

ZUZANNA SENDEROWSKA<sup>1</sup>, JACEK SEIN ANAND<sup>2</sup>, IWONA RYBAKOWSKA<sup>1</sup>

**PARAOKSONAZA 1 WPŁYWAJĄCA NA LIPOPROTEINY  
O WYSOKIEJ GĘSTOŚCI CZYNNIKIEM OCHRONNYM PRZED  
MIAŻDŻYCĄ TĘTNIC**

**PARAOXONASE 1 INFLUENCING ON HIGH DENSITY LIPOPROTEINS  
IS A PROTECTIVE AGENT AGAINST ATHEROSCLEROSIS**

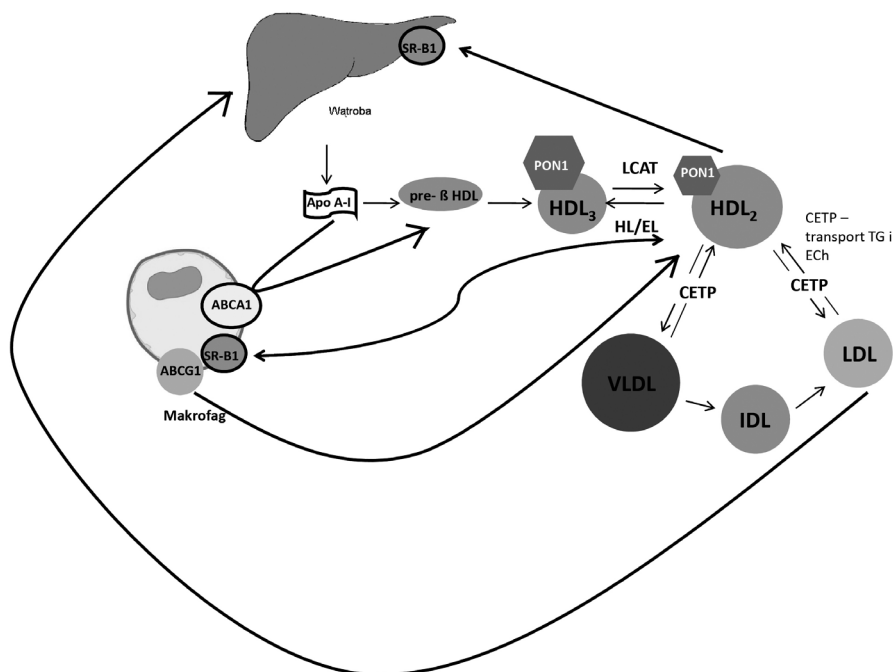
<sup>1</sup>Zakład Biochemii i Fizjologii Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
p.o. kierownika: dr n. med. Iwona Rybakowska

<sup>2</sup>Zakład Toksykologii Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
kierownik: dr hab. med. Jacek Sein Anand

Poznaje się coraz więcej czynników predysponujących do wczesnego wystąpienia zmian miażdżycowych, a w konsekwencji do chorób, między innymi układu sercowo-naczyniowego. Obecnie podkreśla się istotną rolę stresu oksydacyjnego w patogenezie miażdżycy, dlatego też istotnym jest zrozumienie mechanizmów prowadzących do wystąpienia takich zmian. Wiele badań poświęcono przeciwmiażdżycowemu działaniu lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL), które uczestnicząc w zwrotnym transporcie cholesterolu i zapobiegając utlenieniu lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), przyczyniają się do ochrony organizmu przed miażdżycą. W świetle ostatnich odkryć, wydaje się jednak, że cząstki HDL nie są odosobnione w swoim dobroczynnym działaniu, będąc wspierane przez enzym – paraoksonazę 1, który wiąże się z nimi.

Paraoksonaza (PON1) jest glikoproteiną o masie 43-47 kDa należącą do trójgenowej rodziny enzymów (PON1, PON2, PON3), z czego w organizmie ludzkim aktywność PON1 jest wyraźnie dominująca. PON1 syntetyzowana jest przede wszystkim w wątrobie, skąd po sekrecji i przedostaniu się do surowicy zostaje związana głównie z HDL za pomocą hydrofobowego końca – N (H1), końcem amfipatycznym jest część aktywna enzymu (H2) [6]. Jedyne niewielkie ilości PON1 zostały wykryte na lipoproteinach o bardzo niskiej gęstości (VLDL) i poposiłkowych chylomikronach [5]. PON1 jest enzymem zbudowanym z 6 walcowatych struktur, każdy z walców składa się z 4 pasm. W centrum znajdują się dwa jony wapnia, z których jeden pełni rolę stabilizującą, gdyż jego dysocjacja powoduje nieodwracalną denaturację PON1, a drugiemu przypisuje się rolę jonu katalitycznego. Białko to posiada aktywność arylosterazy, organofosfatazy, laktonazy ponadto posiada zdolność hydrolizy różnych substratów.

PON1 hydrolizując wiązania estrowe, uczestniczy w metabolizmie związków chemicznych używanych powszechnie jako substancje o działaniu owadobójczym oraz obronnym [13]. Od momentu opisanego tego enzymu po raz pierwszy w latach 40. do lat 90., PON1 był uważany za enzym uczestniczący w detoksykacji, mający zdolność do metabolizmu związków fosforoorganicznych, takich jak paraokson, diazokson, a także gazów bojowych jak sarin czy soman, jednak niewiele wiadomo było na temat fizjologicznej roli PON1 [9].



Ryc. 1. Dojrzewanie i metabolizm HDL. Apo A-I syntetyzowana w wątrobie, łączy się z cholesterolem i fosfolipidami transportowanymi przez ABCA1 formując pre-β HDL. Do HDL dołączana jest PON1, działanie LCAT powoduje zwiększenie rozmiarów HDL poprzez estryfikację wolnego cholesterolu, który wbudowywany do rdzenia. Pre-β HDL przekształcane są w HDL<sub>3</sub>, a następnie w HDL<sub>2</sub>. Cząstki HDL<sub>2</sub> pobierają więcej cholesterolu z komórek poprzez receptor SR-B1 i ABCG1. Poprzez transportery CETP dochodzi do wymiany TG (triacyloglicerole) i ECh (estry cholesterolu) między frakcjami HDL, VLDL i LDL. HDL podlegają działaniu dwóch lipaz: śródbłonkowej (EL) i wątrobowej (HL), EL ma aktywność fosfolipazy A1, HL natomiast silnie hydrolizuje triacyloglicerole zawarte w HDL

Fig. 1. HDL maturation and metabolism. Apo A-I is synthesized by the liver, it binds with cholesterol and phospholipids transported by ABCA1 and it forms pre-β HDL. PON1 is added to HDL particle. LCAT converts free cholesterol into cholesteryl-esters which are embedded into HDL core and enlarge them. Pre-β HDL transforms into HDL<sub>3</sub> then HDL<sub>2</sub>. HDL<sub>2</sub> mobilizes more cholesterol from cells through SR-B1 and ABCG1 receptor. These particles are also a substrate for CETP which transfers (TG) triacylglycerols and ECh (cholesteryl-esters) between HDL, VLDL and LDL. Endothelial (EL) and hepatic lipase (HL) take part in HDL metabolism. EL has phospholipase A1 activity and HL strongly hydrolyses triglycerides in HDL

W latach 90. po raz pierwszy opisano potencjalną fizjologiczną rolę paraoksonazy 1, wysunięto hipotezę, iż enzym ten może być odpowiedzialny za ochronę i ograniczenie utlenienia LDL, PON1 została więc pierwszy raz opisana jako enzym o właściwościach antyoksydacyjnych [9]. Hamowanie powstawania utlenionych form LDL (oxLDL) ma kluczowe znaczenie w patogenezie arteriosklerozy, gdzie utlenione cząsteczki LDL są wychwytywane przez makrofagi, powodując ich przeładowanie cholesterolem oraz wytworzenie komórek piankowatych i zapoczątkowanie całej kaskady procesów prowadzących do powstania zmian miażdżycowych [13]. Co więcej, w badaniach udowodniono, że PON1 ma także ochronny wpływ na same cząsteczki HDL, ochraniając je przed procesami oksydacyjnymi. Stwierdzono, że dodatek oczyszczonej PON1 do surowicy zmniejsza utlenienie tych cząstek nawet do 95%. Enzym, wywierając ochronny wpływ na cząsteczki HDL umożliwia im pełnienie najważniejszych funkcji, jakimi są zwrotny transport cholesterolu i zapobieganie powstawaniu oxLDL [1]. Co więcej, badania na myszach z *knockoutem* PON-1 potwierdzają znaczącą rolę tego enzymu. Stwierdzono, że zwierzęta z niedoborem PON1 są znacznie bardziej wrażliwe na toksyczne działanie środków owadobójczych ponadto cząsteczki HDL wyizolowane od takich myszy nie są w stanie zapobiec utlenieniu LDL, a także same są bardziej podatne na proces utlenienia, w porównaniu do myszy typu dzikiego. Po poddaniu myszy z niedoborem PON-1 diecie wysokotłuszczowej okazało się, że są one bardziej podatne na wystąpienie zmian miażdżycowych niż te, które tego *knockoutu* nie posiadały [11]. Także eksperymenty przeprowadzone na myszach z podwójnym *knockoutem* PON1/apo E, potwierdzają ochronną rolę tego enzymu przed stresem oksydacyjnym i jego skutkami [12]. Podczas badań nad możliwym antyoksydacyjnym działaniem enzymu stwierdzono, że PON1 związana z HDL, a także oczyszczona PON1, w dużym stopniu hydrolizują nadtlenek wodoru, będący główną reaktywną formą tlenu powstającą podczas stresu oksydacyjnego wynikającego ze zmian o charakterze miażdżycowym [1]. HDL wpływają na PON1, tworząc środowisko reakcyjne będące optymalnym dla działania enzymu. Lipoproteiny te stanowią fizjologiczny kompleks stymulujący wydzielanie enzymu i stabilizujący go [7]. Jednakże HDL nie stanowią homogennej grupy lipoprotein. W ich obrębie wyróżnia się podklasy charakteryzowane na podstawie zwiększającej się wielkości, i tak wyróżniamy HDL<sub>3c</sub>, HDL<sub>3b</sub>, HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>2b</sub>, HDL<sub>2a</sub>. Uważa się, że cząstki te, różniące się wielkością i gęstością, mogą mieć różne właściwości antyaterogenne. W pierwszym etapie ich metabolizmu apoA-I, syntetyzowana przez wątrobę, łączy się z cholesterolem i fosfolipidami transportowanymi przez makrofagowy transporter ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter sub-family A member 1*), tworząc ubogi w lipidy pre-β HDL (ryc. 1). Kolejnym krokiem w dojrzewaniu HDL jest działanie acylotransferazy lecytyno-cholesterolowej (LCAT), która wiążąc się do HDL powoduje przekształcenie wolnego cholesterolu do jego estrów, które wbudowywane są do rdzenia cząsteczki. Pre-β HDL przekształcane są w HDL<sub>3</sub>, a następnie w HDL<sub>2</sub>. Dojrzała cząstka HDL przyjmuje większe ilości cholesterolu z makrofagów i innych komórek za pomocą receptora typu zmiatacz SR-B1 (*scavenger receptor class B member 1*), a także ABCG1 (*ATP-binding cassette sub-family G member 1*). Receptor SR-B1 wiąże większe cząstki formując kompleksy umożliwiające dwukierunkowy przepływ cholesterolu, natomiast ABCG1 jest transporterem wewnątrzkomórkowym. Przemieszczanie cholesterolu zestryfikowanego i triglicerydów między HDL, VLDL i LDL odbywa się za pomocą transportera CETP (*cholesteryl ester transfer protein*), natomiast PLTP (*phospholipid transfer protein*) jest transporterem fosfolipidów między VLDL i HDL. HDL podlegają działaniu dwóch lipaz – lipazy śródbłonkowej (EL) i lipazy wątrobowej (HL). EL wykazuje dużą aktywność fosfo-

lipazy A1, powoduje zmniejszenie rozmiarów HDL, podczas gdy HL jest bardziej efektywna w hydrolizie trójglicerydów [6].

Uważa się, że to duże HDL są tymi o większym działaniu antyaterogennym, a co za tym idzie kardioprotekcyjnym, gdyż obniżone ilości tej frakcji są stwierdzane u pacjentów z chorobą wieńcową, jednakże to małe cząstki HDL są w stanie przyjąć większe ilości cholesterolu i posiadają lepsze właściwości antyoksydacyjne. Szereg badań potwierdziło, że aktywność PON1 jest preferencyjnie większa na HDL<sub>3</sub>, czyli na mniejszych cząstkach HDL, czyniąc je silniejszymi antyoksydantami. Badania potwierdzają, że PON1 przemieszcza się między cząstkami HDL wraz z ich dojrzewaniem. Niewiele wiadomo o dynamice tych zmian, stwierdzono jednak, że pre-β HDL zdają się być ubogie w PON1 [6]. Większość surowiczej PON1 jest zlokalizowana na powierzchni HDL, a główna apolipoproteina HDL A-I (apoA-I) stabilizuje aktywność PON1. W warunkach patofizjologicznych, w których pacjenci posiadają niskie stężenie apoA-I w krwi, PON1 zostaje przeniesiona z HDL o małej wielkości do surowicy ubogiej w lipoproteiny (LPDS). Stwierdzono, że u osób z niedoborem apoA-I 38% PON1 znajduje się we frakcji wolnej od lipoprotein, podczas gdy u ludzi zdrowych jedynie 5% całkowitej PON1 znajdującej się w surowicy jest rozmieszczona w tej frakcji. Uważa się, że przeniesienie PON1 między frakcją wolną od lipoprotein, a HDL może mieć wpływ na antyaterogenne właściwości tego enzymu. Sądzi się, że PON1 wykazuje słabsze działanie antyaterogenne gdy znajduje się we frakcji wolnej od lipoprotein, niż gdy jest związana z HDL [10].

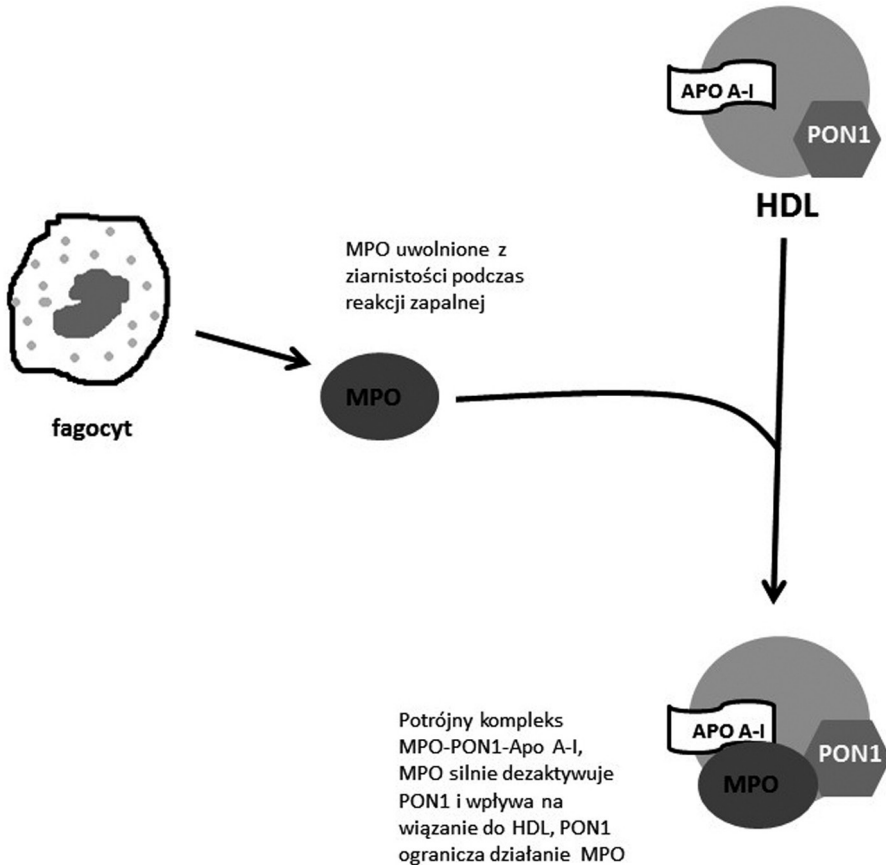
Istnieją jednak również badania wykonane na zwierzętach, które wskazują, że *knockout* PON1 u myszy związany ze wzrostem poziomu kwasu 5,6-epoksyekoizatrienowego może prowadzić do obniżenia ciśnienia krwi, co może mieć znaczenie kliniczne podczas identyfikacji predyspozycji do wystąpienia nadciśnienia i rozwinięcia się chorób sercowo-naczyniowych [4].

Na aktywność PON1 wpływa szereg czynników. Są to zarówno czynniki egzo- jak i endogenne. Apo-AI, która jest białkiem znajdującym się na HDL, nie jest czynnikiem niezbędnym do działania PON1, jednakże jego rola jest ważna w stabilizacji i utrzymaniu aktywności enzymu [5]. Znalaziono również korelację między zmianą aktywności PON1 a zmianą ilości apolipoproteiny E. Przypuszcza się, że apoE może podobnie wpływać na stabilność PON1 jak apo A-I [6,3].

Stwierdzono ponad 160 polimorfizmów genu PON1, niektóre z nich mają wpływ na aktywność i stężenie enzymu. Dwa spośród nich zostały szeroko opisane w literaturze. Polimorfizm Q192R polega na zmianie kodonu CAA na CGA w eksonie 6 genu PON1, co prowadzi do substytucji glutaminy przez argininę w pozycji 192. Powstanie dwóch alloenzymów Q192 i R192 skutkuje ich różną zdolnością do hydrolizy poszczególnych substratów. Polimorfizm ten ma również wpływ na zdolność PON1 do ochrony LDL przed utlenieniem, i stwierdzono, że alloenzym Q192 jest bardziej wydajny niż R192. Kolejnym najczęściej opisywanym polimorfizmem jest L55M, który polega na zmianie kodonu TTG na ATG w eksonie 3 genu PON1, co skutkuje substytucją leucyny na metioninę w pozycji 55. Polimorfizm ten nie ma wpływu na interakcje enzymu z substratami, ale wpływa na poziom mRNA, co skutkuje zmianami stężenia i aktywności PON1. Alloenzymowi M55 przypisuje się niższą aktywność enzymu, niższe stężenie i niższy poziom PON1 mRNA, ale równocześnie zdaje się on lepiej ochraniać LDL przed oksydacją. Wariant L55 jest bardziej stabilny i odporny na proteolizę, co może wiązać się z wyższymi stężeniami enzymu w surowicy [5].

Do czynników pozagenetycznych, które mają wpływ na działanie PON1 należy m.in. dieta. Udowodniono, że regularne spożywanie soku z owocu granatu, który zawiera flawonoidy,

skutkowało znacznym podwyższeniem aktywności PON1 u pacjentów ze zwężeniem tętnicy szyjnej. Podobny efekt uzyskano u myszy z niedoborem apoE, którym podawano umiarkowane ilości czerwonego wina. Stwierdzono, że umiarkowane spożycie alkoholu może podwyższyć aktywność PON1 nawet o 395%. Niewielka ilość alkoholu stymuluje wątrobę do produkcji PON1, podczas gdy nadużycie powoduje zahamowanie ekspresji genu PON1, a co za tym idzie obniżenie jego stężenia w surowicy [9]. Również palenie papierosów ma wpływ na enzym, obniżając jego aktywność u palaczy. Efekt ten jest tłumaczony powstawaniem u tej grupy osób reaktywnych aldehydów (aldehydu octowego, formaldehydu) oraz węglowodorów aromatycznych [2]. Wiele mówi się o aktywności fizycznej, jako o czynniku chroniącym przed



Ryc. 2. Wpływ MPO na HDL i aktywność PON1. MPO uwolniona z ziarnistości fagocytów podczas stanu zapalnego wiąże się w potrójny kompleks z PON1 i Apo A-I zawarty na HDL. MPO silnie dezaktywuje PON1 poprzez jego oksydację, co ma również wpływ na wiązanie z HDL. PON1 ogranicza działanie MPO

Fig. 2. Influence of MPO on HDL and activity of PON1. MPO is released from granules of phagocytes and it is bound to PON1 and Apo A-I on HDL forming a ternary complex. MPO oxidizes and strongly inactivates PON1 which has an impact on binding of PON1 to HDL. PON1 limits MPO activity

chorobami sercowo-naczyniowymi. W badaniach wykazano, że u osób prowadzących siedzący tryb życia aktywność PON1 jest niższa, stwierdzono ponadto dobroczynny wpływ zarówno regularnych ćwiczeń jak i jednorazowej aktywności fizycznej na aktywność tego enzymu [9]. Zbadano również wpływ niektórych leków na aktywność PON1, i tak aspiryna podwyższa aktywność PON1, co jak udowodniły badania na myszach, ma najprawdopodobniej związek ze zwiększoną transkrypcją genu PON1 w wątrobie, podobny efekt wywołuje stosowanie statyn, niektóre fibraty powodowały obniżenie aktywności PON1 u szczurów, natomiast badania *in vitro* na komórkach ludzkich dawały sprzeczne wyniki [2, 8, 9]. Wykazano, że na aktywność PON1 mają też wpływ inhibitory LCAT i CETP. Hamujące działanie tych związków wpływa na spowolnioną wymianę apolipoprotein oraz opóźnia transfer PON1 z HDL do sdLDL (*small dense LDL*). Uważa się, że dojrzwienie HDL optymalizuje działanie PON1, a aktywacja ta jest zależna od remodelingu HDL poprzez wymianę lipidów między tymi cząstkami, a lipoproteinami zawierającymi apo-B. Działanie związane z opóźnionym transferem apolipoprotein i PON1 mogą najprawdopodobniej tłumaczyć niepowodzenie terapeutyczne leków opartych na mechanizmie inhibicji LCAT i CETP [6].

Kolejnym czynnikiem mającym wpływ na aktywność paraoksonazy 1 jest mieloperoksydaza (MPO), enzym uwalniany z ziarnistości granulocytarnych podczas reakcji zapalnych. MPO jest źródłem reaktywnych form tlenu, powoduje utlenienie LDL, a także apo A-I zawartych na HDL, co prowadzi do pogorszenia ich antyaterogennych funkcji. Co więcej MPO, PON1 i HDL wiążą się tworząc potrójny kompleks, w którym PON1 tłumi działanie MPO, a MPO silnie hamuje aktywność PON1. MPO powoduje utlenienie PON1, co doprowadza do utraty jej funkcji, ma wpływ na wiązanie z HDL, a także upośledzenie funkcji apo A-I (ryc. 2) [6].

Niska aktywność paraoksonazy 1 jest obecnie uważana za czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Co więcej obniżoną aktywność tego enzymu obserwuje się również u pacjentów z zespołem metabolicznym, czy cukrzycą typu 2. Wydaje się, że enzym ten odgrywa istotną rolę w ochronie organizmu przed stresem oksydacyjnym i powikłaniami z nim związanymi, jednak nie do końca poznane są wszystkie jego właściwości. Interesującym byłoby pogłębienie badań nad PON1 i być może włączenie oznaczeń PON1 do pakietu badań określających czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Aviram M., Rosenblat M., Bisgaier Ch. L., Newton R. S., Primo-Parmo S. L., La Du B. N.: Paraonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. *J. Clin. Invest.* 1998, 101, 8, 1581. – 2. Ciumarnean L., Milaciu M. V., Macarie A. E., Sampelean D. P., Achimas-Cadariu A.: Non-genetic factors influencing serum PON1 levels. *Hum. Vet. Med.* 2014, 6, 1, 20. – 3. Dullaart R. P. F., Kwakernaak A. J., Dallinga-Thie G. M.: The positive relationship of serum paraoxonase-1 activity with apolipoprotein E is abrogated in metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2013, 230, 1, 6. – 4. Gamliel-Lazarovich A., Abassi Z., Khatib S., Tavori H., Vaya J., Aviram M., Keidar S.: Paraonase 1 deficiency in mice is associated with hypotension and increased levels of 5,6-epoxyeicosatrienoic acid. *Atherosclerosis* 2012, 222, 1, 92. – 5. Grdic Rajkovic M., Rumora L., Barisic K.: The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. *Biochem. Med.* 2011, 21, 2, 122. – 6. Gugliucci A., Menini T.: Paraonase 1 and HDL maturation. *Clin. Chim. Acta* 2015, 439, 5. – 7. James R. W., Deakin S. P.: The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic. Biol. Med.* 2004, 37, 12, 1986. – 8. Litvinov D., Mahini H., Garelnabi M.: Antioxidant and anti-inflammatory role of paraonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. *N. Am. J. Med. Sci.* 2012, 4, 11, 523. – 9. Otocka-Kmiciek A.,

Orłowska-Majdak M.: The role of genetic (PON1 polymorphism) and environmental factors, especially physical activity, in antioxidant function of paraoxonase. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2009, 63, 668. – 10. Rosenblat M., Karry R., Aviram M.: Paraoxonase 1 (PON1) is more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: relevance to diabetes. *Atherosclerosis*, 2006, 187, 1, 74e1.

11. Shih D. M., Gu L., Xia Y.-R., Navab M., Li W.-F., Hama S., Castellani L. W., Furlong C. E., Costa L. G., Fogelman A. M., Lusis A. J.: Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998, 394, 6690, 284. – 12. Shih D. M., Xia Y.-R., Wang X.-P., Miller E., Castellani L. W., Subbanagounder G., Cheroutre H., Faull K. F., Berliner J. A., Witztum J. L., Lusis A. J.: Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 23, 17527. – 13. Zielaskowska J., Olszewska-Słonina D.: Polimorfizm paraoksonazy a procesy fizjologiczne i patologiczne. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2006, 15, 6, 1073.

Z. Senderowska, J. Sein Anand, I. Rybakowska

#### PARAOXONASE 1 INFLUENCING ON HIGH DENSITY LIPOPROTEINS IS A PROTECTIVE AGENT AGAINST ATHEROSCLEROSIS

##### Summary

Nowadays plenty of attention is paid to recognition of all atherogenic risks. Recently paraoxonase 1 has been joined to all widely known atherogenic factors. This enzyme influences HDL and LDL fractions, prevents them against oxidation, which in consequence is prevention of atherosclerotic lesions. PON1 has a particular impact on HDL fraction to which it is bounded. Antioxidant action of PON1 was also confirmed on models of animal which were lacking of this gene. There have been many genetic and non-genetic factors described which have influence on activity of PON1. Because of low PON1 activities in some medical conditions it is assumed that its reduced activity may be the cause of atherogenic lesions and may also be a risk factor of cardio-vascular diseases.

Adres: mgr Zuzanna Senderowska

Zakład Biochemii i Fizjologii Klinicznej GUMed

ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

e-mail: zuzannasenderowska@gumed.edu.pl

