

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA

*Rezumatul tezei de doctorat*

# **Polimorfismul genetic al enzimelor antioxidante în profilul sindromului metabolic**

Doctorand: **Lorena Ciumărnean**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Andrei Cadariu Achimaș**

CLUJ-NAPOCA 2014

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	17
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Spectrul enzimatic antioxidant</b>	21
1.1. Modulatori ai stresului oxidativ	21
1.2. Sisteme antioxidante enzimaticice	21
<b>2. Familia Paraoxonazelor</b>	23
2.1. Paraoxonaza 1	23
2.1.1. Structura	24
2.1.2. Activitățile PON1	24
2.1.3. Polimorfismele PON1	25
2.1.3.1. SNPs din regiunea promoterului	26
2.1.3.2. SNPs din regiunea codificatoare	26
2.2. Factori non-genetici ce modulează nivelul plasmatic al PON1	27
2.2.1. Afectarea PON1 de către compușii exogeni	27
2.2.1.1. Substanțe chimice din mediu	27
2.2.1.2. Medicamente	27
2.2.2. Influența PON1 de către factori ai stilului de viață	28
2.3. Influența vârstei, sexului și a diferitelor condiții fiziologice asupra activității PON1	29
2.4. Condiții patologice	29
2.5. Statusul PON1	30
<b>3. PON1 în profilul sindromului metabolic</b>	31
3.1. Sindromul metabolic. Definiție	31
3.2. Polimorfismele PON1 în profilul sindromului metabolic	31
3.2.1. Polimorfismele regiunii codificatoare a PON1 în profilul sindromului metabolic	31
3.2.2. Polimorfismele regiunii promoter a PON1 în profilul sindromului metabolic	33
3.3. Fenotipul PON1 în profilul sindromului metabolic	34
3.3.1. Obezitatea abdominală	34
3.3.2. HDL	35
3.3.3. Profilul lipidic	36
3.3.4. Steatoza hepatică non-alcoolică	37
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru</b>	41
<b>2. Metodologie generală</b>	43
2.1. Material și metodă	43
2.1.1. Măsurători antropometrice și examen clinic	43

2.1.2. Eșantioane sangvine și serice	44
2.2. Determinări biochimice și genetice	44
2.2.1. Determinarea activităților enzimaticice ale PON1	44
2.2.1.1. Activitatea lactonazică	44
2.2.1.2. Activitatea arilesterazică	44
2.2.1.3. Activitatea paraoxonazică	45
2.3. Determinarea polimorfismelor genetice ale PON1	45
2.3.1. Recoltarea sângelui pentru izolarea ADN	45
2.3.2. Izolarea ADN-ului genomic din sânge integral	45
2.3.3. Determinarea concentrației și purității ADN	46
2.3.4. Genotiparea PON1 Q192R	46
2.3.5. Genotiparea PON1 L55M	48
2.3.6. Genotiparea PON1 C-108T	50
2.3.7. Genotiparea PON1 A-162G	51
2.3.8. Genotiparea PON1 G-909C	53
2.3.9. Analiza statistică	54
<b>3. Studiul 1. Polimorfismele și activitățile PON1 la pacienți cu obezitate abdominală</b>	<b>57</b>
3.1. Introducere	57
3.2. Ipoteza de lucru	58
3.3. Material și metodă	58
3.3.1. Criterii de includere	58
3.3.2. Criterii de excludere	58
3.3.3. Variabile măsurate	59
3.3.4. Determinarea activităților enzimaticice ale paraoxonazei 1 și genotiparea polimorfismelor Q192R și L55M	59
3.3.5. Analiza statistică	59
3.4. Rezultate	59
3.5. Discuții	65
3.6. Concluzii	67
<b>4. Studiul 2. Polimorfismele regiunii reglatoare și activitățile PON1 la pacienți cu SM</b>	<b>69</b>
4.1. Introducere	69
4.2. Ipoteza de lucru	70
4.3. Material și metodă	70
4.3.1. Criterii de includere	70
4.3.2. Criterii de excludere	70
4.3.3. Variabile măsurate	71
4.3.4. Determinarea activităților enzimaticice ale paraoxonazei 1 și genotiparea polimorfismelor G-909C, A-162G și C-108T	71

4.3.5. Analiza statistică	71
4.4. Rezultate	71
4.5. Discuții	77
4.6. Concluzii	81
<b>5. Studiul 3. Asocieri ale stilului de viață cu activitățile PON1</b>	<b>83</b>
5.1. Introducere	83
5.2. Ipoteza de lucru	83
5.3. Material și metodă	84
5.3.1. Participanți	84
5.3.2. Măsurătorile antropometrice și examenul clinic	84
5.3.3. Eșantioanele sangvine și serice	85
5.3.4. Variabile măsurate	85
5.3.5. Activitățile paraoxonazei	85
5.3.6. Analiza statistică	85
5.4. Rezultate	86
5.5. Discuții	89
5.6. Concluzii	91
<b>6. Concluzii generale</b>	<b>93</b>
<b>7. Originalitatea tezei</b>	<b>95</b>
<b>REFERINȚE</b>	<b>97</b>

#### **CUVINTE CHEIE:**

Paraoxonaza-1 (PON1), arilesterază, lactonază, paraoxonază, single nucleotide polymorphisms (SNPs), sindrom metabolic, obezitate abdominală, steatoză hepatică

**REFERINȚE:** 212

## **INTRODUCERE**

Sindromul metabolic a devenit una dintre cele mai frecvente maladii a zilelor noastre, a cărei prevalență este în continuă creștere. În prezent, mijloacele de prevenire și tratament sunt insuficiente. Identificarea unor factori cheie în inițierea, dezvoltarea și progresia acestui sindrom și a complicațiilor sale devine astfel o provocare a momentului.

Paraoxonaza 1 (PON1), membră a familiei paraoxonazelor, pare să aibă rol protectiv antioxidant. Concentrația enzimatică și activitatea sa pot fi modulate de factori alimentari sau ai stilului de viață, de lipoproteine, de diverse substanțe farmacologice, macromoleculă biologică dar și de mutații punctiforme la nivelul ADN-ului.

În tratamentul sindromului metabolic, unul dintre punctele esențiale ale algoritmului terapeutic, ar putea fi PON1. Utilizând particule PON1 sintetice, am putea eficientiza combaterea stresului oxidativ încă din primele etape ale apariției sale, s-ar putea realiza o prevenție precoce a patologiei ce presupune stres oxidativ, ne mai fiind obligați să rezolvăm ulterior consecințele acestuia.

Prevalența obezității abdominale este în continuă creștere. Studii recente au demonstrat că aceasta se asociază cu valori reduse ale activității HDL-PON1 datorită modificărilor în conținutul HDL, fapt care conduce la scăderea activității PON1. Toate aceste modificări pot promova progresia spre sindrom metabolic (SM).

La nivel hepatic, prima expresie a SM este reprezentată de ficatul gras non-alcoolic. Deși au fost identificate numeroase modificări la pacienți cu steatoză hepatică sau SHNA, până în prezent nu a putut fi precizat stimulul care determina progresia steatozei spre SHNA.

De asemenea, numeroase componente ale stilului de viață, obiceiuri alimentare, utilizarea substanțelor medicamentoase influențează concentrația și activitatea PON1. Datele cunoscute în acest sens nu sunt uniforme, s-au descris variații în funcție de zonele geografice studiate sau în raport cu diferite grupuri etnice. Din acest motiv este necesară o evaluare obiectivă, particularizată a acestor date la nivelul populației în care se aplică.

## **STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII**

Deși complexitatea organismelor vii în timpul evoluției a crescut enorm, din punct de vedere molecular au apărut noutăți minore. Paraoxonazele (PON) sunt probabil enzime ancestrale care, în contrast cu alte enzime mai moderne din punct de vedere evolutiv, posedă o gamă largă de specificități, iar această versatilitate catalitică a acestor enzime face posibilă realizarea unor multitudini de funcții. Duplicarea genelor și divergența lor au condus la apariția unor proteine mult mai specializate, cu o eficiență metabolică înaltă (o enzimă cu mai mulți „parteneri” sau mai multe substrate).

Cea mai mult studiată enzimă a familiei este PON1 datorită implicării ei într-o multitudine de afecțiuni care se validează ca urmare a stresului oxidativ. Paraoxonaza 1 (PON1) este una dintre cele mai importante enzime serice antioxidante care, o dată cu asocierea de lipoproteinele

cu densitate mare (HDL), este capabilă să reducă oxidarea particulelor de lipoproteine cu densitate mică (LDL) și a HDL. Deși descrisă inițial ca o hidrolază a organofosforicelor, PON1 este o arilesterază, numele său datorându-se substratului paraoxon. De asemenea, are activități enzimatiche de lactonază, peroxidază sau asemănătoare fosfolipazei A<sub>2</sub>.

Activitatea serică a PON1 prezintă mari variații interindividuale. Până în prezent au fost identificate peste 160 de polimorfisme ale PON1, unele situate în regiunea codificatoare, altele în introni sau în regiunea reglatoare a genei. Cantitatea și/sau eficiența funcțiilor PON1 pot fi determinate de mutațiile punctiforme (single nucleotide polymorphisms, SNPs) ale genei. În populația umană există o distribuție polimorfică a activității paraoxonazei plasmatiche astfel încât pot exista 3 fenotipuri diferite care să prezinte activitate paraoxonazică scăzută, intermediară sau crescută.

În ceea ce privește SNPs și asocierea lor cu sindromul metabolic (SM) sau componente ale sale, studiile efectuate până în prezent sunt fie incomplete (nu cercetează toate activitățile PON1 și/sau nu realizează o analiză a acestora în raport cu modificările genetice) sau rezultatele obținute sunt inconsecvente și/sau contradictorii.

Cinci dintre cele mai importante SNPs ale genei PON1: două de la nivelul regiunii codificatoare (L55M și Q192R) și trei de la nivelul regiunii promotor (-909G>C, -162A>G, -108C>T) au fost identificate ca cei mai importanți modulatori ai activității enzimatiche a PON1.

În studiul de față ne-am propus să apreciem potențialele avantaje genetice ale acestor SNPs și activitatea PON1 în cursul procesului oxidant al SM.

## **METODOLOGIE GENERALĂ**

Fiecare subiect inclus în studiu și-a exprimat în scris acordul de a participa la acest studiu. Toți subiecții au fost supuși unui examen clinic general, li s-au colectat date anamnestice și li s-a determinat valoarea circumferinței abdominale, a tensiunii arteriale și a indicelui de masă corporală.

**Criterii de excludere:** Au fost excluși din studiu subiecții care prezentau evidențe medicale relevante pentru afectarea hepatică (hepatite virale acute sau cronice), consum declarat de alcool >20g/zi la bărbați și >10g/zi la femei, în ultimele 6 luni, hepatite autoimune, ciroză biliară primitivă, colangită sclerozantă primitivă, deficit de alfa-1 antitripsină, hemocromatoză, porfirie, sindrom Budd-Chiari, ciroză hepatică, boli inflamatorii ca infecții, afecțiuni psihiatrice care prezintă modificări ale valorilor PON1, malignități, boli renale.

## **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**

### **Studiul 1. Polimorfismele și activitățile PON1 la pacienți cu obezitate abdominală**

**Introducere:** Obiectivul acestui studiu a fost de a evalua polimorfismele Q192R și L55M și activitățile (paraoxonază, arilesterază și lactonază) PON1 la pacienții cu obezitate abdominală.

**Material și metodă:** Am format 2 loturi de pacienți consecutivi. Primul lot a cuprins pacienți cu circumferința abdominală >94 cm la bărbați și >80 cm la femei. Al doilea lot a fost constituit din pacienți care aveau circumferința taliei <94cm la bărbați și <80cm la femei. În primul grup au fost incluși 94 de pacienți iar în al doilea grup 47 de subiecți. Cele două grupuri au fost echilibrate ca vârstă și sex. Valorile HDL-colesterol au fost catalogate ca normale <40mg/dl (1,03 mmol/L) la bărbați și <50mg/dl (1,29 mmol/L) la femei. Tuturor subiecților li s-au determinat valorile HDL-colesterol, activitățile de paraoxonază, arilesterază și lactonază ale PON1. De asemenea, s-a efectuat genotiparea pentru polimorfismele regiunii codificatoare a genei PON1 Q192R și L55M. Analiza statistică a datelor s-a realizat cu programul Medcalc versiunea 12.7.

**Rezultate:** Am determinat existența unei corelații inverse între valorile vârstei și logP-ase ( $r=-0,170$ ;  $P=0,05$ ). Nu am găsit o corelație între valorile vârstei și cele ale A-ase sau L-ase ( $r=-0,058$ ;  $P=0,5$ ; respectiv  $r=-0,045$ ;  $P=0,6$ ). Sexul pacienților nu a avut o influență semnificativă asupra P-ase, A-ase sau L-ase ( $P=0,9$ ;  $P=0,1$ ; respectiv  $P=0,2$ ). Am stabilit o corelație între valorile HDL-C și cele ale logP-ase, A-ase și L-ase ( $r=0,213$ ;  $P=0,01$ ;  $r=0,303$ ;  $P<0,001$ ; respectiv  $r=0,271$ ;  $P=0,002$ ). Pacienții cu genotipul R192R au avut valori semnificativ statistic mai mari ale logP-ase comparativ cu cei Q192Q ( $P<0,001$ ). De asemenea, heterozigoții Q192R au avut valori semnificativ statistic mai mari ale logP-ase comparativ homozigoții Q192Q ( $P<0,001$ ). Polimorfismul PON1 Q192R nu a influențat valorile A-ase și L-ase ( $P=0,7$ ; respectiv  $P=0,4$ ). Polimorfismul PON1 L55M a influențat valorile tuturor celor trei activități ale PON1. Astfel subiecții L55L au avut valori ale logP-ase mai mari decât cei L55M ( $P=0,001$ ) sau M55M ( $P<0,001$ ). Homozigoții L55L au avut cele mai mari valori ale logP-ase, L-ase. Am conceput o regresie liniară multiplă pentru a aprecia în ce măsură valorile activității P-ase sunt independent explicate de următoarele variabile: vârsta, statutul de persoană obeză, polimorfismul L55M, polimorfismul Q192R și nivelul HDL-C. Modelul ales de noi a explicat variabilitatea activității P-ase în proporție de 69,1%. Genotipul QR a avut cea mai mare influență asupra variabilității acestei activități ( $R^2 = 40,6\%$ ;  $P<0,001$ ). Vârsta și obezitatea nu au avut influență semnificativă asupra P-ase. Atunci când am aplicat corecția pentru măsurători multiple, genotipul LM nu și-a păstrat influența independentă. Am construit un model care să explice variabilitatea A-ase prin utilizarea unei regresii liniare multiple și au fost introduse în modelul final: sexul, obezitatea, polimorfismul L55M, polimorfismul Q192R, nivelul HDL-C. Modelul a explicat variabilitatea A-ase în proporție de 40,3%. Genotipul MM a avut cea mai mare influență asupra variabilității activității ( $R^2 = 11,3\%$ ;  $P<0,001$ ). Sexul nu a influențat semnificativ A-ase. Atunci când am aplicat corecția pentru măsurători multiple, genotipurile QR și RR nu și-au păstrat influența independentă. În modelul care să explice variabilitatea L-ase prin utilizarea unei regresii liniare multiple au fost introduse: obezitatea, polimorfismul L55M, polimorfismul Q192R, nivelul HDL-C. Modelul a explicat variabilitatea L-ase în proporție de 28,6%. Genotipul MM a avut cea mai mare influență asupra variabilității activității ( $R^2 = 7,4\%$ ;  $P<0,001$ ). Obezitatea nu a influențat semnificativ L-ase. Atunci când am aplicat corecția pentru măsurători multiple, genotipul QR nu și-a păstrat influența independentă.

**Concluzii:** Activitatea paraoxonazică a PON1 este redusă la subiecți cu obezitate abdominală; homozigoții R192R au cea mai mare activitate paraoxonazică; homozigoții L55L au cele mai mari valori ale tuturor celor 3 activități ale PON1. Circumferința abdominală a influențat numai variabilitatea activității arilesterazice a PON1.

## **Studiul 2. Polimorfismele regiunii reglatoare și activitățile PON1 la pacienți cu SM**

**Introducere:** Scopul studiului a fost de a investiga influența a trei polimorfisme (SNPs) (-108C>T, -162A>G și -909G>C) din regiunea promotor a genei PON1, asupra activității acestei enzime, la pacienți cu SM.

**Material și metode:** Am format 2 loturi de pacienți consecutivi, primul lot a cuprins pacienți cu sindrom metabolic iar al doilea a fost constituit din pacienți fără sindrom metabolic. Cele două loturi au fost echilibrate ca vârstă și sex. Diagnosticul de SM a fost stabilit conform criteriilor Federației Internaționale de Diabet (IDF): prezența a mai mult de 3 dintre următoarele criterii a fost catalogat ca SM: circumferința taliei >94 cm la bărbați și >80cm la femei, hipertrigliceridemie  $\geq 150\text{mg/dl}$  (1,7 mmol/L), HDL-colesterol <40mg/dl (1,03 mmol/L) la bărbați și <50mg/dl (1,29 mmol/L) la femei, HTA >130/85 mmHg sau tratament antihipertensiv, hiperglicemie a jeune >100mg/dl (5,6 mmol/L) sau tratament antidiabetic. Fiecărui pacient în parte i s-au dozat activitățile enzimaticice ale PON1, s-au determinat valorile variabilelor biologice necesare pentru definirea SM și s-a efectuat genotiparea pentru SNPs regiunii promotor a genei PON1(-108C>T, -162A>G și -909G>C). Pentru analiza statistică a datelor am utilizat softul statistic SPSS versiunea 21.

**Rezultate:** Nu s-au constatat diferențe semnificative de distribuție a polimorfismelor -108C>T, -162A>G și -909G>C, între pacienții cu SM și grupul de control ( $p=0,5$ ;  $p=0,6$ ; respectiv  $p=0,9$ ). Polimorfismele -108C>T și -909G>C au fost asociate cu activitatea paraoxonazică ( $p=0,03$ ; respectiv  $p=0,006$ ), arilesterazică ( $p<0,001$ ; respectiv  $p<0,001$ ) și lactonazică ( $p<0,001$ ; respectiv  $p<0,001$ ). Polimorfismul -162A>G nu s-a asociat cu activitatea paraoxonazică ( $p=0,3$ ) sau lactonazică ( $p=0,1$ ), dar a influențat activitatea arilesterazică ( $p=0,03$ ).

**Concluzii:** Activitățile PON1 au fost influențate de către toate cele trei SNPs, indiferent de prezența SM.

## **Studiul 3. Asocieri ale stilului de viață cu activitățile PON1**

**Introducere:** Obiectivul acestui studiu a fost de a investiga, într-o cohortă reprezentativă de subiecți cu steatoză hepatică, activitățile PON1 (arilesterazică, paraoxonazică și lactonazică) cât și posibila influență a factorilor non-genetici, pentru a identifica noi metode de abordare a acestei patologii.

**Material și metode:** Participanții incluși în studiu au fost 39 de subiecți cu steatoză hepatică. Grupul de control a constat în 60 de subiecți care nu au prezentat steatoză hepatică la evaluarea ultrasonografică. Ambele grupuri au fost echilibrate în ceea ce privește vârsta și sexul. Diagnosticul de steatoză hepatică a fost pus în urma examinării ultrasonografice. De asemenea,



fiecare participant la studiu a răspuns în scris întrebărilor unui chestionar privind stilul de viață: obiceiuri alimentare, activitatea fizică desfășurată, consum de medicamente, droguri sau tutun, dietă. Fiecărui subiect i s-a efectuat examen clinic și anamnezic și i s-au dozat activitățile enzimice ale PON1 și valorile HDL-colesterol, colesterolului total, a glicemiei, trigliceridelor (TG). Am utilizat softul statistic SPSS versiunea 21 pentru prelucrarea statistică a datelor.

**Rezultate:** Nu am constatat diferențe semnificative statistic între cele 2 loturi în ceea ce privește activitățile PON1. Activitatea A-ase s-a corelat invers cu circumferința taliei și direct cu valorile HDL și colesterolului total. Activitatea L-ase s-a corelat slab, pozitiv cu valorile HDL-C iar activitatea P-ase s-a asociat pozitiv cu valorile colesterolului total. Activitățile enzimice nu au fost influențate de sex și nu am constatat corelații între activitățile PON1 și valoare glicemiei, TG sau IMC. Am observat diferențe semnificative statistic între cele 2 loturi în ceea ce privește valorile TG, glicemiei, IMC, circumferinței abdominale, prezenței DZ, HTA sau consumului de medicamente hipolipemiante. Fumatul a avut o influență semnificativă asupra valorilor arilesterazei pe când activitatea P-ase a fost influențată de consumul de alcool.

**Concluzii:** Activitățile PON1 nu au fost diferite semnificativ statistic între cele 2 grupuri studiate. Colesterolul total s-a asociat pozitiv cu activitatea P-ase. Activitatea A-ase s-a corelat pozitiv cu HDL-C și colesterol total și negativ cu circumferința taliei. Activitatea L-ase s-a corelat cu valorile HDL-C. Fumatul și consumul de alcool au influențat activitățile PON1.

## CONCLUZII GENERALE

1. Activitatea P-ase și A-ase este redusă la pacienții cu obezitate abdominală din această regiune geografică.
2. Activitatea A-ase a fost influențată de prezența obezității abdominale.
3. Polimorfismul Q192R a influențat activitatea P-ase, iar polimorfismul L55M a influențat toate cele 3 activități ale PON1.
4. Polimorfismul -108TT a influențat activitatea P-ase, fiind determinantul major al acestei activități a PON1, la pacienți cu SM.
5. Polimorfismul -909GC a influențat toate cele 3 activități ale PON1, varianta homozigotă -909GG conferind cea mai mare protecție antioxidantă, la pacienți cu SM.
6. Polimorfismul -A162G a influențat numai activitatea A-ase a PON1, la pacienți cu SM.
7. Valori reduse ale activității P-ase a PON1 s-au asociat cu variantele genetice -108TT și -909CC, la pacienți cu SM.
8. Activitatea redusă a A-ase a fost corelată cu variantele -108TT, -909CC și -162GG, la pacienți cu SM.
9. Polimorfismele genetice T-108T și C-909C s-au asociat cu valori reduse ale activității L-ase, la pacienți cu SM.
10. Fumatul a influențat activitatea A-ase, la pacienți cu steatoză hepatică.
11. Consumul de alcool a influențat activitatea P-ase, la pacienți cu steatoză hepatică.
12. Toate activitățile PON1 s-au asociat direct cu valorile HDL, la pacienți cu SM

13. Nu am obținut diferențe semnificativ statistic între cele 2 loturi (când am comparat subiecți cu și fără steatoză hepatică) în ceea ce privește activitățile PON1.
14. Activitatea A-ase s-a corelat negativ cu circumferința taliei și direct cu valorile HDL și CT, la pacienți cu steatoză hepatică.

**”IULIU HATIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY  
CLUJ-NAPOCA**

*Thesis abstract*

**Genetic polymorphisms of antioxidant enzymes  
in metabolic syndrome**

Doctoral candidate: **Lorena Ciumarnean**

Scientific supervisor: **Prof. Dr. Andrei Cadariu Achimas**

CLUJ-NAPOCA 2014

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	17
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>2. Spectrum of antioxidant enzymes</b>	21
1.1. Modulators of oxidative stress	21
1.2. Antioxidant enzyme systems	21
<b>2. The paraoxonase gene family</b>	23
2.1. Paraoxonase 1	23
2.1.1. Structure	24
2.1.2. PON1 activities	24
2.1.3. PON1 gene polymorphisms	25
2.1.3.1. SNPs in promoter regions	26
2.1.3.2. SNPs in coding regions	26
2.2. Non-genetic factors influencing serum PON1 levels	27
2.2.1. Modulation of PON1 by exogenous compounds	27
2.2.1.1. Chemical substances from the environment	27
2.2.1.2. Medicines	27
2.2.2. Modulation of PON1 by lifestyle factors	28
2.3. Influence of age, gender and various physiological conditions on PON1 activity	29
2.4. Pathological conditions	29
2.5. PON1 status	30
<b>3. PON1 in metabolic syndrome</b>	31
3.1. Metabolic syndrome. Definition	31
3.2. PON1 polymorphisms in metabolic syndrome	31
3.2.1. Polymorphisms in the PON1 coding region in metabolic syndrome	31
3.2.2. Polymorphisms in the PON1 promoter region in metabolic syndrome	33
3.3. PON1 phenotype in metabolic syndrome	34
3.3.1. Abdominal obesity	34
3.3.2. HDL	35
3.3.3. Lipid profile	36
3.3.4. Non-alcoholic fatty liver disease	37
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Working hypothesis</b>	41
<b>2. General methodology</b>	43
2.1. Materials and methods	43
2.1.1. Anthropometry and clinical examination	43
2.1.2. Blood and serum samples	44
2.2. Biochemistry and genetic determinations	44

2.2.1. Determination of PON1 enzyme activities	44
2.2.1.1. Lactonase activity	44
2.2.1.2. Arylesterase activity	44
2.2.1.3. Paraoxonase activity	45
2.3. Determination of genetic polymorphisms of PON1	45
2.3.1. DNA extraction from blood	45
2.3.2. Genomic DNA extraction from whole blood	45
2.3.3. Determination of DNA concentration and purity	46
2.3.4. PON1 Q192R genotype	46
2.3.5. PON1 L55M genotype	48
2.3.6. PON1 C-108T genotype	50
2.3.7. PON1 A-162G genotype	51
2.3.8. PON1 G-909C genotype	53
2.3.9. Statistical analysis	54
<b>3. Study 1. PON1 polymorphisms and activities in patients with abdominal obesity</b>	<b>57</b>
3.1. Introduction	57
3.2. Working hypothesis	58
3.3. Materials and methods	58
3.3.1. Inclusion criteria	58
3.3.2. Exclusion criteria	58
3.3.3. Measured variables	59
3.3.4. Determination of PON1 enzyme activities and PON1 gene polymorphisms Q192R and L55M	59
3.3.5. Statistical analysis	59
3.4. Results	59
3.5. Discussion	65
3.6. Conclusion	67
<b>4. Study 2. Polymorphisms in the PON1 regulatory region and PON1 activities in patients with MS</b>	<b>69</b>
4.1. Introduction	69
4.2. Working hypothesis	70
4.3. Materials and methods	70
4.3.1. Inclusion criteria	70
4.3.2. Exclusion criteria	70
4.3.3. Measured variables	71
4.3.4. Determination of PON1 enzyme activities and PON1 gene polymorphisms G-909C, A-162G and C-108T	71
4.3.5. Statistical analysis	71
4.4. Results	71
4.5. Discussion	77

4.6. Conclusion	81
<b>5. Study 3. Correlation between lifestyle and PON1 activities</b>	<b>83</b>
5.1. Introduction	83
5.2. Working hypothesis	83
5.3. Materials and methods	84
5.3.1. Subjects	84
5.3.2. Anthropometry and clinical examination	84
5.3.3. Blood and serum samples	85
5.3.4. Measured variables	85
5.3.5. Paraoxonase activity	85
5.3.6. Statistical analysis	85
5.4. Results	86
5.5. Discussion	89
5.6. Conclusion	91
<b>6. General conclusion</b>	<b>93</b>
<b>7. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	<b>95</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>97</b>

**KEY WORDS:**

Paraoxonase-1 (PON1), arylesterase, lactonase, paraoxonase, single nucleotide polymorphisms (SNPs), metabolic syndrome, abdominal obesity, fatty liver disease

**REFERENCES:** 212

## **INTRODUCTION**

Metabolic syndrome has become one of the most common diseases of our time, whose prevalence is growing. Currently, the means of prevention and treatment are insufficient. Identifying key factors in the initiation, development and progression of this syndrome and its complications is one of the greatest challenges of the moment.

Paraoxonase 1 (PON1), member of the paraoxonase family, seems to have a protective antioxidant role. Serum concentrations and activity of PON1 can be modulated by dietary factors or by lifestyle, lipoproteins, various pharmacological substances, biological macromolecules and point mutations in the DNA.

PON1 could play a major role in the therapeutic algorithm for the treatment of metabolic syndrome. The use of synthetic substrates for PON1 could help fight against oxidative stress at early stages of its appearance and might achieve early prevention of pathologies involving oxidative stress, without the need for a further solution for its consequences.

The prevalence of abdominal obesity is growing. Recent studies have shown that it is associated with low HDL-PON1 activity due to changes in the content of HDL, which leads to decreased PON1 activity. All these changes may promote progression to metabolic syndrome (MS).

In the liver, the first expression of MS is the non-alcoholic fatty liver disease. Although many changes have been identified in patients with steatohepatitis or NASH, there are still no stimuli identified for the determination of the progression from steatosis to NASH.

Moreover, many lifestyle components, the diet, the use of drugs, affect PON1 concentration and activity. Literature data in this respect are not uniform, with variations depending on the geographical areas studied or in relation to different ethnic groups. Therefore, there is need for an objective and customized assessment of these data in the study population.

## **CURRENT STATE OF KNOWLEDGE**

Although the complexity of living organisms during the evolution has grown tremendously, there is some minor molecular novelty. Paraoxonases (PON) are probably ancestral enzymes which, in contrast to other enzymes more modern from a revolutionary point of view, have a wide range of specificities and the catalytic versatility of these enzymes makes it possible to achieve a multitude of functions. Gene duplication and divergence led to the emergence of much more specialized proteins, with increased metabolic efficiency (an enzyme with multiple "partners" or more substrates).

The most studied enzyme of the family is PON1 due to its involvement in a wide range of conditions validated as a result of oxidative stress. Paraoxonase 1 (PON1) is one of the most important serum antioxidant enzymes, which in combination with high-density lipoproteins (HDL) is able to reduce the oxidation of low-density lipoproteins (LDL) and HDL particles. Although originally described as an organophosphates hydrolase, PON1 is an arylesterase, its

name being due to the paraoxon substrate. It also has enzymatic activity as lactonase, peroxidase, or similar to phospholipase A2.

Serum PON1 activity shows large interindividual variations. So far, over 160 PON1 polymorphisms have been identified, some located in the coding region, others in introns or in the regulatory region of the gene. The amount and/or efficiency of PON1 functions can be determined by point mutations (single nucleotide polymorphisms, SNPs) of the gene. In the human population there is a polymorphic distribution of plasma paraoxonase activity so that there can be three different phenotypes showing low, intermediate or high paraoxonase activity.

Regarding SNPs and their association with metabolic syndrome (MS) or with its components, studies to date are either incomplete (they did not assess all PON1 activities and/or did not analyze them in relation to genetic modifications), or results obtained are inconsistent and/or contradictory.

Five of the most important SNPs in the PON1 gene, two in the coding region (L55M and Q192R) and three in the promoter region (-909G>C,-162A>G,-108C>T), were identified as the most important modulators of PON1 enzyme activity.

Our study aimed to assess the potential genetic benefits of these SNPs and PON1 activity during the oxidative stress triggered by MS.

## **General methodology**

Each subject included in the study expressed his/her written consent to participate in this study. All subjects underwent a general clinical examination, were collected case history data and the following parameters were determined: waist circumference, blood pressure and body mass index.

**Exclusion criteria.** The following were excluded from the study: subjects who had liver disease in their medical records (acute or chronic viral hepatitis), subjects with an alcohol consumption of >20g/day in men and >10g/day in women over the last six months, subjects with autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, alpha-1 antitrypsin deficiency, hemochromatosis, porphyria, Budd-Chiari syndrome, liver cirrhosis, inflammatory diseases such as infections, psychiatric disorders with changes in PON1 values, malignancies, renal diseases.

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

### **Study 1. PON1 polymorphisms and activities in patients with abdominal obesity**

**Introduction.** The objective of this study was to assess PON1 polymorphisms (Q192R and L55M) and activities (paraoxonase, arylesterase and lactonase) in patients with abdominal obesity.



**Materials and methods.** We formed two groups of consecutive patients. The first group included patients with waist circumference > 94 cm in men and > 80 cm in women. The second group included patients with waist circumference <94cm in men and <80 cm in women. The first group consisted of 94 patients and the second group of 47 subjects. The two groups were balanced in terms of age and gender. HDL-cholesterol levels were classified as normal <40 mg/dl (1.03 mmol/L) in men and <50 mg/dl (1.29 mmol/L) in women. The following parameters were determined in all subjects: HDL-cholesterol, PON1 paraoxonase, lactonase and arylesterase activity. Furthermore, genotyping was performed for PON1 gene polymorphisms in the coding region (Q192R and L55M). Statistical data analysis was performed with MedCalc software version 12.7.

**Results.** There was an inverse correlation between age and paraoxonase values ( $r = -0.170$ ,  $P = 0.05$ ). There was no correlation between age and arylesterase and lactonase values ( $r = -0.058$ ,  $P = 0.5$ , respectively  $r = -0.045$ ,  $P = 0.6$ ). Gender of patients had a significant influence on paraoxonase, arylesterase and lactonase ( $P = 0.9$ ,  $P = 0.1$ , respectively  $P = 0.2$ ). There was a correlation between HDL-C and paraoxonase, arylesterase and lactonase values ( $r = 0.213$ ,  $P = 0.01$ ;  $r = 0.303$ ,  $P < 0.001$ ; respectively  $r = 0.271$ ,  $P = 0.002$ ). Patients carrying the R192R genotype had statistically significantly higher values of paraoxonase than those carrying the Q192Q genotype ( $P < 0.001$ ). Q192R heterozygotes also had statistically significantly higher paraoxonase values than homozygous Q192Q ( $P < 0.001$ ). PON1 Q192R polymorphism did not influence arylesterase and lactonase values ( $P = 0.7$ , respectively  $P = 0.4$ ). PON1 L55M polymorphism influenced the values of all three PON1 activities. Thus, subjects carrying the L55L polymorphism had higher paraoxonase values than those carrying the L55M polymorphism ( $P = 0.001$ ) or the M55M polymorphism ( $P < 0.001$ ). L55L homozygotes had the highest paraoxonase and lactonase values. Multiple linear regression was designed in order to assess the extent to which paraoxonase activity values are independently explained by the following variables: age, obese status, L55M polymorphism, Q192R polymorphism and HDL-C levels. The model chosen in this study explained the variability in paraoxonase activity to an extent of 69.1%. QR genotype had the greatest influence on the variability of this activity ( $R^2 = 40.6\%$ ,  $P < 0.001$ ). Age and obesity had no significant influence on paraoxonase activity. When applying the correction for multiple measurements, LM genotype did not retain its independent influence. A model was designed in order to explain the variability in arylesterase activity by using multiple linear regression and the following parameters were introduced in the final model: gender, obesity, L55M polymorphism, Q192R polymorphism, HDL-C levels. The model explained the variability in arylesterase activity in a proportion of 40.3%. MM genotype had the greatest influence on the variability of the activity ( $R^2 = 11.3\%$ ,  $P < 0.001$ ). Gender did not significantly influence arylesterase activity. When applying the correction for multiple measurements, QR and RR genotypes did not retain their independent influence. The model accounting for the variability in lactonase activity by using multiple linear regression consisted of the following parameters: obesity, L55M polymorphism, Q192R polymorphism, HDL-C levels. The model explained the variability in lactonase activity in a proportion of 28.6%. MM

genotype had the greatest influence on the variability of the activity ( $R^2 = 7.4\%$ ,  $P < 0.001$ ). Obesity did not significantly influence lactonase activity. When applying the correction for multiple measurements, QR genotype did not retain its independent influence.

**Conclusion.** PON1 paraoxonase activity is reduced in subjects with abdominal obesity; R192R homozygotes have the highest paraoxonase activity; L55L homozygotes have the highest values of all three PON1 activities. Waist circumference only influenced the variability in PON1 arylesterase activity.

## **Study 2. Polymorphisms in the PON1 regulatory region and PON1 activities in patients with MS**

**Introduction.** The purpose of the study was to investigate the influence of the three polymorphisms (SNPs) (-108C>T, -162A>G and -909G>C) in the PON1 promoter region on the activity of this enzyme in patients with MS.

**Materials and methods.** We formed two groups of consecutive patients, the first group included patients with metabolic syndrome and the second included patients without metabolic syndrome. The two groups were balanced in terms of age and gender. The diagnosis of MS was established according to the criteria set by the International Diabetes Federation (IDF): the presence of more than 3 of the following criteria led to the diagnosis of MS: waist circumference > 94 cm in men and > 80 cm in women, hypertriglyceridemia  $\geq 150$  mg/dl (1.7 mmol/L), HDL-cholesterol < 40 mg/dl (1.03 mmol/L) in men and < 50 mg/dl (1.29 mmol/L) in women, high blood pressure > 130/85 mmHg or antihypertensive drug treatment, fasting hyperglycemia > 100 mg/dl (5.6 mmol/L) or antidiabetic drug treatment. Each patient was dosed PON1 enzymatic activities, determining values of biological variables needed to define MS and genotyping was performed for SNPs in PON1 gene promoter region (-108C>T, -162A>G and -909G>C). SPSS statistics software version 21 was used for statistical analysis.

**Results.** There were no significant differences in the distribution of -108C>T, -162A>G, and -909G>C polymorphisms between patients with MS and the control group ( $p = 0.5$ ,  $p = 0.6$ , respectively  $p = 0.9$ ). 108C>T and 909G>C polymorphisms were associated paraoxonase activity ( $p = 0.03$ ,  $p = 0.006$ ), arylesterase activity ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ) and lactonase activity ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). -162A>G polymorphism was not associated with paraoxonase activity ( $p = 0.3$ ) or lactonase activity ( $p = 0.1$ ), but influenced arylesterase activity ( $p = 0.03$ ).

**Conclusion.** PON1 activities were influenced by all three SNPs, regardless of the presence of MS.

## **Study 3. Correlation between lifestyle and PON1 activities**

**Introduction.** The objective of this study was to investigate PON1 activities (arylesterase, paraoxonase and lactonase) in a representative group of subjects with fatty liver disease, and to assess the possible influence of non-genetic factors in an attempt to identify new approaches to this disease.

**Materials and methods.** The study consisted of 39 subjects with fatty liver disease. The control group consisted of 60 subjects without imaging evidence of fatty liver disease. Both groups were balanced in terms of age and gender. The diagnosis of fatty liver disease was set after the ultrasound examination. Each study participant also filled in a written questionnaire on lifestyle: eating habits, physical activity, consumption of medications, drugs or tobacco, diet. Each subject underwent clinical examination and anamnesis and was dosed PON1 enzyme activities and HDL-cholesterol levels, total cholesterol, blood sugar, triglycerides (TG). SPSS statistics software version 21 was used for statistical data analysis.

**Results.** There were no statistically significant differences between the 2 groups in terms of PON1 activities. Arylesterase activity was inversely correlated with waist circumference and directly correlated with HDL and total cholesterol levels. Lactonase activity was poorly positively correlated with HDL-C levels and paraoxonase activity was positively associated with total cholesterol levels. Enzyme activities were not influenced by gender and there were no correlations between PON1 activities and blood sugar levels, TG and BMI. There were statistically significant differences between the two groups regarding TG levels, blood sugar, BMI, waist circumference, presence of diabetes mellitus, hypertension or use of lipid-lowering drugs. Smoking had a significant influence on arylesterase activity, while paraoxonase activity was influenced by alcohol consumption.

**Conclusion.** PON1 activities were not significantly different between the 2 groups studied. Total cholesterol was positively correlated with paraoxonase activity. Arylesterase activity was positively correlated with HDL-C and total cholesterol and negatively correlated with waist circumference. Lactonase activity was correlated with HDL-C levels. Smoking and alcohol consumption influenced PON1 activities.

## GENERAL CONCLUSION

15. PON1 paraoxonase activity and lactonase activity is reduced in patients with abdominal obesity in this geographical region.
16. PON1 arylesterase activity was influenced by the presence of abdominal obesity.
17. Q192R polymorphism influenced paraoxonase activity, and L55M polymorphisms influenced all three PON1 activities.
18. -108TT polymorphism influenced paraoxonase activity, being the major determinant of this kind of PON1 activity in patients with MS.
19. -909GC polymorphism influenced all three PON1 activities, the homozygous-909GG variant giving the highest antioxidant protection in patients with MS.
20. -A162G polymorphism only influenced arylesterase activity in patients with MS.
21. Reduced values of paraoxonase activity were correlated with -108TT and -909CC genetic variants in patients with MS.
22. Reduced values of arylesterase activity were correlated with -108TT, -909CC and -162GG genetic variations in patients with MS.

23. T-909C and C-108T gene polymorphisms were correlated with low lactonase activity in patients with MS.
24. Smoking influenced arylesterase activity in patients with fatty liver disease.
25. Consumption of alcohol influenced paraoxonase activity in patients with fatty liver disease.
26. All PON1 activities were directly correlated with HDL levels in patients with MS.
27. There were no statistically significant differences between the 2 groups (when comparing subjects with and without fatty liver disease) in terms of PON1 activities.
28. PON1 arylesterase activity was negatively correlated with waist circumference and directly correlated with HDL and CT levels in patients with fatty liver disease.