

ORGANOFOSFATLI PESTİSİT ZEHİRLENMELERİ VE SERUM PARAOKSONAZ 1 (PON1) ENZİMİNİN ORGANOFOSFAT METABOLİZMASINDAKİ ROLÜ

Organophosphate Pesticide Poisonings and the Role of Serum Paraoxonase 1 (PON1) Enzyme in Organophosphate Metabolism

Birsen CAN DEMİRDÖĞEN¹

¹ Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Gıda Güvenliği ve Beslenme Araştırma Müdürlüğü, ANKARA

Geliş Tarihi: 24.02.2010
Kabul Tarihi: 06.06.2010

İletişim:
Birsen CAN DEMİRDÖĞEN
Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı,
Gıda Güvenliği ve Beslenme Araştırma Müdürlüğü,
Cemal Gürsel Cad. No:18
06100 Sıhhiye-ANKARA
Tel : +90 312 458 21 40
E-posta : birsencan.demirdogen@rshm.gov.tr

ÖZET

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre tüm dünyada yılda 3 milyona yakın pestisit zehirlenmesi meydana gelmekte, bunların 220.000'i ölümlü sonuçlanmaktadır. Son yıllarda sıklıkla kullanılan pestisitlerden olan organofosfatlar, sinir sistemi üzerinde etki gösteren kimyasallardır. Organofosfatlar asetilkolinesteraz enzimini baskılayarak nörotoksositeye yol açarlar. Paraoksonaz 1 (PON 1; EC 3.1.8.1) serumda yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) üzerinde yer alan, kalsiyuma bağımlı glikoprotein yapısında bir enzimdir. Memelilerin birçok organında PON1 aktivitesi tespit edilmesine karşın, kuşlar, balıklar ve böceklerde paraoksonaz aktivitesi sifıra yakındır. PON1'in hidrolize ettiği substratlar arasında paration, diazinon ve klorprifos gibi organofosfatlı insektisitlerin aktif formu olan toksik okson metabolitleri; sarin, ve soman gibi sinir gazları; fenil asetat gibi aromatik esterler; homogentisik asit lakton, dihidrokumarin ve homosistein tiolakton gibi birçok aromatik ve alifatik lakton ile siklik karbonatlar yer almaktadır. Organofosfatlı pestisitlerin toksikolojisi ile ilgili yapılan ilk çalışmalar düşük serum PON1 aktivitesine sahip olmanın organofosfatlı bileşiklerin akut etkilerine karşı duyarlılığı arttırdığını ortaya koymuştur. PON1'i kodlayan genin sekansının belirlenmesinin ardından, kişiler arasında enzimin aktivitesinde ve ifade edilme seviyesinde farklılıklara yol açan polimorfizmler tespit edilmesi, PON1 aktiviteleri düşük olan insanların organofosfat zehirlenmelerine karşı daha hassas olabileceğini düşündürmüştür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda saflaştırılmış PON1'in organofosfatlı pestisitlere maruz kalan hayvanlara enjekte edilmesi, dolayısı ile serum PON1 seviyesinin yapay olarak artırılması ile klorprifos ve diazinon gibi bazı organofosfatların toksik etkilerini azaltmanın mümkün olduğu gösterilmiş, ancak bu uygulamanın paration maruziyetine karşı etkili olmadığı görülmüştür. Her ne kadar paraoksonu hidrolizleyen enzim olarak tanınsa da, PON1'in paraoksonaz aktivitesi nispeten zayıftır. Organofosfat maruziyetine karşı koruyucu olarak kullanılabilmesi için PON1'in katalitik verimi artırılmalı ve yeterli miktarda elde edilebilmelidir. Son yıllarda protein mühendisliği yöntemleri kullanılarak PON1'in bazı amino asitlerinde değişiklikler yapılmış, bu PON1 varyantları bakteriyel sistemlerde yeterli seviyelerde ifade edilmiş ve bazı organofosfatlara karşı enzim aktivitesinde artışlar sağlanmıştır. Bu derlemede, öncelikle organofosfatların genel özelliklerine, etki mekanizmalarına ve zehirlenmelere değinilmiş, ardından PON1'in organofosfat metabolizmasındaki rolüne ve organofosfat zehirlenmelerinde antidot olarak kullanılabilmesine yönelik araştırmalardaki son gelişmeler üzerinde durulmuştur.

Anahtar Sözcükler: Antidot, insektisit, organofosfat, paraoksonaz, pestisit, PON1, zehirlenme

ABSTRACT

According to data from the World Health Organization, nearly 3 million pesticide poisonings occur per year worldwide; 220,000 of these poisonings result in death. Organophosphates, one of the most frequently used pesticides in recent years, are chemicals that effect the nervous system. Organophosphates lead to neurotoxicity by suppressing the enzyme acetylcholinesterase. Paraoxonase 1 (PON 1; EC 3.1.8.1) is a calcium dependent glycoprotein enzyme that is found on the high density lipoprotein (HDL) in serum. Although PON1 activity has been detected in several organs of mammals, paraoxonase activity is close to zero in birds, fish and insects. Among the chemicals that are hydrolyzed by PON1; the toxic oxon metabolites of organophosphate insecticides, which are the active forms, such as parathion, diazinon and chlorpyrifos; nerve gases such as sarin and soman; aromatic esters such as phenyl acetate; several aromatic and aliphatic lactones such as homogentisic acid lactone, dihydrocoumarin and homocysteine thiolactone and cyclic carbonates are included. Earlier studies on the toxicology of organophosphate pesticides revealed that having low serum PON1 activity increases the sensitivity to the acute effects of organophosphate compounds. Following determination of the sequence of the gene encoding PON1, identification of polymorphisms that lead to differences among people in the activity and level of expression of the enzyme, led to the idea that people with low PON1 activity may be more sensitive to organophosphate poisoning. In studies carried out in recent years, it was shown that injection of purified PON1 to animals that are exposed to organophosphate pesticides, and thus increasing serum PON1 levels artificially, it was possible to reduce the toxic effects of certain organophosphates like chlorpyrifos and diazinon; but this application was observed to be ineffective against parathion exposure. Even though recognized as the enzyme that hydrolyzes paraoxon, paraoxonase activity of PON1 is a bit weak. In studies carried out in recent years, it was observed that injection of purified PON1 protects against chlorpyrifos and diazinon but was not effective against parathion exposure. In order to be used as a prophylactic agent against organophosphate exposure, PON1's catalytic efficiency has to be increased and the enzyme has to be obtained in adequate amounts. In recent years, using protein engineering methods, changes were made to some amino acids of PON1, these PON1 variants were expressed in bacterial systems at sufficient levels and increase in enzyme activity against some organophosphates were obtained. In this review, first, general aspects of organophosphates, action mechanism and poisonings are addressed; then, the role of PON1 in organophosphate metabolism and recent advances in the research intended for improving PON1 so that it can be used as an antidote in organophosphate poisonings are emphasized.

Key Words: Antidote, insecticide, organophosphate, paraoxonase, pesticide, PON1, poisoning

GİRİŞ

Pestisitler, tüm akut zehirlenme etkenleri arasında ilaçlardan sonra ikinci sırada gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 1985 yılı verilerine göre tüm dünyada yılda 3 milyona yakın pestisit zehirlenmesi meydana gelmekte, bunların 220.000'i ölümlü sonuçlanmaktadır (1,2). Bir tarım ülkesi olan Türkiye'de 2008 yılında Ulusal Zehir Merkezi'ne bildirilen 77.988 zehirlenme vakasının 6.503'ü (%8, 34) pestisit kaynaklıdır (3). Dünyadaki pestisit kullanımının %20'sinin gerçekleştiği Amerika Birleşik Devletleri'nde 1988 yılında 64 zehirlenme merkezine yapılan 1.368.748 başvurunun 56.674'ünün (%4, 1) pestisitlere bağlı olduğu bildirilmiştir (4, 5). Ölümcül pestisit zehirlenmeleri özellikle gelişmekte olan

ülkelerde ciddi bir sağlık sorunudur. 1982 yılında, 12 milyon nüfuslu bir ülke olan Sri Lanka'da yapılan bir araştırma, bu ülkede yılda 10.000 kişinin akut pestisit zehirlenmesi şüphesiyle hastanelere başvurduğunu ve bunlardan 1.000 kişinin öldüğünü ortaya koymuştur. Akut pestisit zehirlenmesinden dolayı meydana gelen ölümlerin, aynı yıl sıtma, çocuk felci, boğmaca, difteri ve tetanozdan kaynaklanan toplam ölümlerin iki katı olması, akut pestisit zehirlenmelerinin halk sağlığı açısından önemini ortaya koymaktadır (6,7).

Bu derlemede, öncelikle organofosfatlı pestisitlerin genel özellikleri, etki mekanizmaları,

detoksifikasyonları ve organofosfat zehirlenmelerinin tedavisine değinilecek, daha sonra paraoksonaz 1 (PON1) enziminin organofosfat metabolizmasındaki rolü ve PON1'in organofosfat zehirlenmelerinde antidot olarak kullanımı üzerinde durulacaktır.

1. ORGANOFOSFATLI PESTİSİT ZEHİRLENMELERİ

1.1 Organofosfatlı Pestisitler

Başlıca pestisit grupları organofosfatlar, karbamatlar, organoklorlular ve piretroidlerdir. Organofosfatlar, fosfor içeren asitlerin ester, tiol ester veya anhidrit türevleri olup tarımda, evlerde, bahçelerde ve veterinerlikte kullanılmaktadır. Organofosfatlara örnek olarak malation, paration, diazinon, forat, terbufos, fentiyon ve klorprifos gibi insektisitler; soman, sarin ve tabun gibi sinir gazları; göz tedavisinde kullanılan ekotiofat ve izoflurofat ile parazitlere karşı kullanılan triklorfon sayılabilir. Organofosfatlar sinir sistemi üzerinde etki gösteren kimyasallardır (8).

Organofosfatlı pestisitler ilk olarak 1800'lerde sentezlenmiş ve 1930'larda kolinerjik etkileri tanımlanarak böcek öldürücü özellikleri keşfedilmiştir. Kısa bir süre sonra da kimyasal savaş ajanı olarak kullanılacakları ortaya çıkmıştır. G-serisi silahlar olarak bilinen sarin, soman ve tabun II. Dünya Savaşı yıllarında geliştirilmiş, ancak savaşta kullanılmamıştır. II. Dünya Savaşı'ndan sonra organofosfatlı pestisitlerin büyük ölçekli üretimine başlanmıştır. İlk olarak piyasaya sürülen organofosfatlı böcek öldürücü parationdur.

Organofosfatlar son derece zehirli olmalarına rağmen genellikle çevrede kalıcı değildir; güneş ışığı, hava ve toprakla temas ettiklerinde hidroliz olarak parçalanırlar. Bu özellikleri sayesinde organofosfatlar DDT, aldrin ve dieldrin gibi kalıcı organoklorlu pestisitler yerine alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır. Organofosfatlı pestisitlerin popülaritesi organoklorlu pestisitlerin 1970'lerde yasaklanmasından sonra artmıştır. Ne var ki,

organofosfatlılar organoklorlulara göre daha hızlı parçalansalar da, akut toksisiteyi daha yüksektir (9).

1.2 Organofosfatlı Pestisit Zehirlenmeleri

Pestisit zehirlenmelerinde organofosfatlı pestisitler ilk sırada gelmektedir. Ülkemizde 2008 yılında Ulusal Zehir Merkezi'ne yapılan pestisit zehirlenmesi başvurularının arasında en fazla (%47.66) zehirlenmeye yol açan grup insektisitlerdir. İnsektisit kaynaklı zehirlenmelerin %20,98'ini organik fosforlu insektisitler oluşturmuştur (3). Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne 01.01.2004-31.12.2004 tarihleri arasında başvuran pestisit zehirlenmesi olgularının %41,7'si organik fosforlu pestisitler ile zehirlenmiştir (10). Organofosfatlı bileşikler ile oluşan zehirlenmeler diğer ülkelerde de yaygındır. Amerika Birleşik Devletleri'nde pestisit zehirlenmesi vakalarının %33'ünü organofosfatlar ve karbamatların oluşturduğu bildirilmiştir (5). Sri Lanka'da pestisit zehirlenmelerinin %31'inin organofosfatlı insektisitler ile meydana geldiği (11), Japonya'da olguların en fazla (%36) organofosfatlı insektisitler ile zehirlendiği belirtilmiştir (12). İran'da akut pestisit zehirlenmelerinin yarısından fazlasının (%57) organofosfatlı pestisit kaynaklı olduğu görülmüştür (13). Pestisit zehirlenmelerinin boyutu değerlendirilirken akut pestisit zehirlenmesi rakamlarının hastane verilerinden elde edildiği ve zehirlenme semptomlarının spesifik olmamasından dolayı, ancak ciddi zehirlenme durumlarında hastaneye başvuru yapıldığının unutulmaması gerektiği vurgulanmıştır (14).

Yetişkinlerde pestisitler ile zehirlenme sebepleri arasında ilk sırada özkıyım gelmektedir. Mesleki maruziyet ve kaza ile alımlar da olmaktadır. Zehirlenmelerin bir kısmı da organofosfatlar grubunda yer alan sinir gazlarının kimyasal savaş ajanı olarak kullanıldığı terörist saldırılar sonucu gerçekleşmektedir. 1994'te terörist bir örgüt tarafından Japonya'da düzenlenen sarin gazı saldırısında 7 kişi ölmüş, 500 kişi yaralanmıştır.

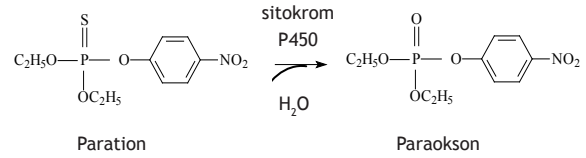
1995'te ise Tokyo metrosunda düzenlenen benzer saldırıda 12 kişi hayatını kaybetmiş, 1.000 kişi hastaneye kaldırılmıştır (15).

1.3 Organofosfatların Etki Mekanizması ve Detoksifikasyonu

Organofosfatların etki mekanizması asetilkolinesteraz enziminin baskılanmasına dayanır. Bir nörotransmitter olan asetilkolini, kolin ve asetik asite parçalayan asetilkolinesteraz, merkezi ve periferik sinir sisteminde, nöromusküler kavşaklarda ve eritrositlerde bulunmaktadır (16). Sinir sinyallerinin sinir liflerinden düz kaslara ve iskelet kaslarına, salgı bezlerine ve otonom sinir düğümlerine, aynı zamanda merkezi sinir sistemi içerisinde iletilmesinin düzgün işleminde asetilkolinesteraz enziminin kritik bir görevi vardır (17). Organofosfatlar, asetilkolinesteraz enzimini, aktif bölgesindeki serin aminoasitinin hidroksil grubunu fosforlayarak inaktif hale getirirler. Asetilkolinesteraz enzimi baskılandığında, sinir sisteminde asetilkolin birikmeye başlar ve bunun sonucunda muskarinik ve nikotinik reseptörler aşırı uyarılır. Bu duruma “kolinerjik sendrom” denir (16). Kolinerjik sinir kavşaklarında asetilkolin miktarının artması, düz kasların kasılmasına ve salgı bezlerinin salgı yapmasına sebep olur. İskelet kası kavşaklarında aşırı miktarda birikmiş asetilkolin uyarıcı olabileceği gibi, hücreyi paralyze de edebilir. Merkezi sinir sisteminde yüksek miktardaki asetilkolin, duyuşsal ve davranışsal bozukluklara, koordinasyon bozukluğuna, motor fonksiyonların baskılanmasına ve solunum yetmezliğine yol açar. Solunum bozukluğuna eşlik eden artmış akciğer salgıları, organofosfat zehirlenmelerinde görülen ölümlerin en sık karşılaşılan nedenidir (17).

Birçok organofosfatlı pestisitinin yapısında fosfora çift bağlı sülfür atomu vardır. Toksik hale gelmeleri için metabolik aktivasyon ile oksonlara dönüşmeleri, yani yapılarındaki P=S grubunun P=O grubuna dönüşmesi gerekir. Çünkü, yalnızca yapısında P=O grubu bulunan organofosfatlı

bileşikler asetilkolinesterazı baskılayabilir. “Oksidatif desülfürasyon” olarak adlandırılan ve karaciğerde mikrozomal sitokrom P450 enzimleri tarafından katalizlenen bu biyotransformasyon reaksiyonu sonucunda organofosfatlı pestisitler toksik hale gelirler (Şekil 1) (18-20).



Şekil 1. Parationun karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından paraoksone biyotransformasyon reaksiyonu (20).

Sitokrom P450 enzimlerinin aktivitesi genetik polimorfizmler, enzim inhibitörleri ve uyarıcıları gibi nedenlerle kişiler arasında değişkenlik gösterdiğinden dolayı organofosfatların metabolik aktivasyon hızı da kişiler arasında farklılık gösterir. Öte yandan, sinir gazlarının (sarin, soman, tabun) yapılarında P=O grubu bulunduğu için, toksik etki göstermeleri için oksidatif desülfürasyona gerek yoktur. Bu sebeple, bu kimyasallar asetilkolinesteraza direk bağlanabilir ve dakikalar içinde etki gösterirler. Dolayısı ile sinir gazlarının toksisitesinde metabolik aktivasyon hızındaki farklılıkların rolü yoktur (14).

Organofosfatların detoksifikasyonu, plazmada paraoksonaz (PON1) gibi A-esterazlar tarafından katalizlenen hidroliz reaksiyonu ve asetilkolinesteraz, butirilkinesteraz ve karboksilesteraz gibi B-esterazlara stokiometrik bağlanma reaksiyonlarını içermektedir (14). Çoğu organofosfatlı pestisit kimyasal yapıları gereği yağda çözünen bileşiklerdir. Organofosfatlar yutma ve solunum yoluyla vücuda girebildiği gibi, deri yoluyla da emilebilir. Zehirlenme semptomlarının ortaya çıkma hızı ve ciddiyeti, maruz kalınan organofosfatın kimyasal yapısı, miktarı ve maruziyet şeklinin yanısıra, metabolik aktivasyonun ve yıkımın hızı gibi birçok faktöre bağlıdır (17).

1.4 Organofosfat Zehirlenmelerinin Tedavisi

Organofosfatlı bileşikler ile zehirlenmelerin tedavisi, dekontaminasyon, absorpsiyonun engellenmesi, genel destek ve yoğun solunum desteği tedavilerinin yanı sıra belirgin zehirlenmelerde farmakolojik müdahale için atropin ve oksimlerin kullanımını içerir.

Atropin, asetilkolinin muskarinik reseptörlerdeki kompetitif antagonistidir ve muskarinik sinapslarda artmış asetilkoline bağlı olarak ortaya çıkan kolinerjik semptomların geri çevrilmesinde oldukça etkilidir. Oksimler, tedavide kullanılan diğer önemli ilaç grubudur. Asetilkolinesteraz enzimini inaktif hale getiren fosfat grubunu enzimin yapısından uzaklaştırarak etki gösterirler. Ancak, oksimlerin asetilkolinesterazı yeniden aktif hale getirebilmesi için, enzime bağlanan organofosfat yaşlanma reaksiyonuna girmeden, ilk 24-48 saat içerisinde uygulanması gerekir (17).

Bu tedavilerin bazı yan etkileri olduğu da bildirilmiştir (21). Ayrıca, organofosfatlı pestisitlerin kimyasal savaş ajanı olarak kullanılması durumunda bu tip tedavilerin yetersiz kalacağıyla ilgili endişeler de vardır (22). Bu sebeplerle araştırmacılar direk olarak organofosfatları detoksifiye edebilecek bazı proteinleri araştırmaya başlamış, bütirikolinesteraz gibi bazı enzimlerin organofosfat zehirlenmelerinde fayda sağladığı görülmüştür (23, 24). Ancak bu gibi enzimlerin stokiyometrik olarak çalışmaları, yani bir protein molekülünün sadece bir organofosfat molekülünü devre dışı bırakabilmesi ve zehirlenme durumunda çok miktarda enzime ihtiyaç duyulması, kullanımlarını kısıtlamıştır (25). Katalitik olarak çalışan enzimler ise daha verimli terapötik ajanlardır; bir molekül enzim binlerce organofosfat molekülünü etkisizleştirebilir. Bu tür tedaviler yalnızca kasıtlı zehirlenme durumlarında ve büyük ölçekli kimyasal terörist saldırılarda değil, kazaen gerçekleşen insektisit zehirlenmelerinin tedavisinde de kullanılabilir (26).

2. SERUM PARAOKSONAZ 1 ENZİMİNİN ORGANOFOSFATLI PESTİSİT ZEHİRLENMELE- RİNDEKİ ROLÜ

İnsan serum paraoksonaz enzimi (PON1), organofosfat yapısındaki birçok pestisiti hidrolizleme özelliğinden dolayı, organofosfat zehirlenmelerinde kullanılmak üzere terapötik katalitik ajan olarak geliştirilmeye aday bir enzimdir (19). Bu derlemenin ikinci kısmında PON1 enziminin genel özellikleri, organofosfatlı pestisitlerin toksisitesindeki rolü ve organofosfat zehirlenmelerinin tedavisinde kullanılabilmesi için yapılan çalışmalar ele alınmaktadır.

2.1 Serum Paraoksonaz 1 Enziminin (PON1) Genel Özellikleri

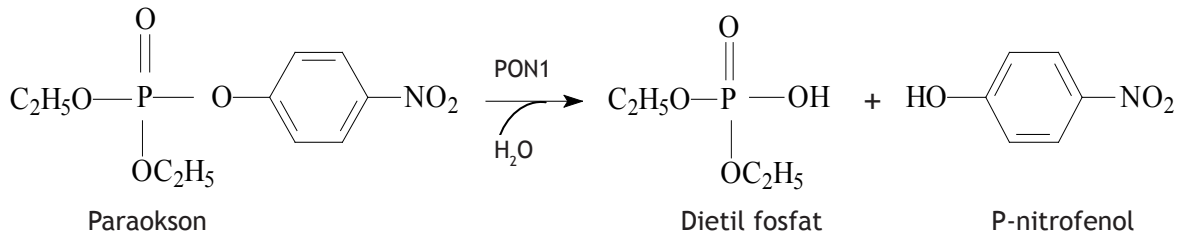
Paraoksonaz 1 (PON 1; EC 3.1.8.1) serumda yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) üzerinde yer alan, organofosfatlı pestisitlerin toksik okson metabolitlerini, bazı karbamatları, aromatik ve alifatik laktonları, aromatik esterleri ve okside lipidleri hidrolizleyen, kalsiyuma bağımlı glikoprotein yapısında bir enzimdir (19). Moleküler ağırlığı 43-45 kDa olan insan PON1, çoğunlukla karaciğerde 355 amino asitten oluşan bir protein olarak sentezlenir (27, 28). Karaciğerden kana salgılanması sırasında amino ucundan sadece metiyonin amino asiti uzaklaştırılır; amino ucunun geri kalanı PON1'in HDL'ye bağlanması için gereklidir (29). Kanda tamamen HDL'ye bağlı olarak bulunan PON1, insan kanında litrede 50 mg kadar bulunur (29, 30). En yüksek aktivitenin belirlendiği kan dışında karaciğer, böbrek, bağırsak, beyin gibi dokularda da PON1'e rastlanmıştır. Memelilerin birçok organında PON1 aktivitesi tespit edilmesine karşın, kuşlar, balıklar ve böceklerde paraoksonaz aktivitesi sifıra yakındır (31). İnsan PON1 geninin sekansı belirlenmiş ve 7. kromozomun uzun kolunda q21.3 ile q22.1 arasında bulunduğu bildirilmiştir (32).

2.2 PON1'in Substratları

PON1 enzimi adını laboratuvarında en sık kullanılan substratı olan paraoksondan almıştır (Şekil 2). Aslında PON1 bazı sentetik substratlara karşı çok usta bir esteraz olmasına rağmen, paraoksonaz aktivitesi biraz zayıftır. Dolayısı ile paraoksonaz enziminin adı, tarihsel bir addir. PON1 çok geniş substrat yelpazesi olan bir hidrolazdır (Tablo 1). PON1'in hidrolize ettiği substratlar arasında paration, diazinon ve klorprifos gibi organofosfatlı insektisitlerin toksik okson metabolitleri; sarin, soman ve tabun gibi sinir gazları; fenil asetat gibi aromatik esterler; homogentisik asit lakton, dihidrokumarin, γ -butirolakton ve homosistein tiolakton gibi birçok aromatik ve alifatik lakton ile siklik karbonatlar yer almaktadır (Şekil 3).

Tablo 1. İnsan PON1 enziminin substratları (31)

| Organofosfatlı bileşiklerin okson metabolitleri | Aril (aromatik) esterler |
|---|-----------------------------|
| paraokson | fenil asetat |
| metil paraokson | tiofenilasetat |
| pirimifos-metil okson | 2-naftilasetat |
| klorprifos okson | |
| diazokson | Aromatik laktonlar |
| klortion okson | Alifatik laktonlar |
| EPN okson | dihidrokarumarin |
| fenitroksion | γ -butirolakton |
| | homosistein tiolakton |
| Sinir Gazları | |
| soman | Siklik karbonatlar |
| sarin | prulifloksasin |
| tabun | |
| armin | Fosfolipit hidroperoksitler |

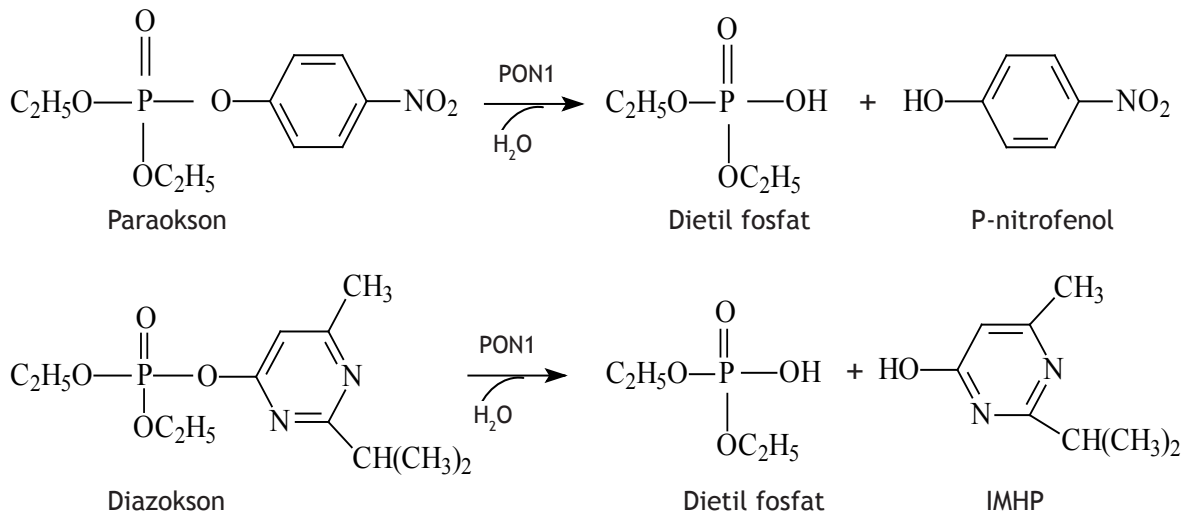


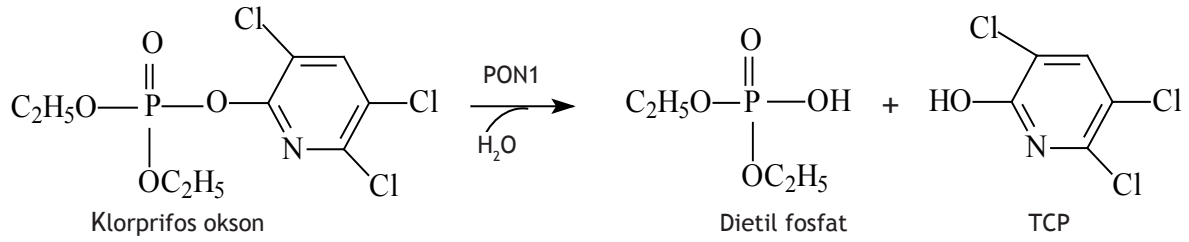
Şekil 2. Paraoksonun PON1 tarafından p-nitrofenol ve dietil fosfata hidroliz reaksiyonu (31).

Şekil 3. İnsan PON1 enziminin aktiviteleri ve örnek substratlar (31, 34).

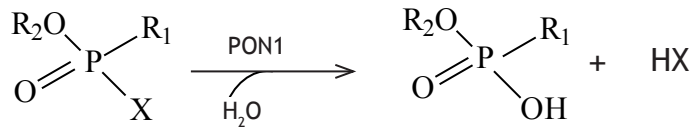
IMHP : 2-izopropil-4-metil-6-hidroksi pirimidin, TCP : 3,5,6-trikloro-2-piridinol

a) Organofosfatlı bileşiklerin toksik okson metabolitlerinin hidrolizi



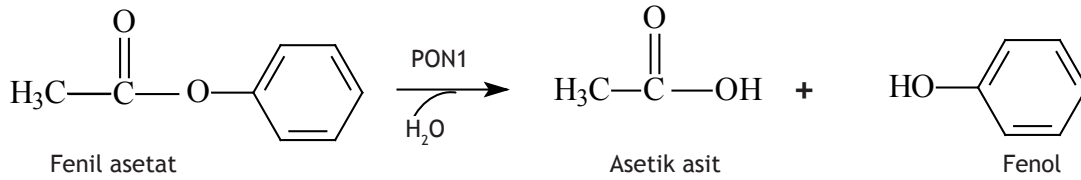


b) Sinir gazlarının hidrolizi

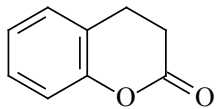
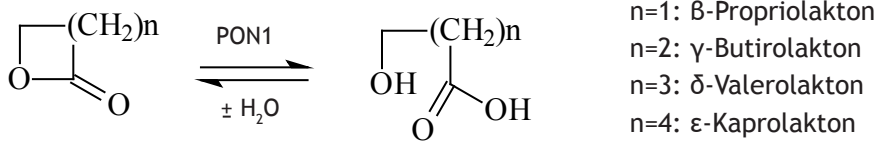


$\text{R}_1=\text{N}(\text{CH}_3)_2$ $\text{R}_2=\text{CH}_2\text{CH}_3$ $\text{X}=\text{CN}$ Etil N-dimetil fosforoamidosiyanidat (Tabun)
 $\text{R}_1=\text{CH}_3$ $\text{R}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ $\text{X}=\text{F}$ İzopropil metilfosfonofloridat (Sarin)
 $\text{R}_1=\text{CH}_3$ $\text{R}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$ $\text{X}=\text{F}$ Pinakolil metilfosfonofloridat (Soman)

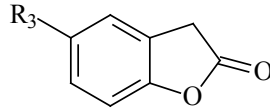
c) Aromatik esterlerin hidrolizi



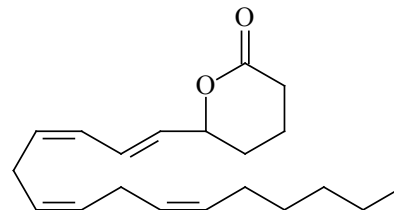
d) Laktonların hidrolizi ve hidroksi asitlerin laktonlara dönüştürülmesi



Dihidroksumarin



$\text{R}_3=\text{H}$ 2-Kumaronon
 $\text{R}_3=\text{OH}$ Homogentisik asit lakton



5-HETE lakton

PON1 laktonları hidrolize ettiği gibi bu reaksiyonun tersini de, yani γ ve δ -hidroksikarboksilik asitlerin laktonizasyonunu da katalizler. PON1 doymamış siklik karbonat ön-ilaç olan prulifloksasin'i aktif kuinolon antibiyotik NM394'e dönüştürür (33, 34).

PON1 aynı zamanda fosfolipit hidroperoksitleri hidrolizleyerek LDL ve HDL'yi oksidatif değişimlere karşı korumasıyla da tanınmaktadır (35). Bilindiği gibi okside olmuş LDL aterosjeniktir (36). PON1'in aterosklerozun oluşumunu ve ilerlemesini engellediğini ortaya koyan birçok çalışma yapılmıştır (37, 38). Ateroskleroz, koroner kalp hastalığı, kalp krizi, beyin damar hastalıkları ve inme gibi ciddi hastalıklara neden olduğu için büyük önem taşımaktadır. Bundan dolayı son yıllarda, insanlarda görülen oksidatif stres kaynaklı birçok hastalıkta PON1'in enzim aktivitesinin ölçümü ve PON1'i kodlayan gende bulunan polimorfizmlerin tespit edilmesi, popüler araştırma konuları olmuştur (39-42).

2.3 PON1'in Organofosfatlı Bileşiklerin Seçici Toksisitesindeki Rolü

PON1'in organofosfatlı bileşiklerin toksisitesindeki rolü ile ilgili kanıtlar türler arası karşılaştırmalardan, saflaştırılmış PON1 enzimi kullanılan hayvan çalışmalarından ve PON1 geni susturulmuş (knockout) farelerden gelmektedir. İlk yapılan çalışmalar, organofosfatlı pestisitlere karşı son derece hassas olan kuşların çok düşük serum PON1 aktivitesine sahip olduklarını göstermiştir (43, 44). Sıçanlar organofosfatlı pestisitlere karşı kuşlardan daha dayanıklıdır. Serum PON1 aktivitesi sıçanlardan 7 kat yüksek olan tavşanlar da sıçanlara göre daha dayanıklıdır (43). Bu ilk çalışmalar, düşük serum PON1 aktivitesine sahip olmanın organofosfatlı bileşiklerin akut etkilerine karşı duyarlılığı arttırdığını ortaya koymuştur (19).

PON1'in organofosfat zehirlenmelerinin tedavisinde kullanılmaya uygun bir enzim olabileceği düşüncesiyle yapılan ilk çalışmalarda tavşan veya insan serumundan izole edilip saflaştırılmış PON1'in

sıçan ve farelere organofosfat maruziyetinin öncesinde veya sonrasında enjekte edilmesi ve sonuçlarının gözlenmesi yolu izlenmiştir (45-52). 1956 yılında yaptığı öncü çalışmasında Main, tavşan serumundan kısmen saflaştırılmış PON1 enzimini sıçanlara enjekte etmiş ve paraoksonun akut toksisitesinde belirgin bir düşüş gözlemiştir (45). Costa ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada ise tavşan serumundan saflaştırılıp sıçanlara intravenöz yolla enjekte edilen PON1 enziminin, sıçanların serum PON1 aktivitesini paraoksona karşı 9 kat, klorprifos oksona karşı 50 kat arttırdığı görülmüştür. Bu sıçanların organik fosforlu bileşiklerin herhangi birine maruz bırakılmasının ardından değişik dokulardaki asetilkolinesteraz baskılanmasının düzeyi ölçülmüş, enjekte edilen PON1'in, özellikle klorprifos oksona karşı sıçanların direncini arttırdığı gözlenmiştir. Bu korumanın beyin ve diyafram dokularında daha belirgin olduğu ve organofosfatlı bileşiklerle temas cilt yoluyla gerçekleştiğinde de etkili olduğu bildirilmiştir (46). Farelerle yapılan deneylerde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (47). Enjekte edilen ekzojen PON1'in, klorprifos oksonun yanı sıra, insektisit olarak kullanılan klorprifosa karşı da koruma sağladığı görülmüştür. Üstelik, PON1 enjeksiyonunun, organofosfat maruziyetinin öncesinde yapıldığında zehirlenmeyi engellediği gibi, maruziyetten sonra (3 saate kadar) yapıldığında da koruma sağladığı gösterilmiştir (48). 2001 yılında adenoviral bir vektörden ifade edilen insan PON1, farelerde serum paraoksonaz aktivitesini %60 arttırmış ve fareleri klorprifosun toksisitesine karşı korumuştur (49). Yapılan bu çalışmalar, serum PON1 seviyesini yapay olarak arttırarak bazı organofosfatların toksik etkilerini azaltmanın mümkün olduğunu göstermiştir.

PON1'in organofosfatların toksikolojisindeki rolünü pekiştiren bulgular, PON1 geni susturulmuş farelerle yapılan çalışmalardan gelmektedir. Bu farelerin serum ve karaciğerlerinde paraokson ve diazoksona karşı hidrolitik aktivite yoktur, ancak klorprifos oksona karşı çok az hidrolitik aktivite gösterirler. PON1 geni susturulmuş farelerin yabani tip

farelere göre klorprifos ve diazinona karşı daha hassas oldukları; bu pestisitlerin aktif okson formları olan klorprifos okson ve diazoksone karşı hassasiyetlerinin ise son derece artmış olduğu görülmüştür. Paraoksonla yapılan çalışmalardan ise şaşırtıcı bir sonuç elde edilmiştir. PON1 geni susturulmuş farelerin plazma ve karaciğerlerinde hiç paraoksonaz aktivitesi bulunmamasına rağmen, yabancı tip farelere göre paraoksone karşı hassasiyetlerinin artmadığı görülmüştür. Öte yandan, PON1 geni susturulmuş bu farelere saflaştırılmış insan PON1 enzimi enjekte edildiğinde, plazmadaki PON1 seviyesinin eski durumuna geldiği ve bu enjeksiyonun diazoksone ve klorprifos oksona karşı direnci arttırdığı görülmüştür. Ancak, bu uygulama paraokson maruziyetine karşı koruma sağlamamıştır. Saflaştırılmış insan PON1 enzimi ile yapılan kinetik çalışmalarda, bu enzimin paraoksonu, diazokson veya klorprifos okson kadar verimli hidrolizleyemediği belirlenmiştir (50). Bu bulgu, düşük konsantrasyonlarda paraoksonun hidrolizinden sitokrom P450 ve karboksilesterazlar gibi başka enzimlerin sorumlu olabileceği düşüncesini pekiştirmiştir (51). PON1'in bir organofosfatlı pestisite karşı koruma sağlayıp sağlamayacağını belirlemede, katalitik verimin son derece önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Özetle, bu hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçlar, PON1'in bazı organofosfatların toksisitesinde kritik bir rol oynadığını ve plazmada PON1 seviyesini arttırarak organofosfat zehirlenmelerine karşı koruma sağlanabileceğini ortaya koymuştur (52).

Ancak, insanlar arasında serum PON1 aktivitesinde 40 kata kadar farklılık görülmesinden dolayı bu enzimin insan vücudunda organofosfat metabolizmasına ne derece katkıda bulunduğunu belirlemek kolay değildir (44). Enzim aktivitesinde görülen bu değişkenlik büyük oranda PON1 enzimi kodlayan gende bulunan nükleotit farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Toplumda görülme sıklığı en az %1 olan bu farklılıklara polimorfizm denmektedir. PON1 geninde enzimin katalitik yeteneğini etkileyen kodlayan bölge polimorfizmlerinin ve

enzimin ifade edilme seviyesini etkileyen promotor bölge polimorfizmlerinin bulunması, bazı kişilerin organofosfat toksisitesine karşı diğerlerinden daha hassas olabileceği düşüncesini doğurmuştur (52). PON1'in genetik polimorfizmlerinin organofosfatların toksisitesi üzerindeki etkisi bir sonraki bölümde detaylı bir şekilde anlatılmaktadır. Genetik polimorfizmler dışında serum PON1 aktivitesini etkileyen faktörler arasında yaş (53), gebelik (54), kalp damar hastalıkları (55, 56), beyin damar hastalıkları (57), diyabet (58), ailesel hiperkolesterolemi (59), böbrek hastalığı (60), romatid artirit (61), karaciğer sirozu (62), Alzheimer (63), hipertiroidi (64), astım (65), beslenme (66, 67), sigara (68), alkol alışkanlıkları (69), çevresel kirleticiler ve ilaçlar yer almaktadır (70). Bu faktörlerin, organofosfat maruziyetine karşı görülen tepkilerin insandan insana değişmesine yol açması son derece olağandır. Örneğin, organofosfatlı bileşiklerin akut toksisitesi yaşla değişim gösterir; genç hayvanların organofosfat zehirlenmelerine karşı daha hassas olduğu görülmüştür (71). Buna paralel olarak insanlarda yapılan çalışmalar, PON1 aktivitesinin doğumdan hemen sonra düşük olduğunu ve zamanla arttığını ortaya koymuştur (53, 72). Yaşlılıkla beraber PON1 aktivitesinde düşüş gözlenmektedir (73).

2.4 PON1'in Genetik Polimorfizmleri

PON1 enzimiyle ilgili yapılan ilk çalışmalarda insanların serum PON1 aktivitesi ölçüldüğünde, paraoksonaz aktivitesi yönünden kişilerin, yüksek, orta ve düşük aktivite gösterenler olmak üzere üç grupta toplandığı ortaya çıkmıştır (74). İlerleyen yıllarda PON1 geninin sekansı belirlendiğinde genin kodlayan bölgesinde iki tane polimorfizm tespit edilmiştir. Bu polimorfizmlerden ilki (192Q/R) enzimin sentezlenmesi sırasında 192. amino asit olarak glutamin (Q) yerine arjinin (R) eklenmesine neden olur (32). Bu polimorfizm enzimin katalitik aktivitesini bazı substratlara karşı ciddi şekilde etkilemektedir. Yapılan ilk çalışmalarda 192R izoformunun paraoksonu 192Q izoformundan 6 kat daha hızlı hidrolizlediği belirlenmiştir. Diazokson, sarin ve soman hidrolizi

yönünden ise tam tersi bir durum gözlenmiştir: 192Q izoformu diazokson, sarin ve somanı 192R izoformundan daha iyi hidrolizlemektedir. Klorprifos okson ve fenil asetat gibi bir grup substrat için ise PON1 192Q ve 192R izoformlarının hidroliz hızının aynı olduğu görülmüştür (75). Ancak, enzim aktivitesi ölçümleri fizyolojik koşullarda, ortamda daha az NaCl kullanılarak yapıldığında, 192R ve 192Q izoformlarının diazoksonu aynı hızda hidrolize ettiği ve 192R izoformunun klorprifos okson hidroliz hızının 192Q izoformundan daha yüksek olduğu görülmüştür (50). PON1 geninin kodlayan bölgesinde tespit edilmiş olan diğer polimorfizm (55L/M) ise enzimin 55. amino asitinde lösinden (L) metiyonine (M) değişime yol açar (32). Enzimin 55. pozisyonunda metiyonin taşıyan bireylerin (55M), 55L izoformunu taşıyanlardan daha düşük PON1 aktivitesine sahip oldukları gözlenmiştir. Ancak bu polimorfizmin enzimin katalitik aktivitesini direk etkilemediği, plazmada bulunan enzim seviyesi ile ilişkili olduğu için aktiviteyi dolaylı olarak etkilediği ortaya çıkmıştır (76). PON1 geninin promotör bölgesinde de çok sayıda genetik farklılıklar belirlenmiştir (77). Promotör bölge polimorfizmlerinden -107T/C, PON1 ifade seviyesindeki farklılıkların %22,4'ünden sorumlu olması nedeniyle, en önemlisidir. -107T alelini taşıyan bireylerin serum PON1 seviyeleri düşüktür (78).

2.5 PON1'in Genetik Polimorfizmlerinin Organofosfatların Toksikitesine Etkisi

PON1'in 192Q ve 192R izoformlarının laboratuvar ortamında (in-vitro) çeşitli organofosfat substratları hidrolizleme hızlarında tespit edilen farklılıklar, rodentlerle yapılan in-vivo deneylerde de görülmüştür. PON1 geni susturulmuş farelere enjekte edildiğinde, 192R formundaki PON1, plazmadaki klorprifos oksonaz aktivitesini 192Q izoformuna göre 1,7 kat daha fazla arttırmış ve klorprifos okson toksisitesine karşı 192Q formundaki enzimden daha fazla koruma sağlamıştır. Diazokson toksisitesine karşı ise PON1'in her iki izoformu da benzer seviyede

koruma sağlamıştır. Ancak, paraoksona karşı ne 192R ne de 192Q izoformu koruma sağlayabilmiştir. PON1 192R izoformu paraoksonu 192Q izoformundan 6 kat daha verimli hidrolizlemesine rağmen, saflaştırılmış enzimlerle yapılan in-vitro kinetik çalışmalar, her iki izoformun da paraokson hidrolizi için ölçülen katalitik veriminin, diazokson ve klorprifos okson hidrolizi için belirlenen verimden düşük olduğunu ortaya koymuştur. Ölçülen bu katalitik verim, PON1'in vücudu paraokson maruziyetinden korumasına yetmeyecek derecede düşüktür (50) ve paraoksonun detoksifiye edilmesinden PON1 dışındaki bazı metabolik enzimlerin sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (51). Daha sonraki yıllarda transgenik farelerle yapılan deneyler, elde edilmiş olan bu sonuçları desteklemiştir. Örneğin, insan PON1 enziminin 192R izoformunu ifade eden, ancak kendi PON1 geni susturulmuş fareler, insan PON1 192Q izoformunu ifade eden farelere göre klorprifos okson toksisitesine karşı daha dayanıklıdır (79).

Hayvanlarla yapılan bu çalışmalar göstermiştir ki, PON1'in organofosfat metabolizmasındaki rolü organofosfatın yapısına göre değişmektedir. Paraokson söz konusu olduğunda PON1'in belirgin bir koruyucu etkisi yoktur. Diazokson maruziyetinde zehirlenme mi korunma mı olacağını belirleyen en önemli etken PON1'in ifade edilme seviyesidir; 192Q/R genotipleri etkisizdir. Klorprifos oksonda ise hem enzimin ifade edilme seviyesi, hem de 192Q/R genotipleri hassasiyeti etkilemektedir (80).

2.6 PON1 Polimorfizmlerinin Klinik Etkileri

PON1'in genetik polimorfizmlerinin enzim aktivitesini etkilediğinin gözlenmesi ve bazı insanların PON1 aktivitesinin düşük olması, bu kişilerin organofosfat zehirlenmelerine karşı daha hassas olabileceği düşüncesini doğurmuştur (52). Ancak, hassasiyeti belirlemede enzim aktivitesini etkileyen PON1 genotipleri (enzimin kalitesi) kadar PON1'in serumdaki seviyesi (enzimin miktarı) de önem taşımaktadır.

1995'te Tokyo metrosunda düzenlenen sarin gazı saldırısında 12 kişi hayatını kaybetmiştir (15). Sarin PON1 tarafından metabolize edilen organofosfat yapısında bir sinir ajanıdır. Yapılan in-vitro deneylerde PON1 192Q izoformunun sarini 192R izoformundan 10 kat hızlı hidrolizlediği belirlenmiştir (75). Sarini daha yavaş hidrolizleyen 192R izoformu, Japonlar arasında 192Q izoformundan daha yaygındır. PON1 192R genotipinin Japonlarda görülme sıklığı 0,66 iken, Kafkas ırkına mensup toplumlarda 0,25-0,30 arasında değişmektedir (81, 82). Dolayısı ile Japonlar sarin toksisitesine karşı daha hassas olabilir. Ancak, Tokyo metrosu saldırısı kurbanlarının 7 tanesi sarin hidroliz aktivitesi yüksek olan 192Q alelini taşıyor olmasına rağmen, akut sarin zehirlenmesine karşı korunamamışlardır (83). Bunun bir nedeni, PON1'in her bir 192Q/R genotip grubunun kendi içerisinde enzim seviyesi yönünden farklılıklar göstermesidir. Daha önce de bahsedildiği gibi PON1 enzim aktivitesini ve seviyesini etkileyen pek çok etken vardır. Sarin gazı saldırısına uğrayan Japonlarda ise PON1 seviyeleri ölçülmemiştir. Ayrıca, saldırı sırasında maruz kalınan sarin miktarının PON1 enziminin tolere edilebilecek miktarın çok üzerinde olduğu belirtilmiştir. PON1'in sarini hidrolizleme aktivitesi düşüktür; paraoksonda olduğu gibi, izoformlardan biri sarini daha verimli hidrolizeyebiliyor olsa da, bu aktivite sarin toksisitesinden korumaya yeterli olmamaktadır.

1990-1991 yılları arasında Körfez Savaşı'nda görev alan Amerikan askerlerinde nedeni açıklanamayan kronik yorgunluk, kas ve eklem ağrısı, konsantrasyon kaybı, unutkanlık ve baş ağrısı gibi sorunlar görülmüştür (84). "Körfez Savaşı Sendromu" olarak adlandırılan bu rahatsızlığın, insanların savaş sırasında maruz kaldıkları seyreltilmiş uranyum, insektisitler, sinir gazları, petrol kuyularındaki yangınlarda oluşan duman ve çeşitli çözücüler gibi birçok kimyasal unsurdan ve/veya şarbon ve botulinum aşılardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir (52). Körfez Savaşı'nda bulunmuş olan ve sonrasında kendini hasta hissettiğini bildiren 25 asker ve 20 sağlıklı kontrol üzerinde yapılan bir çalışmada, nörolojik semptomlar gösterenlerin daha çok PON1 192RR homozigot veya

192QR heterozigot genotipinde oldukları, 192QQ genotipe ise daha az rastlandığı bildirilmiştir (85). Bu çalışma, sarin hidrolizleme aktivitesi düşük olan PON1 192R izoformunun körfez savaşında bulunmuş kişiler için risk faktörü olduğunu göstermiştir. Benzer bir çalışmada, kendilerinde Körfez Savaşı Sendromu belirtileri bulunduğunu bildiren 152 Körfez Savaşı gazisinde PON1'in paraoksonu hidrolizleme aktivitesi, kontrollerdekenden %50 düşük bulunmuştur. ELISA metodu ile belirlenen PON1 konsantrasyonu hastalarda %14 düşüktür. Düşük paraoksonaz aktivitesi ve konsantrasyonunun, genetik polimorfizmlerden bağımsız olduğu bildirilmiştir (86).

Geçtiğimiz yıllarda, koyunları parazitlere karşı ilaçlama işinde çalışan işçilerin organofosfatlı pestisitlere maruz kalması ile kronik merkezi sinir sistemi rahatsızlıkları arasında ilişki olup olmadığını inceleyen bazı çalışmalar yapılmıştır (87-89). Koyunları ilaçlamak için diazinon kullanan işçilerden hasta olan ve bu durumun ilaçlama ile ilgili olduğuna inananlar (hastalar) ile yine diazinon ile çalışan, ancak hasta olmayanlardan (kontroller) oluşan iki grup karşılaştırıldığında, hastaların serum diazoksonaz aktivitesinin kontrollerinkinden düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca, diazokson hidroliz hızı daha yavaş olan PON1 192R alelinin frekansı hastalarda (0,35) kontrollerdekenden (0,23) daha yüksektir (88). Türkiye'de yapılan bir çalışmada akut organofosfat zehirlenmesi yaşayan hastalarda paraoksonaz aktivitesi, kontrollerden %30 düşük bulunmuştur. Her iki grupta da PON1 konsantrasyonu benzer bulunduğu için, PON1 aktivitesinin zehirlenenlerde düşük çıkmasına neden olarak organofosfatların PON1'i direkt olarak inaktive ettiği veya zehirlenmeye neden olan organofosfatların enzimin aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan substrat ile yarışması öne sürülmüştür (90).

İnsanlar üzerinde yapılan bu çalışmalar göstermiştir ki, kişinin serum PON1 seviyesi ve aktivitesi, kişinin organofosfat maruziyetine karşı göstereceği tepkiyi etkileyebilir. İleride yapılacak çalışmalarda organofosfat maruziyetinin seviyesi ve sonuçları da dikkate alınmalıdır.

3. PON1'İN ORGANOFOSFAT ZEHİRLENMELERİNDE ANTİDÖT OLARAK KULLANIMI

PON1'in organofosfatlı pestisit ve sinir gazlarıyla zehirlenmelerde antidot olarak kullanılabilmesi için öncelikle saflaştırılmış enzimin yeterli miktarda elde edilebilmesi gerekir. Geleneksel saflaştırma yöntemleriyle elde edilen enzim miktarı bu ihtiyacı karşılamaktan çok uzaktır. Bu nedenle araştırmacılar, PON1'i çok miktarda üretebilecek bakteriyel sistemler üzerinde çalışmışlardır (91). Ayrıca, doğal insan PON1 enziminin paraoksonu ve organofosfat yapısındaki sinir ajanlarını hidrolizleme hızının yavaş olmasından dolayı, enzimin aktif bölgesinde bulunan amino asitlerin belirlenmesi ve protein mühendisliği yöntemleri kullanılarak bu amino asitlerin değiştirilmesi yoluyla daha aktif bir enzim ortaya çıkarılmasına yönelik çalışmalara hız verilmiştir (92, 93).

2008 yılında Stevens ve ark. (26) *Escherichia coli*'den hem doğal insan PON1 enzimini, hem de protein mühendisliği yöntemleri ile birtakım özelliklerini değiştirdikleri rekombinant enzimi ifade etmeyi ve aktif şekilde saflaştırmayı başarmıştır. 192. amino asiti lizin ile değiştirilmiş olduğu için 192K diye anılan bu PON1 varyantı glikolize değildir ve bundan dolayı immün reaksiyona yol açma olasılığı düşüktür (26). PON1 192K'nin organofosfat maruziyeti karşısındaki koruma kapasitesini belirlemek için öncelikle saflaştırılmış enzim PON1 geni susturulmuş farelere enjekte edilmiş ve plazmada ortaya çıkan rekombinant PON1 seviyesi diazoksonaz aktivitesi ölçülerek kontrol edilmiştir. Plazmada en yüksek PON1 seviyesi enjeksiyondan 8 saat sonra ölçülmüştür. Rekombinant PON1 enjeksiyonundan 48 saat sonra bu farelere dermal yoldan 1 mg/kg diazokson enjekte edilmiştir. PON1 192K enjeksiyonunun fareleri diazoksonun toksik etkilerinden koruduğu ve beyin kolinesteraz aktivitesinin baskılanmasını engellediği görülmüştür. Rekombinant PON1'in organofosfat maruziyetinden sonra da etkili olup olmadığını belirlemek için yapılan deneylerde PON1 geni susturulmuş fareler öncelikle yüksek dozda (3-7 mg/kg)

diazoksona maruz bırakılmış, 10 dakika sonra da bu farelerin bir kısmına rekombinant insan PON1 192K enzimi enjekte edilmiştir. Yalnızca diazokson verilen fareler ölümler, diazokson maruziyetinden sonra PON1 192K enjekte edilen fareler hayatta kalmış ve organofosfat zehirlenme belirtileri hafif olmuştur (50).

Organofosfat maruziyetinde etkili olabilmesi için PON1'in katalitik veriminin 77 civarında olması gerektiği hesaplanmıştır (50). Ancak doğal insan PON1'in katalitik verimi 73-75 civarındadır. Stevens ve ark. tarafından geliştirilen rekombinant PON1 192K'nin diazokson hidrolizi için katalitik verimi 118 olarak belirlenmiştir (26). PON1 192K farelere enjekte edildiğinde, serumdan saflaştırılıp enjekte edilen doğal PON1 ile benzer yarılanma ömrü olduğu görülmüştür (47, 50). PON1 192K'nin toksik olmadığı ve fareler tarafından iyi tolere edildiği tespit edilmiştir (26). Ancak Stevens ve ark. tarafından üretilmiş olan PON1 varyantının, doğal PON1 enzimine göre paraoksonaz aktivitesinde, dolayısı ile parationa karşı koruma kapasitesinde bir gelişme olduğundan bahsedilmemektedir.

PON1'in paraokson hidroliz aktivitesinde umulan artış Aharoni ve ark. tarafından geliştirilmiş olan bazı PON1 varyantlarında tespit edilmiştir (94). Yönlendirilmiş evrim yöntemiyle geliştirilmiş ve *E.coli*'de ifade edilmiş olan bu PON1 varyantlarının (G2E6 ve G3C9), paraokson, fenil asetat ve bazı sinir gazlarına karşı aktivitesi Otto ve ark. (95) tarafından değerlendirilmiştir. PON1 G2E6 ve G3C9 varyantlarının paraoksonu doğal insan PON1 enziminden daha iyi hidrolizlediği, ancak VX ve VR adlı sinir ajanlarını hidrolizleme hızlarının doğal insan PON1'in gerisinde kaldığı görülmüştür. Doğal PON1'in aktif bölgesinde bulunan histidin 115 triptofan ile değiştirildiğinde, enzim VR'yi hidrolizleme yeteneğini kaybetmekte, ancak paraokson ve VX'e karşı aktivitesi artmaktadır. G2E6'da histidin 115'in triptofanla değiştirilmesi paraoksona karşı aktivitesini değiştirmemiş, ancak VX aktivitesini arttırmıştır (95). Ne var ki, paraokson hidroliz aktivitesinde in-vitro ortamda artış tespit

edilen bu PON1 varyantlarının, paraokson toksisitesine karşı koruyuculuğu hayvan deneylerinde henüz teyit edilmemiştir.

SONUÇ

Bu derlemede anlatılan çalışmalar, PON1'in bazı organofosfatların metabolizmasında rol oynadığını kesin olarak ortaya koymaktadır. Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan denemelerde serumda PON1 miktarını yapay olarak arttırmanın bu hayvanları

organofosfat zehirlenmelerine karşı koruduğu görülmüştür. Benzer çalışmaların ileride insanlar üzerinde de yapılması ve olumlu sonuçlar alınması halinde PON1'in organofosfat zehirlenmelerinde antidot olarak kullanımının yolu açılmış olacaktır. Genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak tüm organofosfatlı pestisitlere ve sinir ajanlarına karşı yüksek aktivite gösteren PON1 varyantlarının ortaya çıkarılması, organofosfat zehirlenmelerinin tedavisine önemli bir katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Informal consultation on planning strategy for the prevention of pesticide poisoning, WHO, Geneva, WHO/VBC/86.926, 1986.
2. World Health Organization. Public health impact of pesticides used in agriculture, WHO, Geneva, 1990.
3. Ulusal Zehir Danışma Merkezi 2008 yılı çalışma raporu özeti. Türk Hij Den Biyol Derg, 2009; 66 (3) Ek 3.
4. World Health Organization. Public health impact of pesticides used in agriculture, Report of WHO/UNEP working group, WHO, Geneva, 1989.
5. Güler Ç, Çobanoğlu Z. Pestisitler. Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi. 1. Basım. T.C. Sağlık Bakanlığı Yayınları, Ankara, 1997: 37-8.
6. Jeyaratnam J, De Alwis Seneviratne RS, Copplestone JF. Survey of pesticide poisoning in Sri Lanka. Bull World Health Organ, 1982; 60(4): 615-19.
7. Jeyaratnam J. Health problems of pesticide usage in the Third World. Br J Ind Med, 1985; 42: 505-6.
8. <http://emedicine.medscape.com/article/167726-overview> erişim tarihi: 10.12.2009
9. Costa LG. Current issues in organophosphate toxicology. Clin Chim Acta, 2006; 366(1-2): 1-13.
10. Sataloğlu N, Aydın B, Turla A. Pestisit Zehirlenmeleri. Kor Hek, 2007; 6 (3): 169-74.
11. van der Hoek W, Konradsen F. Risk factors for acute pesticide poisoning in Sri Lanka. Trop Med Int Health, 2005; 10 (6) : 589-96.
12. Nagami H, Nishigaki Y, Matsushima S, Matsushita T, Asanuma S, Yajima N, Usuda M, Hirokawa M. Hospital-based survey of pesticide poisoning in Japan, 1998-2002. Int J Occup Environ Health, 2005; 11(2): 180-4.
13. Abdollahi M, Jalali N, Sabzevari O, Hoseini R, Ghanea T. A retrospective study of poisoning in Tehran. J Toxicol Clin Toxicol, 1997; 35(4): 387-93.
14. Eyer P, Szinicz L, Thiermann H, Worek F, Zilker T. Testing of antidotes for organophosphorus compounds: Experimental procedures and clinical reality. Toxicology, 2007; 233 (1-3): 108-19.
15. Suzuki T, Morito H, Ono K, Mackawa K, Nagai R, Yazaki Y. Sarin poisoning in Tokyo subway. Lancet, 1995; 345: 980-1.
16. Katz KD, Brooks DE. Toxicity, Organophosphate. <http://emedicine.medscape.com/article/167726-overview> Son erişim tarihi: 15.10.2009.
17. http://npic.orst.edu/RMPP/rmpp_ch4.pdf erişim tarihi: 11.12.2009
18. La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Kalow W, Ed. Pharmacogenetics of Drug Metabolism. New York: Pergamon Press, 1992.
19. Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE. Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: Effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. Annu Rev Med, 2003; 54: 371-92.
20. Luft FC. Insecticides and atherosclerosis. J Mol Med, 2001; 79: 415-6.
21. Rusyniak DE, Nañagas KA. Organophosphate poisoning. Semin Neurol, 2004; 24: 197-204.
22. Adanır T, Çetin Uysal F, Aksun M, Kurt Y, Özvardar Y, Savacı S. Paratiyon ve malatiyon ile gelişen iki organik fosfor entoksikasyonu. Türk Anest Rean Der Dergisi, 2005; 33: 186-91.

23. Broomfield CA, Maxwell DM, Solana RP, Castro CA, Finger AV, Lenz DE. Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther*, 1991; 259(2): 633-8.
24. Saxena A, Sun W, Luo C, Myers TM, Koplovitz I, Lenz DE, Doctor BP. Bioscavenger for protection from toxicity of organophosphorus compounds. *J Mol Neurosci*, 2006; 30 (1-2):145-8.
25. Lenz DE, Yeung D, Smith JR, Sweeney RE, Lumley LA, Cerasoli DM. Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: A mini review. *Toxicology*, 2007; 233 (1-3): 31-9.
26. Stevens RC, Suzuki SM, Cole TB, Park SS, Richter RJ, Furlong CE. Engineered recombinant human paraoxonase 1 (rHuPON1) purified from *Escherichia coli* protects against organophosphate poisoning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105(35): 12780-4.
27. Gan KN, Smolen A, Eckerson H, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase: evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos*, 1991; 19: 100-6.
28. Hassett C, Richter RJ, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, Omiecinski CJ, Furlong CE. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry*, 1991; 30: 10141-9.
29. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; 19: 2214-25.
30. Blatter M-C, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-85: identity of K-85 with paraoxonase. *Eur J Biochem*, 1993; 211: 871-9.
31. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004; 369(1): 78-88.
32. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet*, 1993; 3: 73-6.
33. Tougou K, Nakamura A, Watanabe S, Okuyama Y, Morino A. Paraoxonase has a major role in the hydrolysis of prulifloxacin (NM441), a prodrug of a new antibacterial agent. *Drug Metab Dispos*, 1998; 26(4): 355-9.
34. Chambers JE. PON1 multitasks to protect health. *PNAS*, 2008; 105 (35): 12639-40.
35. Mackness MI, Arrol S, Abbott CA, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*, 1993; 104: 129-35.
36. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, 1989; 320: 915-24.
37. Shih D, Gu L, Xia YR, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 1998; 394: 284-7.
38. Mackness B, Quarck R, Verreth W, Mackness M, Holvoet P. Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006; 26: 1545-50.
39. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest*, 1995; 96: 3005-8.
40. Mackness B, Durrington P, McElduff P, et al. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly prospective study. *Circulation*, 2003; 107(22): 2775-9.
41. Can Demirdöğen B, Türkanöğlü A, Bek S, et al. Paraoxonase/arylesterase ratio, PON1 192Q/R polymorphism and PON1 status are associated with increased risk of ischemic stroke. *Clin Biochem*, 2008; 41 (1-2): 1-9.
42. Demirdöğen BC, Demirkaya Ş, Türkanöğlü A, Bek S, Arınç S, Adalı O. Analysis of paraoxonase 1 (PON1) genetic polymorphisms and activities as risk factors for ischemic stroke in Turkish population. *Cell Biochem Funct*, 2009; 27(8): 558-67.
43. Brealey CB, Walker CH, Baldwin BC. A-esterase activities in relation to the differential toxicity of pirimiphosmethyl to birds and mammals. *Pestic Sci*, 1980; 11: 546-54.
44. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol*, 1998; 31: 329-36.
45. Main AR. The role of A-esterase in the acute toxicity of paraoxon, TEPP and parathion. *Can J Biochem Physiol*, 1956; 34: 197-216.
46. Costa LG, McDonald BE, Murphy SD, et al. Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1990; 103: 66-76.
47. Li W-F, Costa LG, Furlong CE. Serum paraoxonase status: A major factor in determining resistance to organophosphates. *J Toxicol Environ Health*, 1993; 40: 337-46.

48. Li W-F, Furlong C, Costa LG. Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett*, 1995; 76: 219-26.
49. Cowan J, Sinton CM, Varley AW, Wians FH, Haley RW, Munford RS. Gene therapy to prevent organophosphate intoxication. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001; 173: 1-6.
50. Li WF, Costa LG, Richter RJ, et al. Catalytic efficiency determines the in vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphates. *Pharmacogenetics*, 2000; 10: 767-79.
51. Chambers JE, MaT, Boone JS, Chambers HW. Role of detoxication pathways in acute toxicity levels of phosphorothionate insecticides in the rat. *Life Sci*, 1994; 54: 1357-64.
52. Costa LG, Cole TB, Furlong CE. Polymorphisms of paraoxonase (PON1) and their significance in clinical toxicology of organophosphates. *J Toxicol Clin Toxicol*, 2003; 41(1): 37-45.
53. Augustinsson KB, Barr M. Age variation in plasma arylesterase activity in children. *Clin Chim Acta*, 1963; 8: 568-73.
54. Weitman SD, Vodicnick MJ, Lech TJ. Influence of pregnancy on parathion toxicity and disposition. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1983; 71: 215-24.
55. McElveen J, Mackness MI, Colley CM, Peard T, Warner S, Walker CH. Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem*, 1986; 32: 671-3.
56. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; 19: 330-5.
57. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, et al. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000; 20: 2441-7.
58. Patel BN, Mackness MI, Harty DW, Arrol S, Boot-Handford RP, Durrington PN. Serum esterase activities and hyperlipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Biochem Biophys Acta*, 1990; 1035: 113-6.
59. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin - dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 1991; 86: 193-9.
60. Hasselwander O, McMaster D, Fogarty DG, Maxwell AP, Nicholls DP, Young IS. Serum paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure. *Clin Chem*, 1998; 44: 179-81.
61. Tanimoto N, Kumon Y, Suehiro T, et al. Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis. *Life Sci*, 2003; 72: 2877-85.
62. Ferré N, Camps J, Cabré M, Paul A, Joven J. Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. *Metabolism*, 2001; 50: 997-1000.
63. Paragh G, Balla P, Katona E, Seres I, Egerhazi A, Degrell I. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2002; 252: 63-7.
64. Raiszadeh F, Solati M, Etemadi A, Azizi F. Serum paraoxonase activity before and after treatment of thyrotoxicosis. *Clin Endocrinol*, 2004; 60: 75-80.
65. Cakmak A, Zeyrek D, Atas A, Selek S, Erel O. Oxidative status and paraoxonase activity in children with asthma. *Clin Invest Med*, 2009; 32(5): E327-34.
66. Shih DM, Gu L, Hama S, et al. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest*, 1996; 97: 1630-9.
67. Sutherland WHF, Walker RJ, de Jong SA, van Rij AM, Phillips V, Walker HL. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; 19: 1340-7.
68. Boemi M, Sirolla C, Testa R, Cenerelli S, Fumelli P, James RW. Smoking is associated with reduced serum levels of the antioxidant enzyme, paraoxonase, in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med*, 2004; 21: 423-7.
69. Debord J, Dantoine T, Bollinger JC, Abraham MH, Verneuil B, Merle L. Inhibition of arylesterase by aliphatic alcohols. *Chem Biol Interact*, 1998; 113: 105-15.
70. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors (statins) or tissue paraoxonase 1 and plasma platelet activating factor acetylhydrolase activities. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004; 43: 121-7.
71. Pope CN, Liu J. Age-related difference in sensitivity to organophosphorus pesticides. *Environ Toxicol Pharmacol*, 1997; 4: 309-14.
72. Ecobichon DJ, Stephens DS. Perinatal development of human blood esterases. *Clin Pharmacol Ther*, 1973; 14: 41-7.
73. Milochevitch C, Khalil A. Study of the paraoxonase and plateletactivating factor acetylhydrolase activities with aging. *Prostagl Leukot Essent Fatty Acids*, 2001; 65: 241-6.

74. Eckerson HW, White CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet*, 1983; 35: 1126-38.
75. Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet*, 1996; 14: 334-6.
76. Blatter Garin MC, James RW, Dussoix P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest*, 1997; 99: 62-6.
77. Brophy VM, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics*, 2001; 11: 77-84.
78. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet*, 2001; 68: 1428-36.
79. Cole TB, Walter BJ, Costa LG, et al. Contribution of paraoxonase (PON1) levels and Q192R genotype to organophosphate detoxication: evidence from humans and "humanized" transgenic mice. *Toxicol Sci*, 2003; 72 (Suppl. 1): 100.
80. Costa LG, Cole TB, Vitalone A, Furlong CE. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clin Chim Acta*, 2005; 352: 37-47.
81. Brophy VH, Jarvik GP, Furlong CE. PON1 polymorphisms. In: Costa LG, Furlong CE, eds. *Paraoxonase (PON1) in Health and Disease: Basic and Clinical Aspects*. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers, 2002: 53-77.
82. Yamasaki Y, Sakamoto K, Watada H, Kajimoto Y, Hori M. The Arg192 isoform of paraoxonase with low sarin-hydrolyzing activity is dominant in the Japanese. *Hum Genet*, 1997; 101:67-8.
83. Yamada Y, Takatori T, Nagao M, Iwase H, Kurada N, Yanagida J, Shinozuka T. Expression of paraoxonase isoform did not confer protection from acute sarin poisoning in the Tokyo subway terrorist attack. *Int J Leg Med*, 2001; 115: 82-4.
84. Institute of Medicine, Gulf War and Health. Vol. 1. Depleted Uranium, Pyridostigmine Bromide, Sarin, Vaccines. Washington, DC: National Academy Press, 2000; p. 408.
85. Haley RW, Billecke S, La Du BN. Association of low PON1 type Q (type A) arylesterase activity with neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999; 157: 227-33.
86. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Low paraoxonase in Persian gulf War veterans self-reporting Gulf War Syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 276: 729-33.
87. Pilkington A, Buchanan D, Jamal GA, et al. An epidemiological study of the relations between exposure to organophosphate pesticides and indices of chronic peripheral neuropathy and neuropsychological abnormalities in sheep farmers and dippers. *Occup Environ Med*, 2001; 58: 702-10.
88. Cherry N, Mackness MI, Durrington P, et al. Paraoxonase (PON1) polymorphisms in farmers attributing ill health to sheep dip. *Lancet*, 2002; 359: 763-4.
89. Mackness B, Durrington P, Povey A, et al. Paraoxonase and susceptibility to organophosphorus poisoning in farmers dipping sheep. *Pharmacogenetics*, 2003; 13(2): 81-8.
90. Sozmen EY, Mackness B, Sozmen B, et al. Effect of organophosphate intoxication on human serum paraoxonase. *Hum Exp Toxicol*, 2002; 21: 247-52.
91. Harel M, Brumshtein B, Meged R, et al. The 3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds light on its activity, stability, solubility, and crystallizability. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2007; 58: 347-53.
92. Yeung DT, Josse D, Nicholson JD, et al. Structure/function analyses of human serum paraoxonase (HuPON1) mutants designed from a DFPase-like homology model. *Biochim Biophys Acta*, 2004; 1702: 67-77.
93. Yeung DT, Lenz DE, Cerasoli DM. Analysis of active-site amino-acid residues of human serum paraoxonase using competitive substrates. *FEBS J*, 2005; 272: 2225- 30.
94. Aharoni A, Gaidukov Y, Yagur S, Toker L, Silman I, Tawfik DS. Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101(2): 482-7.
95. Otto TC, Harsch CK, Yeung DT, Magliery TJ, Cerasoli DM, Lenz DE. Dramatic differences in organophosphorus hydrolase activity between human and chimeric recombinant mammalian paraoxonase-1 enzymes. *Biochemistry*, 2009; 48(43): 10416-22.