini. Draganov i sur. ukazali su na dominaciju Q192 polimorfizma na području sjeverne i zapadne Europe, dok R192 polimorfizam prevladava unutar azijske i afričke populacije. Rezultati upućuju da je varijacija u alelilma posljedica izloženosti okolišu i pesticidima. (Mackness i sur., 2008).

Polimorfizam L55M ne utječe na interakciju enzima sa supstratima, ali ima utjecaja na razinu mRNA te koncentraciju i aktivnost PON1. Studije su pokazale da ispitanici koji imaju aloenzim M55 imaju nižu aktivnost i koncentraciju PON1 u krvi. Međutim, pokazalo se da je M55 aloenzim bitniji u zaštiti LDL-a od oksidacijske modifikacije slobodnim radikalima. Nadalje, utvrđeno je da je polimorfizam L55M usko vezan s polimorfizmima promotorske regije te na taj način utječe na modulaciju eskpresije samog enzima. L55 aloenzim otporniji je na proteolizu, što se može objasniti povezanošću samog aloenzima s velikom koncentracijom PON1 u krvi. (Rajković i sur., 2009).

Veliki dio istraživanja provedenih do danas bilo je usredotočeno na polimorfizme pojedinačnog nukleotida (SNP, eng. *single nucleotide polimorphism)* promotorske regije *pon1* gena. Najviše izučavani polimorfizmi (slika 6.) nalaze se na položajima **-909 (C/G), -823 (A/G)**, **-162 (A/G)**, **-126 (C/G)** i **-108 (C/T)**. Genotipizacijom pojedinaca utvrđeno je da razlike u aktivnosti promotorske regije posljedično uzrokuju promjene u koncentraciji i aktivnosti PON1. Nadalje, haplotipska analiza provedena na dvije populacije ukazala je da polimorfizam -108C>T najviše doprinosi serumskoj varijaciji (23-24%) PON1 u ispitanika. Postoji mali doprinos i polimorfizma -162A>G, međutim polimorfizmi -109C>G i -823A>G nemaju nikakav doprinos pri varijabilnosti koncentracije i aktivnosti PON1 u serumu. -108C>T polimorfizam smješten je u promotorskoj regiji gena na mjestu vezivanja transkripcijskog faktora Sp1. U prisutnosti -108>T varijante vezno mjesto za Sp1 je narušeno što posljedično utječe na aktivnost promotorske regije *pon1* gena. (Mackness i sur., 2008).



Slika 6- Najčešći polimorfizmi promotorske regije *pon1* gena. Polimorfizmi pojedinačnog nukleotida prikazani su podebljano, a njihove pozicije označene su strelicama. Numeriranje je određeno PON1 startnim kodonom (desno). Moguće vezno mjesto za transkripcijski faktor Sp1 je uokvireno. (Leviev i sur., 2000).

4.2. OKSIDACIJSKI STRES I POVEZANOST SA ŠEĆERNOM BOESTI

4.2.1. Oksidacijski stres

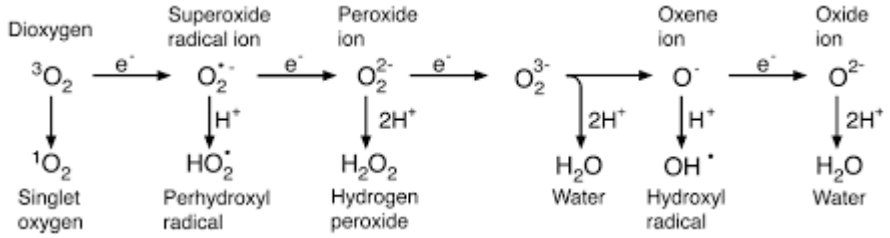
Prema definiciji, oksidacijski stres označuje pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama prema oksidaciji, ili prekomjernom stvaranju radikala, odnosno gubitk ravnoteže stvaranja radikala i mogućnosti stanice da ih ukloni antioksidacijskim sustavom. (Štraus i sur., 2009).

Za vrijeme normalnog staničnog metabolizma antioksidacijski sustavi obrane reagiraju s nastalom količinom slobodnih radikala i održavaju fiziološku homeostazu. No u nekim patološkim stanjima dolazi do povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva tako da je kapacitet citoprotektivnih enzima i antioksidansa nedovoljan. (Štraus i sur., 2009).

Slobodni radikali predstavljaju kemijske vrste koje imaju jedan nespareni elektron u vanjskoj orbitali. Budući da imaju nespareni elektron oni su obično visokoreaktivne elektrofilne vrste koje napadaju različita mjesta npr. dvostruke ugljik-ugljik veze u polinezasićenim masnim kiselinama, stvarajući tako dodatne intermedijere slobodnih radikala. Takva je veza izuzetno reaktivna i nestabilna te, da bi sparili svoj slobodni elektron i time stvorili stabilan spoj, stupaju u reakcije s anorganskim ili organskim spojevima, kao proteinima, lipidima, ugljikohidratima te nukleinskim kiselinama. Priroda reakcija slobodnih radikala s neradikalima obično je takva da se nastavlja kao lančana reakcija, jedan radikal stvara drugi radikal te se pojačava daljnje oštećenje. Nespareni elektron može se povezivati s gotovo svim atomima, ali su od najvećeg biološkog interesa atomi kisika, dušika i ugljika. (Štraus i sur., 2009).

U potencijalno aktivne kisikove spojeve (ROS –eng. reactive oxygen species) ubrajaju se superoksidni radikal, hidroperoksilni radikal, vodikov peroksid, peroksilni radikal, singlet kisik (slika 7.). Reaktivni dušikovi spojevi (eng. reactive nitrogen species; RNS) također spadaju u grupu slobodnih radikala. U tu skupinu spada dušikov oksid (NO) koji se sintetizira u endotelnim, živčanim i upalnim stanicama, a nastaje iz L-arginina katalitičkim djelovanjem dušik oksid sintetaze. Sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka, inhibiciji agregacije trombocita, staničnoj signalizaciji u centralnom živčanom sustavu i proliferaciji glatkih

mišićnih stanica, ali je i toksičan, Međutim, u nizu provedenih studija pokazao se njegov toksičan učinak tijekom kronične upale, mozgovnog infarkta i septičnog šoka. U reakciji s peroksidom stvara vrlo toksičan peroksinitrit koji može potaknuti lipidnu peroksidaciju. (Halliwell i sur., 1999; Štraus i sur., 2009).



Slika 7 – Stvaranje raznih ROS redukcijom jednovalentnog triplet kisika. (Rodriguez, 2005).

Zbog potencijalno velike mogućnosti stvaranja slobodnih radikala organizam je razvio brojne prirodne mehanizme obrane od štetnog djelovanja ROS. Potencijalnu toksičnost tih vrsta u fiziološkim uvjetima, sprječava velik broj citoprotektivnih enzima i antioksidansa. Antioksidansom se smatra spoj, koji prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na spoj koji se oksidira, znatno odgađa ili spriječava oksidaciju te tvari. Najvažniji citoprotektivni enzimi u organizmu su superoksid dismutaza (SOD), katalaza i glutation peroksidaza. (Štraus i sur., 2009).

Lipidna peroksidacija predstavlja složen niz reakcija razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina (eng. polyunsaturated fatty acid; PUFA), a potaknuta je ROS i RNS. Lipidi svih bioloških membrana građeni su od višestruko nezasićenih masnih kiselina koje su osjetljive na oštećenja uzrokovana ROS. U fiziološkim uvjetima enzimatskom oksidacijom PUFA nastaju produkti koji djeluju kao medijatori upale. Lipidna peroksidacija dovodi do poremećaja strukture, a posljedično tome i funkcije same stanične membrane što je povezano s mnogim patološkim stanjima. Završni produkti lipidne peroksidacije su reaktivni aldehidi. Najčešći je 4-hidroksialkenal (HNE), ali i drugi srodni α,β-nezasićeni aldehidi. Njihova je reaktivnost nešto niža nego primarnih radikala, ali dovoljno velika da mogu ošetiti okolinu u kojoj se kreću. (Yamamoto i sur., 1992).

Nije još uvijek jasno uzrokuju li ROS *per se* neku specifičnu bolest, premda je jasno da imaju ulogu u patogenezi mnogih kliničkih stanja. Poznato je, da u mnogim bolestima dolazi do povećana stvaranja ROS, sekundarno na proces primarne bolesti, što istodobno pridonosi komplikacijama mnogih kroničnih bolesti. Pretpostavlja se da inicijacijski stupanj u razvoju karcinoma uključuje neke temeljne promjene genskog materijala stanice, zbog karcinogena vjerojatno u kombinaciji s djelovanjem slobodnih radikala. Cijepanje DNA s ROS (npr. hidroksilnim radikalima) uzrokuje nastajanje baznih adukata, ponajprije 8-hidroksigvanina, što rezultira mutagenezom, karcinogenezom i smrću same stanice. Značajni su dokazi da se oštećenje ishemičnog tkiva pojavljuje gotovo isključivo za vrijeme reoksigenacijske faze, a da je oštećenje uzrokovano navalom superoksidnog radikala koji se stvara kada kisik ponovno ulazi u ishemično tkivo. Nadalje, pri upalnim reakcijama, popratnom stanju mnogih bolesti, limfociti, granulociti i makrofagi stvaraju razne upalne stimulanse, uključujući prostaglandine i ROS, koji tkivno oštećenje čine trajnim. (Štraus i sur., 2009).

Nadalje, poznato je da su endotelne stanice osjetljive na oštećenja zbog ROS i lipidnih hidroperoksida. Tako lipidni hidroperoksid prisutan u lipoproteinima plazme može pridonijeti inicijalnom oštećenju endotela. Makrofagi imaju važnu ulogu u razvoju aterosklerotičkih oštećenja. Aktivirani monociti i makrofagi mogu oštetiti susjedne endotelne stanice lučenjem superoksida, vodikova peroksida i hidrolitičkih enzima, dok faktori koje otpuštaju makrofagi mogu stimulirati proliferaciju glatkih mišićnih stanica. Prema tome, oksidativni stres bi mogao biti glavni uzrok aterogene modifikacije LDL-a. Oksidacija LDL čestice biomarker je rane faze ateroskleroznih poremećaja. Nekoliko studija pokazalo je da PON1 štiti LDL i HDL čestice od djelovanja slobodnih radikala kao medijatora oksidativnog stresa. Aslan i sur. proveli su studiju u kojoj su potegli usporedbu između aktivnosti serumske PON1 i razine lipidnih hidroperoksida u pretilih ljudi. Rezultati su ukazali da povećana razina lipidnih peroksida kao biomarkera oksidativnog stresa koreliraju sa sniženom aktivnošću serumske PON1. (Aslan i sur., 2011; Štraus i sur., 2009).

4.2.2. Tip 1 Šećerne bolesti

Šećernu bolest tipa 1 (5–10% oboljelih), koja se najčešće pojavljuje u djetinjstvu, karatkterizira apsolutni manjak inzulina koji nastaje kao posljedica djelovanja autoreaktivnih limfocita T, odnosno kao posljedica lučenja autoantitijela na pojedine komponente β – stanica ili na molekulu inzulina. Većina, oko 80–90 % posto oboljelih, ima autoantitijela koja se mogu pojaviti u cirkulaciji već nekoliko mjeseci pa i godina prije pojave samih simptoma bolesti. To su ICA (od eng. islet cell antibodies), antitijela protiv stanica gušteračinih otočića, IAA (od eng. insulin autoantibodies), antitijela protiv inzulina, GADA (od eng. glutamic acid decarboxylase autoantibodies), antitijela protiv dekarboksilaze glutaminske kiseline te antitijela protiv tirozinske fosfataze, IA-2A i IA-2βA (od eng. tyrosine phosphatase autoantibodies). (Štraus i sur., 2009).

To je autoimunsoni tip 1 šećerne bolesti. Bolesnici u kojih se takva autoantitijela u krvi ne mogu dokazati svrstavaju se u idiopatski tip 1 šećerne bolesti. Deset do dvanaest posto odraslih, koji imaju fenotipske značajke tipa 2 šećerne bolesti, također u krvi imaju prisutna autoantitijela, posebno GADA, te se ubrajaju u podskupinu tipa 1, nazvanu LADA (od eng. latent autoimmune diabetes of adulthood). (Štraus i sur., 2009).

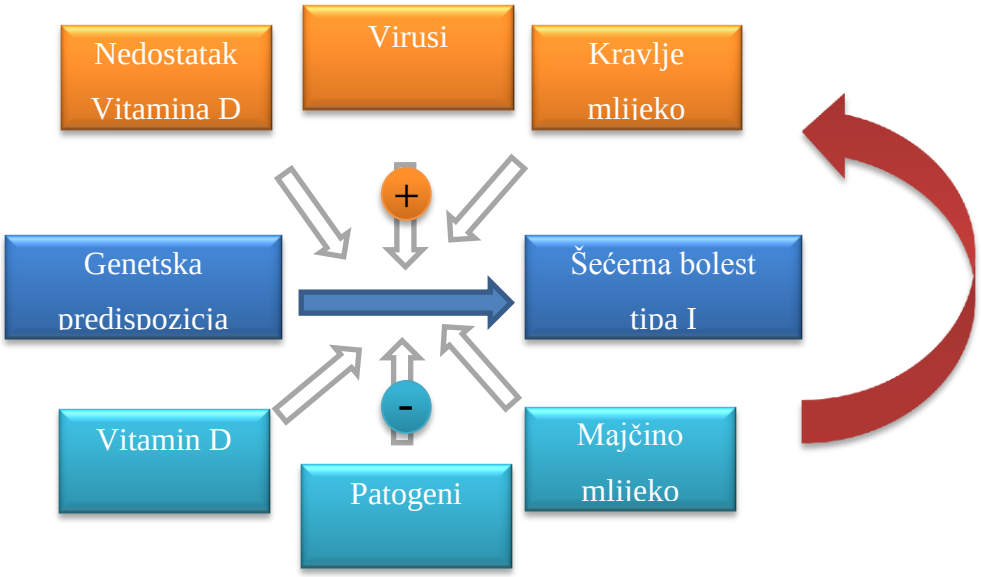
Također pretpostavlja se da ovaj oblik bolesti nastaje u genetski sklonih osoba koje su izložene čimbenicima okoliša (slika 8.) koji mogu započeti autoimuni odgovor. Priroda tih čimbenika okoliša nije poznata, a pretpostavlja se da su to virusi, toksini ili neke komponente iz prehrane. Kad je jednom započet proces nastavlja se razaranje β-stanica koje progresivno propadaju tijekom godina. Brzina propadanja je promjenjiva ovisno o tome u kojem je periodu života propadanje počelo.

Klinička slika se ispolji kada iz nekog razloga (najčešće akutne infekcije) poraste potreba za inzulinom. Tu pojačanu potrabu se ne može kompenzirati jačim lučenjem inzulina. Razvija se klasična slika dekompenzirane šećerne bolesti: žeđ, umor, pojačano mokrenje, gubitak težine bez obzira na apetit i uzimanje hrane. U takvoj slici obično nema dijagnostičkih dilema: dijagnozu će potvrditi visoka glikemija s mogućim razvojem ketoacidoze.

Kod pacijenata sa šećernom bolesti tipa 1 liječenje zahtjeva intenzivnu egzogenu primjenu inzulina. (Katzung i sur., 2011).

Najnovije strategije u liječenju tipa 1 šećerne bolesti usmjerene su na imunosupresivnu terapiju kako bi se smanjio autoimuni odgovor, na transplataciju β-stanica koje proizvode inzulin, te na gensku terapiju, odnosno terapiju matičnim stanicama (od eng. stem cell therapy) koja na neko vrijeme uklanja potrebu za inzulinom. (Štraus i sur., 2009).

Uz glikemiju, treba nadzirati i ostale rizike nastanka komplikacija: bar jednom godišnje mikroalbuminuriju. Pojavi li se treba početi za uzimanjem ACE- inhibitora, jednom godišnje pregled očne pozadine radi detekcije retinopatije, jednom godišnje kontrola lipida radi pravovremenog početka terapije statinom, trajna kontrola krvnog tlaka s ciljnom vrijednosti 130/80 mmHg. (Štraus i sur., 2009).



Slika 8 – Cjelokupni prikaz utjecaja genetičkih i okolišnih faktora na razvoj tip 1 šećerne bolesti. (Egro, 2013).

4.2.3. Tip 2 Šećerne bolesti

Šećerna bolest tipa 2 najčešće se pojavljuje u odraslih (90% oboljelih od šećerne bolesti pripada ovoj skupini). Svjetska zdravstvena organizacija objavila je da je danas u svijetu registrirano blizu 200 milijuna dijabetičara, a procjenjuje se da će se do 2025. godine broj povećati na 330 milijuna i to naročito u zemljama u razvoju. Najveći razlog tomu je nezdrav način života, a to prvenstveno uključuje prekomjernu i nezdravu prehranu, debljinu, smanjenu fizičku aktivnost i stres. (Tangvarasittichai, 2015).

Tip 2 šećerne bolesti predstavlja poremećaj metabolizma u kojem dolazi do inzulinske rezistencije tkiva ili poremećaja funkcije β-stanica gušterače, a čija je posljedica konstantna povišena razina glukoze u krvi pacijenta. Naime, smanjena osjetljivost perifernih tkiva na djelovanje inzulina dovodi do hiperinzulinemije kako bi se održala fiziološka koncentracija glukoze u krvi. Najčešći uzrok inzulinske rezistencije je visceralna pretilost. Visceralno masno tkivo sklonije je lipolizi od potkožnog masnog tkiva. Razgradnjom visceralnog masnog tkiva u krvotok se otpuštaju povećane količine faktora tumorske nekroze (TNF-α, eng. tumor necrosis factor) koji zatim potiče otpuštanje masnih kiselina koje sprječavaju preuzimanje glukoze iz cirkulacije. Posljedica ove reakcije je povećana glukoneogeneza u jetri, odnosno sinteza glukoze iz tvari koje nisu ugljikohidrati. (Hammed i sur., 2015; Štraus i sur., 2009).

Nedavne studije ukazale su na pozitivnu korelaciju između pretilosti i ekspresije gena koji kodiraju za proupalne i imunosne stanice. Naime, konstantno nakupljanje lipida u adipocitima dovodi do njihove postepene hipertrofije i pokretanja upalnog odgovora koji uključuje sinergistički doprinos više različitih mehanizama kao što su povećanje nuklearnog faktora κB i povećanje aktivnosti c-Jun NH2- terminalne kinaze. Nadalje, dolazi do hipoksije masnog tkiva, aktivacije TLR-receptora (eng. Toll-like receptors) zbog povećane koncentracije slobodnih masnih kiselina te povećane razine hilomikrona. Opterećeni adipociti luče razne kemokine i citokine čija je uloga da na mjesto upale dovedu makrofage. Svim tim mehanizmima raste upalno stanje organizma čija je posljedica smanjeno preuzimanje glukoze iz krvi. Na molekularnoj razini dolazi do nemogućnosti sjedanja inzulina na svoj tirozin kinazni receptor i posljedične autofosforilacije. U upalnom stanju aktiviran je niz drugih receptora kao što su receptori sa serin kinaznom aktivnošću. Aktivacijom ovih kinaza dolazi

do inhibicijskog djelovanja inzulina koji dovodi do autofosforilacije serinskih ostataka receptora umjesto tirozinskih. (Hammed i sur., 2015).

Klasični simptomi šećerne bolesti tipa 2 su porast volumena i protoka mokraće (poliurija), i žeđ (polidipsija). Poliurija se pojavljuje zbog povećanja koncentracije glukoze u glomerularnom filtratu. To inducira osmotsku diurezu, jer renalni prag za reapsorpciju glukoze u proksimalnom tubulu je prekoračen. Glukoza nastavlja dalje u Henlejevu petlju, distalni tubul i sabirni kanalić, pokazuje osmotsku snagu te reapsorpciju vode. Glukozurija dovodi do gubitka vode. Gubitak vode uzrokuje žeđanje koje dalje stimulira bolesnika da više pije. Gubitak težine je također česta pojava. Mokraća sadrži veće količine glukoze koja može inducirati infekcije mokraćnih putova. (Kujundžić i sur., 2003)

Liječenja šećerne bolesti tipa 2 postiže se oralnom terapijom antidijabeticima. (Katzung i sur., 2011).

4.2.4. Komplikacije šećerne bolesti

Komplikacije šećerne bolesti možemo podijeliti na akutne (nastaju brzo, dramatičnog su tijeka i zahtijevaju hitnu intervenciju) i kronične (nastaju polagano, mnoge su godinama bez simptoma, ali trajno oštećuju i uništavaju pojedine organe). (Štraus i sur., 2009).

Jedna od čestih akutnih komplikacija šećerne bolesti je hipoglikemija. Hipoglikemija označuje smanjenje koncentracije glukoze u krvi ispod normalnih vrijednosti. Klinički simptomi obično se očituju pri koncentraciji 2,5 mM i manjoj. U kojem će se obliku simptomi očitovati ne ovisi samo o koncentraciji glukoze već i o brzini smanjenja njezine koncentracije. U stanju hipoglikemije najosjetljivije je tkivo središnjeg živčanog sustava jer je ovisno o glukozi kao jedinom izvoru energije. Poremećaje uzrokovane hipoglikemijom možemo svrstati u dvije skupine. Prva skupina simptoma pojavljuje se kada dođe do naglog pada koncentracije glukoze u krvi, a uzrokovana je lučenjem adrenalina kao kontraregulacijskog hormona. Prati je blijedilo, znojenje, drhtanje, lupanje srca i uzemirenost. Drugoj skupini pripadaju simptomi poremećaja središnjeg živčanog sustava, a to su glavobolja, zamućenost vida, zbunjenost i usporena duševna aktivnost. Dijabetička ketoacidoza je opasna komplikacija šećerne bolesti do koje dolazi zbog manjka inzulina. Naime, uslijed manjka inzulina intracelularni intermedijarni metabolizam skreće u pravcu povišenog stvaranja ketonskih tvari, a to izaziva poremećaj metabolizma vode i soli, koji prati svaku ketozu. Ketonski spojevi oštećuju središnji živčani sustav i uzrokuju komu. Gubitak svijesti nastaje kao toksički efekt poremećenog metabolizma stanica, gubitka vode, nastale acidoze i povišenja ketonskih tvari. Laktatna acidoza je najčešća metabolička acidoza, a nastaje zbog smanjenog iskorištavanja laktata. Laktat nastaje anaerobom glikolizom u hipoksičnom tkivu zbog nedostatka kisika. Nastali laktat nemože ući u ciklus limunske kiseline te se zbog toga odvodi u jetru koja ga iskorištava u procesu glukoneogeneze. Međutim, višak laktata ostaje u cirkulaciji i smanjuje pH arterijske krvi. (Gamulin i sur., 2005; Štraus i sur., 2009; Šercer i sur., 1967).

Kronične komplikacije šećerne bolesti posljedica su slabe kontrole i terapije same bolesti. Dijele se na mikroangiopatije (retinopatije, nefropatije, neuropatije) te makroangiopatije (moždani udar, ishemijske srčane bolesti, periferne vaskularne bolesti). (Štraus i sur., 2009).

4.2.5. Šećerna bolest i oksidativni stres

Mnoga istraživanja pokazala su da pacijenti s tip 2 šećernom bolesti imaju visoke razine ROS produkata u cirkulacij te da su im antioksidacijski ombrambeni mehanizmi oslabljeni. Pretpostavlja se da su upravo ROS produkti uzrok nastajanja mnogih patoloških puteva u pacijenata s tip 2 šećernom bolesti kao što su heksaminski put, završni produkti uznapredovale glikacije AGE (eng. advanced glycation end-product) te formiranje protein kinaze C beta 1 (PKCβ1). (Tangvarasittichai, 2015).

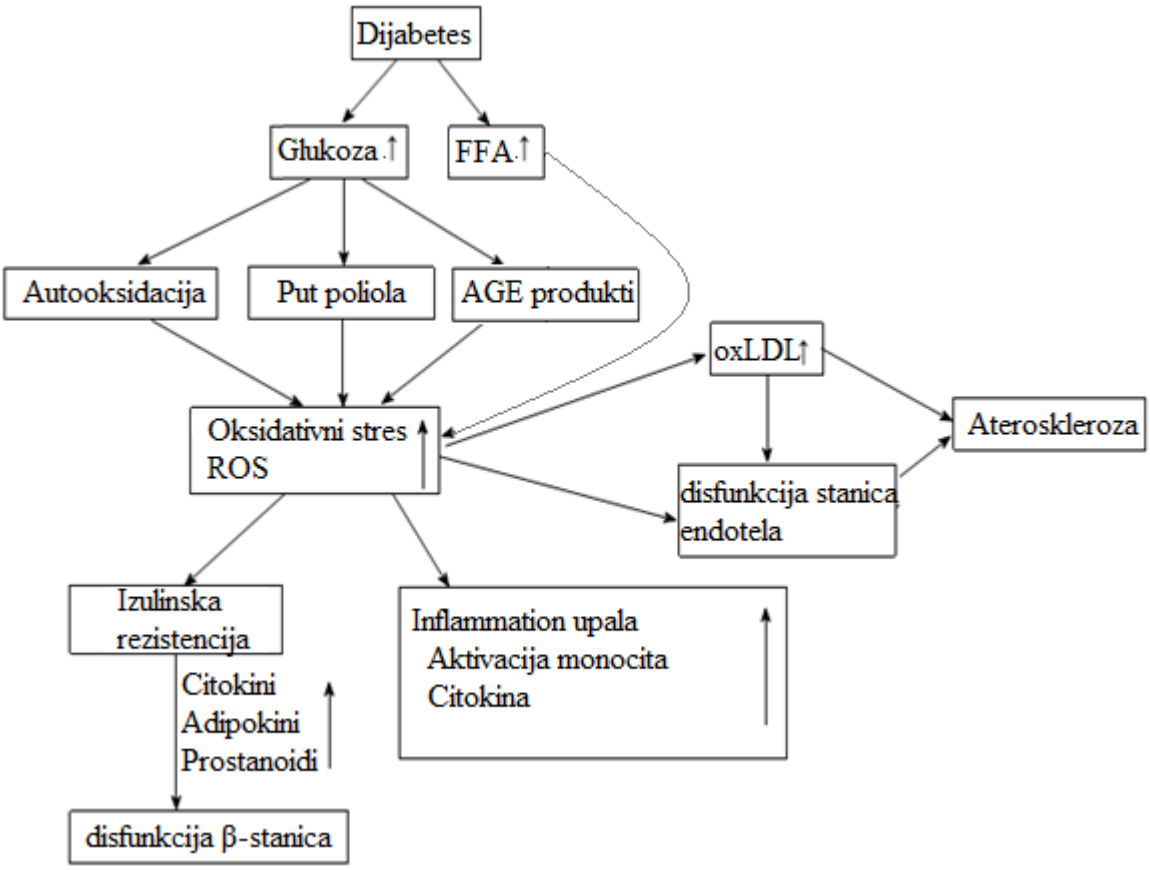
Hiperglikemija može bit uzrok nastajanja ROS produkata na nekoliko različitih načina (slika 9.). Autooksidacija glukoze, put poliola, formiranje AGE i PKCβ1 su mehanizmi čiji uzrok može biti povišena razina glukoze u krvi. Nadalje, povišena razina masnih kiselina, leptina i ostalih cirkulirajućih faktora mogu biti uzrok pretjeranom stvaranju slobodnih radikala. (Tangvarasittichai, 2015).

Hiperglikemija može uzrokovati povećani metabolizam glukoze što dovodi do povećanja nikotin adenin dinukleotida (NADH) i flavin adenin dinukleotida (FADH2), spojeva koji posreduju u prijenosu elektrona unutar mitohondrija prilikom sinteze adenin trifosfata (ATP). Hiperprodukcija NADH može potaknuti veći gradijent protona unutar mitohondrija. Posljedica toga je veća redukcija kisika, odnosno veća proizvodnja superoksida. Mnoge strukture i biokemijske komponente u cirkulaciji bolesnika s tip 2 šećernom bolesti promijenjene su zbog aktivacije PKCβ1 putem diacilglicerola. Aktivirana PKCβ1 pokreće niz reakcija koje slabe kontraktilnost i propusnost endotela, remete hemodinamiku i sintezu izvanstaničnog matriksa. AGE produkti nastaju reakcijom glikacije između bioloških amina (aminoskupina proteina) i karbonilne skupine reducirajućih ugljikohidrata. Ova reakcija naziva se Maillardovom reakcijom te je ovisna o koncentraciji glukoze u krvi. Produkti koji nastanu nakon ireverzibilnog vezanja glukoze za amino skupinu proteina su izrazito nestabilni i nazivaju se Schiffove baze te zbog svoje nestabilnosti prelaze u Amadori produkte. Nadalje, Amadori produkti su mnogo nestabilniji od same glukoze i prelaze u AGE produkte koji mijenjaju tercijarnu strukturu proteina, a posljedično tome samu funkciju proteina. Nakupljanjem AGE produkata kroz dulje vrijeme na stijenkama krvnih žila dovodi do stvaranja plakova i aterosklerotičkih ugrušaka koji mogu dovesti do zastoja cirkulacije i ishemije samog tkiva.(Štraus i sur., 2009, Tangvarasittichai, 2015).

Oksidativni stres igra veliku ulogu u razvoju inzulinske rezistencije. Istraživanja provedena na štakorima pokazala su da oksidativni stres povećava otpornost tkiva na inzulin. Nadalje, na eksperimentalnom modelu pokazalo se da superoksid dismutaza (SOD) može smanjiti otpornost na inzulin, a kod pretilih miševa kod kojih dolazi do hiperprodukcije slobodnih radikala primjena antioksidansa smanjuje otpornost na inzulin. (Tangvarasittichai, 2015).

U istraživanju provedenom na kulturi HIT-T15 i β-TC6 stanica koje su dugoročno bile izlagane visokim koncentracijama glukoze došlo je do smanjenog izlučivanja inzulina, inzulinske mRNA (eng. messenger RNA) te smanjenog vezivanja transkripcijskih faktora. Ovaj koncept mogao bi objasniti toksičan učinak glukoze (kod dugoročnog stanja hiperglikemije) na inhibiciju lučenja inzulina i ireverzibilno oštećenje β-stanica gušterače. Općenito u β-stanicama gušterače prekomjerni metabolizam glukoze će uvijek dovesti do povećanog stvaranja slobodnih radikala. Karakteristika samih β-stanica je da one sadrže malu količinu antioksidacijskih enzima kao što su SOD, katalza i glutation peroksidaza, pa su stoga i osjetljivije na ROS. (Tangvarasittichai, 2015).

U tip 2 šećernoj bolesti zbog povećane razine slobodnih masnih kiselina (FFA, eng. free faty acids) unutar β-stanica može također doći do stvaranja ROS i RNS, pa time i oštećenja same stanice. Oksidacijom FFA stvaraju se dugi lanci acil CoA koji mogu inhibirati mehanizam lučenja inzulina, točnije dolazi do inhibicije K+ ATP osjetljivih kanala. Također, prekomjernom hidrolizom FFA dolazi do usporene proizvodnje ATP-a, a posljedično tome i smanjene sekrecije inzulina. Treći važan mehanizam je da oksidacija FFA inducira povećanu sintezu NO, a time i povećano stvaranje RNS. (Tangvarasittichai, 2015).



Slika 9 – Sažeti prikaz povezanosti ROS i razvoja ateroskleroze kod pacijenata s tip 2 šećernom bolesti. (Tangvarasittichai, 2015).

4.3. PON1 i tip 1 Šećerne bolesti

Mnoge studije pokazale su da je aktivnost serumske PON1 niža kod pacijenata s tip 1 šećernom bolesti. Također, utvrđeno je da sniženu aktivnost PON1 u serumu kod pacijenata s tip 1 šećernom bolesti prati smanjena koncentracija i kvalitativne promjene HDL kolesterola u krvi. Antioksidativno djelovanje PON1 moglo bi biti korisno kod pacijenata s tip 1 šećernom bolesti gdje povećani oksidacijski stres uzrokuje razvoj karidiovaskularnih poremećaja (KVB). (Mackness i sur., 2002; Valabjhi i sur., 2001).

Mackness i sur. proveli su studiju u kojoj su mjerili aktivnost i koncentraciju serumske PON1 kod velike skupine ispitanika koji boluju od tip 1 šećerne bolesti u usporedbi s nasumično izabranom zdravom populacijom. Svi ispitanici poklapali su se samo u dobi, indeksu tjelesne mase i razini serumskog kolesterola. Rezultati istraživanja ukazali su na sniženu aktivnost serumske PON1 kod pacijenata s tip 1 šećernom bolesti u odnosu na zdrave ispitanike. Međutim, pokazalo se da je specifična aktivnost PON1 (omjer koncentracije i aktivnosti PON1) kod pacijenata s tip 1 šećernom bolesti povišena u odnosu na zdravu populaciju (tablica 4.). Razlog povišenja se ne zna i predmet je daljnjih istraživanja. Uzrok sniženoj aktivnosti PON1 može biti povećana glikacija samog enzima, iako su se osobe sa jednako sniženom aktivnošću PON1 u ovoj studiji razlikovale u postotku glikacije hemoglobina A1c (HbA1c). Nadalje, uzrok može biti i smanjena sinteza enzima u jetri ili povećani katabolizam. (Mackness i sur., 2002).

	Kontrolna skupina	*Pacijenti sa šećernom bolesti tipa 1*
Aktivnost PON1 (nmol min^{-1} mL^{-1} serum)	214·6 (26·3–620·8)	178·8 (51·7–479·1)*
Koncentracija PON1 (μg/mL)	89·1 (16·8–527·4)	72·0 (3·3–310·9)*
Specifična akt. PON1 (nmol min^{-1} μg^{-1})	2·11 (0·22–20·22)	2·66 (0·36–27·5)
PON1: Apo A1	2·08 ± 1·33	1·58 ± 0·92**
PON1: Apo B	2·74 ± 1·96	2·14 ± 1·38**

Tablica 4- Parametri PON1 u kontrolnoj skupini i skupini pacijenata s tip 1 šećernom bolesti. *Značajna razlika od kontrolnih ispitanika. (Mackness i sur., 2002).

U jednom od istraživnja mjerila se aktivnost serumske PON1 te razina lipidnih peroksida u pacijenata s tip 1 šećernom bolesti. Cilj je bio istražiti da li su ti parametri povezani s metaboličkom kontrolom i kasnim komplikacijama šećerne bolesti. Nakon provedenih mjerenja rezultati su ukazali na povišenu razinu triglicerida, glukoze, LDL kolesterola i HDL kolesterola u pacijenata s tip 1 šećernom bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, pacijenti su imali sniženu arilesteraznu aktivnost PON1 i povećanu razinu lipidnih peroksida. Između muških i ženskih ispitanika nije bilo razlike u arilesteraznoj aktivnosti PON1. Iako bi uočena visoka koncentracija HDL kolesterola trebala zaštititi stijenke krvnih žila, snižena aktivnost PON1 i povećana koncentracija lipidnih peroksida trebale bi imati suprotan učinak. Štoviše, niska aktivnost PON1 u ispitivanoj skupini sugerira na smanjeni antioksidativni i antiaterogeni učinak HDL-a, unatoč njegovim visokim koncentracijama u cirkulaciji. Nadalje, niska aktivnost samog enzima može se objasniti glikacijom katalitičkog centra PON1 i gubitka enzimske funkcionalnosti. Iako nema korelacije između aktivnosti PON1 i vrijednosti HbA1c, nagađa se da je kronična hiperglikemija uzrok inaktivacije PON1. (Wegner i sur., 2011).

Nema mnogo dokaza o povezanosti između niske aktivnosti PON1 i razvoja makroangiopatija kod bolesnika s tip 1 šećernom bolesti. Iako je niska aktivnost PON1 prediktor za razvoj ateroskleroznih poremećaja, u ovoj studiji nije bilo velike razilke u aktivnosti enzima između pacijenata s i bez kasnih dijabetičkih komplikacija. Također, utvrđena je povezanost između visoke razine lipidnih peroksida i indeksa tjelesne mase kod ispitanika ženskog spola. Uzrok tome je vjerojatno različita raspodjela masnog tkiva ovisno o spolu. Također, terpija inzulinom koji je anabolički hormon potiče veću lipogenezu kod ženskog spola, što bi značilo da je povišena razina lipidnih peroksida kod žena posljedica povećane lipogeneze. Aslan i sur. su ukazali na negativnu korelaciju između razine lipidnih peroksida i arilesterazne aktivnosti PON1 u pacijenata s tip 1 šećernom bolesti. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja koja bi dokazala da je niska aktivnost PON1 kod pacijenata s tip 1 šećernom bolesti posljedica slabijeg kapaciteta HDL kolesterola za vezanje PON1. (Aslan i sur., 2013; Wegner i sur., 2011).

Kalogerakis i sur. su istraživali utjecaj oksidativnog stresa te učinkovitost HDL kolesterola da smanji razinu lipidnih peroksida kod pacijenata s tip 1 šećernom bolesti i kod pacijenata koji boluju od zadnje faze renalne insuficijencije (ESRD, eng. *end-stage renal disease*). Također, mjerena je arilesterazna aktivnost PON1. Rezultati su ukazali na povišenu razinu glukoze i HbA1c kod pacijenata s tip 1 šećernom bolesti i kod ESRD pacijenata u odnosu na kontrolu. ESRD pacijenti su imali niže vrijednost HDL kolesterola i više vrijednosti triglicerida u odnosu na pacijente s tip 1 šećernom bolesti i kontrolnu skupinu. Arilesterazna aktivnost serumske PON1 bila je snižena kod pacijenata s tip 1 šećernom bolesti i ESRD pacijenata u odnosu na kontrolnu skupinu. Učinkovitost HDL-a u metabolizmu lipidnih peroksida značajno je smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu, iako nije nađena veća razlika u sadržaju lipidnih peroksida unutar izoliranih HDL čestica između pacijenata i kontrole. Fenotipizacija PON1 provedena je prema učinkovitosti hidrolize paraoksona i fenilacetata, međutim nije nađena značajna razlika unutar sve tri skupine. U grupi pacijenata s tip 1 šećernom bolesti nije nađena korelacija između enzimske aktivnosti PON1 i učinkovitosti uklanjanja lipidnih peroksida HDL-om. Međutim, HDL ESRD pacijenata bio je učinkovitiji od HDL pacijenata s tip 1 šećernom bolesti u metabolizmu lipidnih peroksida. *In vitro* studije su pokazale da oksidacija HDL čestice umanjuje njezinu antioksidativnu učinkovitost nevezano uz PON1 aktivnost. HDL funkcija nije narušena glikacijom bez oksidacije. Postoji nekoliko razloga zašto aktivnost PON1 ne korelira sa učinkovitošću metaboliziranja lipidnih peroksida HDL-om. Prvo, HDL na sebi ima vezane još neke od antioksidativnih faktora kao što su lecitin kolesterol acil transferaza (LCAT), acetil hidrolazu te apoA1. To bi značilo da PON1 igra ulogu u nekim od reakcija uklanjanja lipidnih peroksida, dakle ne može ograničiti u velikom postotku učinkovitost HDL-a. Drugi razlog su supstrati korišteni u studiji (paraokson, fenilacetat). Naime, hidroliza paraoksona ide preko katalitičkog mjesta enzima koje nije odgovorno za metabolizam lipidnih peroksida, stoga aktivnost dobivena mjerenjem nije relevantna. Upravo iz tog razloga u drugim studijima. mjerena je koncentracija PON1 i dokazana je korelacija između koncentracije PON1 i učinka HDL-a. (Kalogerakis i sur., 2005).

U studiji provedenoj od strane Valabhjia i sur. postavljena je slična hipoteza da su kvalitativne promjene HDL kolesterola u krvi povezane sa sniženom aktivnošću serumske PON1 te da takve promjene utječu na debljinu karotidne arterije, surogat markera za kardiovaskularne poremećaje (KVB). Rezultati su ukazali na kvalitativne promjene HDL kolesterola kod pacijenata s tip 1 šećernom bolesti. Naime, nakon provedene analize HDL kolesterola utvrđen je manji udio triacilglicerola te veći omjer esterifciranog kolesterola i triacilglicerola unutar hidrofobne regije same čestice. Smanjenje razine triacilglicerola unutar same čestice HDL-a rezultat je povišene aktivnosti lipoprotein lipaze čiji je uzrok hiperinzulinemija kod pacijenata s tip 1 šećernom bolesti. Rezultat toga je smanjeni katabolizam HDL-a unutar jetre, pa je to vjerojatno uzrok povišenoj razini HDL-a kod pacijenata s tip 1 šećernom bolesti. U skladu s ovim metaboličkim putem, visoke koncentracije apoA-1 kod pacijenata s tip 1 šećernom bolesti posljedica su smanjenog katabolizma apoA-1 u jetri. Također je utvrđeno da molarni udio PON1 na apoA-1 raste smanjenjem HDL čestice i povećanjem njezine gustoće. Stoga je moguće da promjene u veličini HDL-a doprinose konformacijskoj promjeni PON1, a posljedično tome i promjeni aktivnosti samog enzima. I lipidno okruženje utječe na aktivnost PON1. Lipidnu jezgru HDL čestice čini esterificirani kolesterol koji ima inhbicijsko djelovanje na PON1, odnosno veće HDL čestice imaju veći udio esterificiranog kolesterola pa stoga i manju aktivnost PON1. Naime, provedene su studije *in vitro* u kojima je dokazano da HDL čestice koje sadrže samo apoA-1 i fosfolipide imaju veću aktivnost PON1. Zaključak same studije je da nema korelacije između snižene aktivnosti PON1 i zadebljanja karotidne arterije. Pokazano je da su kvalitativne promjene HDL čestice uzrok promjene aktivnosti PON1. Naime, manja veličina čestice, odnosno veći omjer površinskih fosfolipida i unutarnje količine esterificiranog kolesterol ukazuju na višu aktivnost PON1 i obratno.(Valabhij i sur., 2001).

4.4. PON1 i tip 2 Šećerne bolesti

Mnoge studije dokazale su da na aktivnost serumske PON1 kod pacijenata s tip 2 šećernom bolesti utječu prehrana, pušenje, upale, osjetljivost na inzulin te konzumacija alkohola. Nasuprot tome neka provedana istraživanja ukazala su da na aktivnost samog enzima utječe direktna glikacija zbog konstantne izloženost organizma visokim koncentracijama glukoze. Zaključak svih studija je da niska aktivost samog enzima kod ispitanika s tip 2 šećernom bolesti dovodi do povećanog rizika od ateroskleroze zbog oslabljene zaštite LDL kolesterola od oksidativnih modifikacija. (Sampson i sur., 2005).

Neke studije ukazale su na postprandijalno smanjenje kocentracije HDL-a i aktivnosti PON1 kod ispitanika s tipa 2 šećernom bolesti kojima je data hrana bogata monosaharidima. Nasuprot tome, kod zdravih ispitanika postprandijalno raste aktivnost serumske PON1. Ovi rezultati ukazuju na smanjenu zaštitu lipoproteina od oksidacijskog stresa kod bolesnika s tip 2 šećernom bolesti. Međutim, mehanizam kojim dolazi do postprandijalnog smanjenja aktivnosti PON1 nije u potpunosti poznat. (Poh i sur., 2010).

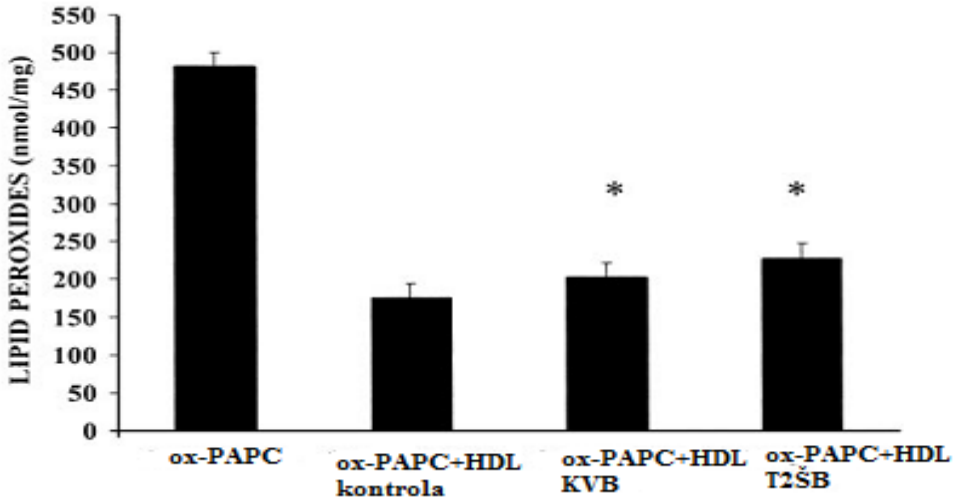
Poh i sur. proveli su studiju u kojoj su htjeli dokazati povezanost između snižene aktivnosti PON1 i povećane koncentracije oksidiranog LDL-a kod ispitanika s tip 2 šećernom bolesti. Određivao se lipidni profil, koncentracija i aktivnost samog enzima, a kao supstrati korišteni su paraokson i diazokson. U studiju su uključeni pacijenti s i bez komplikacija šećerne bolesti. Rezultati su ukazali da pacijenti s razvijenim kardiovaskularnim bolestima (KVB) imaju manju koncentraciju HDL kolesterola. Uzrok tome je glikacija samog lipoproteina, a posljedica toga je povećan promet i smanjena učinkovitost HDL-a tijekom transporta kolesterola. U ovom istraživanju dokazana je slična aktivnost PON1 prema paraoksonu kod zdravih ispitanika, pacijenata s tipa 2 šećernom bolesti bez KVB i pacijenata s tip 2 šećernom bolesti s KVB. Mastorikou i sur. pokazali su višu katalitičku aktivnost PON1 prema paraoksonu kod zdravih ispitanika u odnosu na pacijente s tip 2 šećernom bolesti, dok su Rahmani i sur. dokazali da nema značajne razlike u aktivnosti PON1 prema paraoksonu u svim uključenim studijskim grupama. U nekim provedenim studijima aktivnost PON1 bila je veća u pacijenata s tip 2 šećernom bolesti nego u zdravih ispitanika. Juretić i sur. su potvrdili višu PON1 aktivnost kod pacijenata s tip 2 šećernom bolesti s povećanom koncentracijom kolesterola u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, kod tih pacijenata dokazan je alel R192, a on je odgovoran za učinkovitiju hidrolizu paraoksona za razliku od

alela Q192. U ovoj studiji pronađena je negativna korelacija između aktivnosti PON1 i koncentracije oksidiranog LDL-a što bi značilo da je PON1 enzim koji je bitan u sprječavanju lipidne peroksidacije LDL-a kod pacijenata s tip 2 šećernom bolesti. (Juretić i sur., 2006; Mastorikou i sur., 1998; Poh i sur., 2010; Rahmani i sur., 2002)

Nedavno provedene studije pokazale su značajnu aktivnost PON1 u serumskim frakcijama bez lipoproteinskih čestica kod pacijenata s tip 2 šećernom bolesti u odnosu na zdrave ispitanike gdje se PON1 aktivnost u tim frakcijama nije mogla detektirati. Međutim, slobodna PON1 je inhibirana i nemože zaštititi lipoproteine od lipidne peroksidacije. Uzrok disocijacije PON1 s HDL čestice može biti smanjena koncentacija apo-A-1 ili činjenica da je apo-A-1 u bolesnika s tip 2 šećernom bolesti nitriran od strane RNS. Druga mogućnost je da bi ovaj fenomen mogao biti povezan s konstantnom hiperglikemijom čija je posljedica strukturna promjena HDL čestice pa time i disocijacija PON1. Ferretti i sur. inkubirali su pročišćeni HDL i izlagali ga povećanoj razini glukoze (0-100mM) kroz tri dana. Provedena mjerenja pokazala su značajnu lipidnu peroksidaciju HDL-a, promjenu konformacije apolipoproteina te sniženu aktivnost PON1. Hedrick i sur. inkubirali su pročišćenu PON1 s 25 mM otopinom glukoze što je izazvalo sniženje aktivnosti enzima za 40%. Također, glikirana PON1 nije bila u mogućnosti inhibirati adheziju monocita na endotelne stanice ljudkse aorte. (Hedrick i sur.,2000; Ferretti i sur.,2014; Mackness i sur., 2008).

U jednom od istraživanja proučavana je sposobnost HDL lipoproteina da metabolizira oksidirani palmitoil arahidonil fosfatidilkolin (ox-PAPC), supstrat serumske PON1 vezane na HDL (slika 10.). U provedenu studiju uključene su osobe s tip 2 šećernom bolesti, kontrolna skupina i osobe s KVB bez tip 2 šećerne bolesti. U usporedbi s kontrolnom skupinom, obje skupine pacijenata s tip 2 šećernom bolesti i pacijenti s razvijenom KVB bez tip 2 šećerne bolesti imali su povišenu razinu triglicerida te smanjenu koncentraciju PON1 u krvi. Grupa pacijenata s tip 2 šećernom bolesti imala je povećani indeks tjelesne mase, dok je grupa s KVB imala nižu razinu HDL-a i apo A-1. HDL iz sve tri grupe pacijenata mogao je metabolizirati ox-PAPC ovisno o njegovoj koncentraciji. Međutim, HDL pacijenata s tip 2 šećernom bolesti i pacijenata s KVB je imao manju sposobnost metaboliziranja ox-PAPC. Nekoliko prethodnih studija ukazalo je na činjenicu da HDL ispitanika s tipa 2 šećernom bolesti ima samanjenu sposobnost u obrnutom transportu kolesterola i antioksidativnoj obrani. Dokaz ove studije je da HDL pacijenata s tip 2 šećernom bolesti, ali bez KVB te HDL pacijenata s KVB, ali bez tip 2 šećerne bolesti ima smanjenu sposobnost metaboliziranja ox-PAPC u usporedbi s HDL-om kontrolne skupine. Nadalje, u kontrolnoj skupini postoji

negativna korelacija između aktivnosti PON1 i oksidiranog LDL-a, dok kod pacijenata s tip 2 šećernom bolesti i pacijenata s KVB ta korelacija nije nađena. Razlozi nisu očiti, ali pretpostavlja se da dolazi do interferencija kao što su dob, spol, slaba kontrola glikemije i veličina grupe ispitanika uključenih u studiju. (Mastorikou i sur., 2006).



Slika 10 – Učinci HDL-a kontrolne skupine, skupine s tip 2 šećernom bolesti i skupine s KVB na ox-PAPC. * Značajna razlika od kontrolnih ispitanika, $p<0.01$ (Mastorikou i sur., 2006).

5. ZAKLJUČAK

Temeljitim pregledom i analizom dostupne literature ustanovljena je značajna uloga promjene aktivnosti i koncentracije PON1 u šećernoj bolesti tipa 1 i 2. Rezultati pojedinih istraživanja su često kontradiktorni, ali dijagnostička i prognostička vrijednost poznavanja ovog enzima bit će od značajne koristi u bliskoj budućnosti.

Rezultati dobiveni kod istraživanja provedenih u ispitanika s tip 1 šećernom bolesti ukazuju da je aktivnost i koncentracija PON1 smanjena. Smanjena aktivnost PON1 ukazuje na smanjeno antioksidacijsko i antiaterogeno djelovanje enzima kod ovih ispitanika.

Kao mogući razlozi sniženja ativnosti PON1 predloženi su slijedeći mehanizmi:

1. Povećana glikacija enzima.
2. Smanjena sinteza enzima u jetri.
3. Povećani katabolizam PON1.
4. Slabiji kapacitet HDL čestice za vezanje PON1.
5. Strukturne promjene HDL-a.

Istraživanja aktivnosti i koncentracije PON1 kod bolesnika s tip 2 šećernom bolesti nisu dali jednoznačne rezultate. Neke istraživačke skupine su dokazale sniženu, a neke napromijenjenu, a neke čak i povišenu aktivnost PON1 u bolesnika s tip 2 šećernom bolesti. Razlozi nedosljednih rezultata mogu biti posljedica nejednakog odabira kontrolnih ispitanika, utjecaj ne genskih čimbenia na aktivnost PON1 i dr.

Potrebno je provesti daljnja istraživanja da bi se utvrdio status PON1 u ovih ispitanika.

6. LITERATURA

1. Agachan B, Yilmaz H, Ergen HA, Karaali ZE, Isbir T. Paraoxonase (PON1) 55 and 192 Polymorphism and Its Effects to Oxidant-Antioxidant System in Tukish Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Physiol Res,* 2005, 54, 287-293.
2. Aslan M, Ozcan F, Kucuksayan E. Increased Small Danse LDL and Decreased Paraoxonase Enzyme Activity Reveals Formation of an Atherogenic Risk in Streptozotocin-Induced Diabetic Guinea Pigs. *J Diabetes Res, 2013,* 5, 1-7.
3. Aviram M, Rosenbalt M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med,* 1999, 26, 892-904.
4. Boshtam M, Razavi AM, Pourfarzam M, Ani M, Naderi GA, Basati G, Mansourian M, Dinani NJ, Asgary S, Abdi S. Serum Paraoxonase 1 Activity Is Associated with Fatty Acid Composition of High Density Lipoprotein. *Dis Markers*, 2013, 4, 273-280
5. Ceron JJ, Tecles F, Tavrijonaviciute A. Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement an update. *BMC Veterinary Res*, 2014, 10, 74.
6. Cheng X, Klaassen CD. Hormonal and Chemical Regulation of Paraoxonase in Mice. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics,* 2012, 342, 688-695.
7. Costa LG, Giordano G, Cole TB, Marsillach J, Furlong CE. Paraoxonase 1 (PON1) as a genetic determinant of susceptibility to organophosphate toxicity. *Toxycology,* 2013, 307, 115-122.
8. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci,* 2004, 107, 435-447.
9. Devarajan A, Shih D, Reddy ST. Inflammation, Infection, Cancer and All That... The Role of Paraoxonases. *Adv Exp Med Biol.,* 2014, 824, 33-41.
10. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, Du BNL. Human paraoxonasea (PON1, PON2, PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities, *JLR papers in Press ,* 2005, 46, 1239-1247.

11. Ferre N, Camps J, Ballart JF, Arija V, Murphy MM, Ceruelo S, Biame E, Viella E, Tous M, Joven J. Regulation of Serum Paraoxonase activity by Genetic, Nutritional, and Lifestyle Factors in the General Population. *Clin Chem,* 49:9, 1491-1497.
12. Ferretti G, Cester AM, Bacchetti T, Raffaelli F, Vignini A, Orici F, Martino C, Tranquilli A. Leptin and paraoxonase activity in cord blood from obese mothers. *J Matern Fetal Neonatal Med,* 2014, 27, 1353-1356.
13. Flekač M, Škrha J, Zidkova K, Lacinov Z, Hilgertova J. Paraoxonase 1 Gene Polymorphisms and Enzyme Activities in Mellitus Diabetes. *Physio Res,* 2008, 57, 717-726.
14. Garin MCB, Moren X, James RW. Paraoxonase-1 and serum concentrations pf HDL-cholesterol and apoA-I. *JLR Papers in Press,* 2005, 47, 515-520 .
15. Ghaffari T, Nouri M, Irannejad E, Rashidi MR. Effect of Vitamin E and Selenium Supplement on Paraoxonase-1 Activity, Oxidized Low Density Lipoprotein and Antioxidant Defense in Diabetic Rats. *BioImpacts,* 2011,1, 121-128.
16. Gupta N, Gill K, Singh S. Paraoxonases: Structure, gene polymorphism and role in coronry artery. *Indian J Med Res,* 2009, 130, 361-368.
17. Hameed I, Masoodi SR, Mir SA, Nabi M, Ghazanfar K, Ganai BA. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J Diabetes,* 2015, 6, 598-612.
18. Harel M, Aharoni A, gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Megedi R, Dvir H, Ravelli RBG, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature Publishing Group,* 2004, 11, 1- 5.
19. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM, Wong H, Peters AL. Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia,* 2000, 43, 312-20.
20. Himbergen van TM, Tits van LJH, Roest M, Stalenhoef AFH. The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Van Zuiden Communications B.V.,* 2006, 64, 1- 2.
21. Huang Y, Wu Z, Riwanto M, Gao S, Levison BS, Gu X, Fu X, Wagner MA, Besler C, Gerstenecker G, Zhang R, Plow EF, Fox PL, Shih DM, Lusis AJ, Fisher EA, DiDonato JA, Landmesser U, Hazen SL. Myeloperoxidase, paraoxonase-1 and HDL form a functional ternary complex. *J Clin Invest,* 2013, 123, 3815-3827.

22. Josse D, Xie W, Renault F, Rochu D, Schopfer LM, Masson P, Lockridge O. Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities. *Biochemistry,* 1999, 38, 2816-2825.
23. Juretić D, Motejlkova A, Kunović B, Rekić B, Flegar-Meštrić Z, Vujić L, Mesić R, Lukač-Bajalo J, Simeon-Rudolf V. Paraoxonase/arylesterase in serum of patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Pharm*, 2006, 56, 59-68.
24. Kalogerakis G, Baker AM, Christov S, Rowely KG, Dwyer K, Winterbourn C, Best JD, Jenins AJ. Oxidative stress and high-density lipoprotein function in Type I diabetes and end-stage renal disease. *Clin Sci (Lond),* 2005, 108, 497-506.
25. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. 11. Izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2011.
26. Kıyıcı A, Okudan N, Gokbel H, Belviranli M. The Effect of Grape Seed Extracts on Serum Paraoxonase Activities in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Med Food,* 2010, 13, 725-728.
27. Kujundžić M, Čulo F, Bašić I, Sučić M. Klinička patofiziologija. 1. Izdanje. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2003.
28. Kuo CL, La Du BN. Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity. *Drug Metab Dispos*, 1998, 26, 653-60.
29. Mastorikou M, Mackness B, Liu Y, Mackness M. Original Article: Metabolism Glycation of paraoxonasee-1 inhibits its activity and impairs the ability of high-density lipoprotein to metabolize membrane lipid hydroperoxides. *Diabetic Med,* 2008, 25, 1049-1055.
30. Mouhamed DH, Ezzaher A, Mechri A, Neffati F, Omezzine A, Bouslama A, Gaha L, Douki W, Najjar MF. Effect of cigarette smoking on paraoxonase 1 activity according to PON1 L55M and PON1 Q192R gene polymorphisms. *Environ Health Prev Med,* 2012, 17, 316-321.
31. Poh R, Muniandy S. Paraoxonase 1 activity as a predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Southeast Asian J Trop Med Publich Health,* 2010, 1,1-5.
32. Rahmani M, Raiszadeh F, Allahverdian S, Kiaii S, Navab M, Azizi F. Coronary artery disease is associated with the ratio of apolipoprotein A-I/B and serum concentration of apolipoprotein B, but not with paraoxonase enzyme activity in Iranian subjects. *Atherosclerosis,* 2002, 162, 381-9.

33. Rainwater LD, Rutherfor S, Deyer DT, Rainwater DE, Cole SA, VandeBerg JL, Almasy L, Blangero J, MacCluer JW, Mahaney MC. Determinants of Variation in Human Serum Paraoxonase Activity. *Heredity*, 2009, 2, 147-154.
34. Rajković MG, Rumora L, Barišić K. The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. *Biochemia Medica,* 2011, 21, 122-130.
35. Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE, Furlong CE. Paraoxonase 1 Status as a Risk Factor for Disease or Exposure. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 660, 29-35.
36. Sampson MJ, Braschi S, Willis G, Astley SB. Paraoxonase-1 (PON-1) genotype and activity and *in vivo* oxidized plasma low-density lipoprotein in Type II diabetes. *Clin Sci*, 2005, 109, 189-197.
37. She ZG, Chen HZ, Yan Y, Li HI, Liu DP. The Human Paraoxonase Gene Cluster As a Target in the Treatment of Atherosclerosis. *Mary Ann Liebert*, 2010,16, 1-6.
38. Soran H, Younis NN, Charlton-Menys V, Durington P. Variation in paraoxonase-1 activity and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2009, 20, 265-274.
39. Štraus B, Barišić K, Čepelak I, Čvorišćec D, Dodig S, Đurić K, Fumić K, Petlevski R, Petrik J, Plavšić F, Plavšić V, Rogić D, Rumora L, Trbojević-Čepe M, Žuntar I, Wolf A. Štrausova Medicinska biokemija. 3. Izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2009.
40. Tangvarasitticha S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World Diabetes*, 2015, 6, 456-480.
41. Tas S, Sarandol E, Dirican M. Vitamin B6 Supplementation Improves Oxidative Stress and Enhances Serum Paraoxonase/Arylesterase Activities in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *The Scientific World Journal*, 2014, 6, 1-7.
42. Toby ST, Muthukrishnana S, Becka JM, Tao P, Hayesa J, Otto C, Cerasoli M, Lenz DE, Hadada CM. Computational Modeling of Human Paraoxonase 1: Preparation of Protein Models, Binding Studies, and Mechanistic Insight. *J Phys Orgs Chem*, 2010, 23, 357-369.
43. Valabhji J, McColl AJ, Schachter M, Dhanjil S, Richmond W, Elkels RS. High-density lipoprotein composition and paraoxonase activity in Type I diabetes. *Clin Sci*, 2001, 101, 659-670.
44. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 1995, 96 , 2882-2891.

7. SAŽETAK/SUMMARY

SAŽETAK

Humana serumska paraoksonaza 1 (PON1) je protein molekularne mase 43 kDa čija je katalitička aktivnost hidroliza organofosfatnih estera, aromatskih estera karboksilnih kiselina i karbamata. PON1 se sintetizira u jetri, a uglavnom je povezana sa lipoproteinom visoke gustoće (HDL). Enzim smanjuje nakupljanje lipidnih peroksida na lipoproteinu niske gustoće (LDL) s obzirom na svoju sposobnost metaboliziranja hidroperoksida. Aktivnost PON1 smanjena je u šećernoj bolesti. PON1 ima zaštitnu ulogu protiv razvoja šećerne bolesti zbog svoje antioksidative uloge. Visoke koncentracije glukoze u dijabetičkom serumu mogu objasniti odvojenost PON1 od HDL-a. Nadalje, oksidativni stres kao posljedica šećerne bolesti može povećati stvaranje lipidnih peroksida i umanjiti aktivnost serumske PON1.

Polimorfizmi u promotorskoj i kodirajućoj regiji gena za PON1 određuju njegovu ekspresiju i enzimsku aktivnost samog enzima, međutim aktivnost serumske PON1 može biti regulirana i s nekoliko okolišnih faktora. Patološka stanja kao što su bubrežne bolesti, šećerna bolest, kardiovaskularne bolesti i ciroza jetre mogu biti povezane sa smanjenom paraoksonaznom aktivnošću, dok prehrambene navike i stil života također mogu utjecati na aktivnost samog enzima. Razlika u paraoksonaznoj aktivnosti među pojedincima dijelom je objašnjena varijacijama u kodirajućoj regiji gena za paraoksonazu. Najpoznatije varijacije su supstitucija arginina glutaminom na položaju 192 (Q192R) te supstitucija metionina leucinom na položaju 55 (M55L). Polimorfizam M55L bitna je odrednica serumske koncentracije PON1.

SUMMARY

Human serum paraoxonase 1 (PON1) is a 43-kDa protein which catalyses the hydrolysis of organophosphate esters, aromatic carboxylic acid esters, and carbamates. PON1 is synthesized in the liver and is mainly associated with high-density lipoprotein (HDL). The enzyme decreases accumulation of the lipid peroxides in low-density lipoprotein (LDL) due to its ability to reduce hydroperoxides. PON1 activity was found to be decreased in diabetes mellitus. PON1 has a protective role against diabetes development, secondary to its unique antioxidant properties. The high concentrations of glucose in diabetic serum could account for PON1 dissociation from HDL. Furthermore, oxidative stress as a consequence of diabetes can increase the formation of lipid peroxides and reduce the activity of serum PON1.

Polymorphisms in the promoter and coding regions of the paraoxonase gene are the main determinants of its expression and the enzymatic activity, but serum paraoxonase activity can be modulated by several environmental factors. Pathologic states such as renal disease, diabetes mellitus, cardiovascular disease, and liver cirrhosis are asociated with decreased paraoxonase activity, and various dietary and lifestyle factors have been reported to influence serum paraoxonase activity. The differences in paraoxonase activity among individuals are explained partly by genetic variation in th coding region of paraoxonase gene. The most famous variations are supstitution pf arginine for glutamine at position 192 (Q192R) and methionine for leucine at position 55 (M55L). The M55L polymorphisam is also a significant determinant of the serum concetration of paraoxonase.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PRAOKSONAZA 1 U BOLESNIKA SA ŠEĆERNOM BOLESTI

Josip Knežević

SAŽETAK

Humana serumska paraoksonaza 1 (PON1) je protein molekularne mase 43 kDa čija je katalitička aktivnost hidroliza organofosfatnih estera, aromatskih estera karboksilnih kiselina i karbamata. PON1 se sintetizira u jetri, a uglavnom je povezana sa lipoproteinom visoke gustoće (HDL). Enzim smanjuje nakupljanje lipidnih peroksida na lipoproteinu niske gustoće (LDL) s obzirom na svoju sposobnost metaboliziranja hidroperoksida. Aktivnost PON1 smanjena je u šećernoj bolesti. PON1 ima zaštitnu ulogu protiv razvoja šećerne bolesti zbog svoje antioksidative uloge. Visoke koncentracije glukoze u dijabetičkom serumu mogu objasniti odvojenost PON1 od HDL-a. Nadalje, oksidativni stres kao posljedica šećerne bolesti može povećati stvaranje lipidnih peroksida i umanjiti aktivnost serumske PON1.

Polimorfizmi u promotorskoj i kodirajućoj regiji gena za PON1 određuju njegovu ekspresiju i enzimsku aktivnost samog enzima, međutim aktivnost serumske PON1 može biti regulirana i s nekoliko okolišnih faktora. Patološka stanja kao što su bubrežne bolesti, šećerna bolest, kardiovaskularne bolesti i ciroza jetre mogu biti povezane sa smanjenom paraoksonaznom aktivnošću, dok prehrambene navike i stil života također mogu utjecati na aktivnost samog enzima. Razlika u paraoksonaznoj aktivnosti među pojedincima dijelom je objašnjena varijacijama u kodirajućoj regiji gena za paraoksonazu. Najpoznatije varijacije su supstitucija arginina glutaminom na položaju 192 (Q192R) te supstitucija metionina leucinom na položaju 55 (M55L). Polimorfizam M55L bitna je odrednica serumske koncentracije PON1.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 49 stranica, 10 grafičkih prikaza, 4 tablice i 44 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Paraoksonaza 1, diabetes mellitus, oksidativni stress

Mentor: **Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Roberta Petlevski, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc. Lovorka Vujić, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of medicinal biochemistry
and hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

PARAOXONASE 1 IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS

Josip Knežević

SUMMARY

Human serum paraoxonase 1 (PON1) is a 43-kDa protein which catalyses the hydrolysis of organophosphate esters, aromatic carboxylic acid esters, and carbamates. PON1 is synthesized in the liver and is mainly associated with high-density lipoprotein (HDL). The enzyme decreases accumulation of the lipid peroxides in low-density lipoprotein (LDL) due to its ability to reduce hydroperoxides. PON1 activity was found to be decreased in diabetes mellitus. PON1 has a protective role against diabetes development, secondary to its unique antioxidant properties. The high concentrations of glucose in diabetic serum could account for PON1 dissociation from HDL. Furthermore, oxidative stress as a consequence of diabetes can increase the formation of lipid peroxides and reduce the activity of serum PON1.

Polymorphisms in the promoter and coding regions of the paraoxonase gene are the main determinants of its expression and the enzymatic activity, but serum paraoxonase activity can be modulated by several environmental factors. Pathologic states such as renal disease, diabetes mellitus, cardiovascular disease, and liver cirrhosis are asociated with decreased paraoxonase activity, and various dietary and lifestyle factors have been reported to influence serum paraoxonase activity. The differences in paraoxonase activity among individuals are explained partly by genetic variation in th coding region of paraoxonase gene. The most famous variations are supstitution pf arginine for glutamine at position 192 (Q192R) and methionine for leucine at position 55 (M55L). The M55L polymorphisam is also a significant determinant of the serum concetration of paraoxonase.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 49 pages, 10 figures, 4 tables and 44 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Paraoxonase 1, diabetes mellitus, oxidative stress

Mentor: **Marija Grdić Rajković**, **Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marija Grdić Rajković**, **Ph.D.** *Senior Assistant* , University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Roberta Petlevski , **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lovorka Vujić, **Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2015.