

## искуства и новини од светот

**ВОСПОСТАВУВАЊЕ НА  
ПАРАОКСОНАЗНАТА И  
АРИЛЕСТЕРАЗНАТА АКТИВНОСТ  
НА ПАРАОКСОНАЗА 1 (ПОН1) ВО  
ЗАВИСНОСТ ОД 55 (L/M) И 192 (Q/R) ДНК  
ПОЛИМОРФИЗАМ КАЈ ВОЗРАСНИТЕ  
ЛИЦА СО ДАУНОВ СИНДРОМ**

Павел СИКОРА<sup>1</sup>,  
Ванда РЕПИСКА<sup>1</sup>,  
Мариа ШУСТРОВА<sup>2</sup>,  
Лукач ХАЛЧАК<sup>3</sup>

Институт за медицинска биологија, генетика  
и клиничка генетика, Медицински факултет  
Коменски универзитет,  
Братислава, Република Словачка<sup>1</sup>,  
Клиничка имунологија и алергологија,  
Програма за Даунов синдром; Словачки  
медицински универзитет,  
Братислава, Република Словачка<sup>2</sup>,  
Институт за медицинска биологија,  
биохемија и клиничка биохемија,  
Медицински факултет  
Коменски универзитет,  
Братислава, Република Словачка<sup>3</sup>

Примено: 12. 10. 2009

Прифатено: 30. 12. 2009

UDK: 616-056.7:575.224.232.3

**Резиме**

Хуманиот серум параоксоназа 1 е калциум зависна естераза кој припаѓа во липопротеини со висока густина (HDL). Тој ја инхибира ЛДЛ пероксидација и хидролизата на оксидативните форми од фосфатолипиди и затоа значително влијае на развојот на атеросклерозата. Целта на студијата беше да се истражи параоксидазната и арилестеразната активност на ПОН 1 кај возрасните лица со

Адреса за кореспонденција:

Павел СИКОРА

Институт за медицинска биологија,  
генетика и клиничка генетика,  
Медицински факултет, Коменски универзитет,  
Сасинкова 4, 811 08 Братислава, Република Словачка  
email: pali.sykora@gmail.com

## world experience and current events

**ESTABLISHMENT OF PARAOXONASE  
AND ARYLESTERASE ACTIVITY  
OF PARAOXONASE 1 (PON1) IN  
DEPENDENCE ON 55(L/M) AND  
192(Q/R) DNA POLYMORPHISM  
IN ADULT PEOPLE  
WITH DOWN SYNDROME**

Pavel SÝKORA<sup>1</sup>,  
Vanda REPISKÁ<sup>1</sup>,  
Mária SHUSTROVÁ<sup>2</sup>,  
Lukáč HALCHÁK<sup>3</sup>

Institute of medical biology, genetic and  
clinical genetics, Faculty of Medicine  
Comenius University,  
Bratislava, Slovak Republic<sup>1</sup>,  
Clinical immunology and allergology,  
Down syndrome program;  
Slovak Medical University,  
Bratislava, Slovak Republic<sup>2</sup>,  
Institute of medical chemistry, biochemistry  
and clinical biochemistry,  
Faculty of Medicine  
Comenius University,  
Bratislava, Slovak Republic<sup>3</sup>

Received: 12. 10. 2009

Accepted: 30. 12. 2009

Original article

**Abstract**

Human serum paraoxonase 1 is a calcium-dependent esterase located on high density lipoproteins (HDL). It inhibits LDL peroxidation and hydrolysis of oxide forms of phospholipides and therefore significantly affects the development of atherosclerosis. The aim of this study was to establish the paraoxonase and arylesterase activity of PON1 in adult people with Down syndrome (DS).

Corresponding Address:

Pavel SÝKORA

Institute of medical biology,  
genetic and clinical genetics,  
Faculty of Medicine, Comenius University,  
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovak Republic.  
e-mail: pali.sykora@gmail.com

Даунов синдром (ДС). Возрасните лица со ДС (10 мажи и 10 жени, на возраст од 16 до 37 години) учествуваа во истражувањето и беа споредени со контролна група (10 мажи и 10 жени на возраст од 17 до 45 години). Беше истражуван 55 (L/M) и 192 (Q/R) ДНК полиморфизам (со метод PCR-RFLP) и параоксоназната и арилестеразната активност кај секој пациент. Резултатите покажаа редукција на ПОН1 активноста кај лицата со ДС што е спротивно од развојот на атеросклерозата кај ДС. Затоа може да се заклучи дека ПОН1 нема директно влијание на намалување на преваленцијата на атеросклерозата кај лицата со ДС.

### Вовед

Хуманиот серум параоксоназа 1 (ПОН1; ЕЦ 3.1.8.1) е калциум зависна естераза кој припаѓа на липопротеини со висока густина (HDL) (1). Таа хидролизира и инактивира многу органофосфати (ОФ) како што се параоксон, инсектицидите паратион и хлорпирифос, и нервните гасови самон и сарин. Лактоназата може да ги хидролизира дихидрокумаринот, хомоцистеинлактат и други лактати. Важен ефект на ПОН1 е инхибицијата на ЛДЛ пероксидацијата и хидролизата на оксидативните форми на фосфолипидите. Затоа, ПОН1 значително влијае врз развојот на атеросклерозата (2). Антиатерогенетскиот ефект беше потврден од страна на многу епигенетски, генетски и биохемиски студии, кои врз основа на експерименти со глувци забележале дека нема присуство на ПОН1 генот, дека гореспоменатите заштитни влијанија се состојат од можноста на ПОН1 да ја намали оксидативната модификација на липопротеинските честички (1-3). ПОН1 генот лоциран на 7q21.3 (29 370 bp), има доминантна експресија во клетките на црниот дроб. Две општи СНП полиморфизми во кодоните на 55-Leu/Met (L/M) и 192-Qln/Arg (Q/R) биле детектирани во кодирачкиот регион на ПОН1 генот (3). Аминокиселинската супституција на позиција 192 резултира со појава на две изоформи, Q и R, кои се разликуваат во нивните хидролитички активности кон ОП оксони, *In vitro*, R изоформата ги хидролизира параоксоните

Adults with DS (10 men and 10 women ages 16 to 37 years) participated and were compared to a control group (10 men and 10 women age ranging from 17 to 45 years). The 55(L/M) and 192(Q/R) DNA polymorphism (PCR-RFLP method) and paraoxonase and arylesterase activity was investigated in every patient. The results showed the reduction of PON1 activity in people with DS, in contrast to the decreased development of atherosclerosis in DS. Therefore it can be concluded, that PON1 does not have a direct effect on the lower prevalence of atherosclerosis in people with DS.

### Introduction

Human serum paraoxonase 1 (PON1; EC 3.1.8.1) is a calcium-dependent esterase located on high density lipoproteins (HDL) (1). It hydrolyses and inactivates many organophosphates (OP) such as paraoxon, the insecticides parathion and chlorpyrifos, and the nerve gases soman and sarin. It acts as a lactonase, being able to hydrolyse dihydrocumarin, homocysteinthiolactone and other lactones. An important effect of PON1 is the inhibition of LDL peroxidation and hydrolysis of oxide forms of phospholipides. Therefore, PON1 significantly affects the development of atherosclerosis (2). Its antiatherogenic effect was confirmed by many epigenetic, genetic and biochemic studies based on experiments with knockout mice lacking PON1 which supposed that the protective influence mentioned above consists of PON1 ability to decrease oxidative modification of lipoprotein particles (1-3). PON1 gene, located on 7q21.3 (29 370 bp), is predominantly expressed in hepatic cells. Two common SNP polymorphisms in codons 55-Leu/Met (L/M) and 192-Qln/Arg (Q/R) have been detected in the coding region of the PON1 gene (3). Amino acid substitution at position 192 results in two isoforms, Q and R, which differ in their hydrolytic activity toward OP oxons. *In vitro*, the R isoform hydrolyses paraoxon (paraoxonase activity) more rapidly than the Q isoform. The R and Q isoforms hydrolyse phenylacetate (a „nonpolymorphic“ substrate) at about the same rate (4). PON1

(параоксоназната активност) се одвива многу побрзо за разлика од Q изоформата. R и Q изоформите го хидролизираат фенилацетатот („неполиморфен“) со иста фреквенција (4). PON1 активноста значително е засегната од индивидуалниот генотип за споменатиот кодирачки регион на полиморфизми со активна депресија со следниот редослед RR>QR>QQ на позиција 192 и LL>LM>MM на позиција 55 на полипептидниот синџир (5).

Лицата со Даунов синдром (ДС) се чини дека се „заштитени“ од развивање на атеросклероза. И покрај зголемувањето на оксидативниот стрес, не биле пронајдени разлики во параметрите на ЛДЛ оксидацијата помеѓу субјектите со ДС и контролната група (6). Интересно е дека, причините за смрт и патолошките истражувања кај ДС не покажуваат зголемена фреквенција на кардиоваскуларни заболувања (7). Во спротивно, имаме мален број на коронарно артериски заболувања кај возрасните лица со ДС, и ретко овие пациенти умираат од атеросклерозни компликации. Настанатите промени беа полесни во однос на контролната група на иста возраст (9).

Целта на оваа студија беше да се одреди параоксоназната и арилестеразната активност на PON1 во зависност од 55(L/M) и 192 (Q/R) ДНК полиморфизмот кај возрасните лица со ДС, и нивна споредба со контролната група изедначена по возраст и со тоа да укаже на различни мислења за експресијата на PON1 генот и намаленото ширење на коронарна болест кај субјектите со ДС. Втората цел е да се потврди *in vitro* влијанието на ДНК полиморфизмот врз активноста на PON1.

### **Материјали и методи**

Примероците на вкупната количина на крв (2,5 ml) и на серумот (1 ml) беа добиени од пациентите со Даунов синдром од клиничката канцеларија на СЗУ во Братислава. Групата на лица со ДС се состоеше од мажи (n=10) и жени (n=10) на возраст од 16 до 37 годишна возраст. Контролната група (10 мажи и 10 жени) главно се состоеше од нивните браќа и сестри кои беа приближно на иста

activity is therefore significantly affected by individual genotype for mentioned coding region polymorphisms with activity depression in order RR>QR>QQ at position 192 and LL>LM>MM at position 55 of the polypeptide chain (5).

People with Down syndrome (DS) appear to be „protected“ from the development of atherosclerosis. Despite the proven increase of oxidative stress, no differences were found in parameters of LDL oxidation between subjects with DS and control individuals (6). Interestingly, mortality causes and pathological findings in DS show no increased frequency of cardiovascular diseases (7). In contrast, a low prevalence of coronary artery disease is usually observed in adult subjects with DS, and these patients rarely die due to atherosclerotic complications (8). Even though the coronary arteries are not completely free of atherosclerosis, the alterations were milder than in control subjects of the same age (9).

The aim of this study was to determine the paraoxonase and arylesterase PON1 activity in dependance on 55(L/M) and 192 (Q/R) DNA polymorphism in adult subjects with DS, compared with a control group of the same age, and thereby contribute to the elucidation of different opinions on PON1 gene expression and the decreased prevalence of coronary disease in DS subjects. The second goal was to confirm *in vitro* the influence of DNA polymorphism on PON1 activity.

### **Materials and methods**

All (whole) blood (2.5 ml) and serum (1 ml) samples were obtained from patients from Down syndrome program clinical office SZU, Bratislava. The group with DS consisted of men (n=10) and women (n=10) aged 16 to 37. The control group (10 men and 10 women) primarily consisted of their siblings of approximately the same age. Acquired samples were stored in optimal conditions until next

возраст. Примените примероци беа складирани во оптимални услови се до нивната следна примена (2,5мл EDTA крв на  $-25^{\circ}\text{C}$  и крвниот серум на  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

ДНК беше изолирана од сите примероци на крв со помош на Qiagen ДНК mini kit. ПОН1 полиморфизмот беше детерминиран со полимеразна верижна реакција и анализа на должински полиморфизам на рестрикциски фрагменти (PCR-RFLP). PCR условите беа 2,5  $\mu\text{l}$  единици ДНК, 0,5  $\mu\text{M}$  од секој донор (BioTez Berlin-Buch GmbH) (3, 11) и 12,5  $\mu\text{l}$  GoTaq Green Master Mix (Promega) содржи 2x Green GoTaq реакциски пуфер (pH 8,5), 400  $\mu\text{M}$  од секоја dNTP и 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , со вкупен реактивен волумен од 25  $\mu\text{l}$ . PCR продуктите беа дигестирани со AlwI (192Q/R) и NlaIII (55L/M) рестрикциски ендонуклеази (New England Biolabs). Ограничувањето на фрагменти биле разделени со електрофореза со агарозен гел. Начин и определување на фрагментните ограничувања на должината беше спроведена со УВ трансилуминација и ДНК скала (таб.1).

NaCl – стимулација и основните (не стимулирани) параоксоназни активности беа одредувани со помош на спектрометрија. Концентрацијата на параоксон (O,O-diethyl O-(4-nitrophenyl) phosphate) производи на хидролиза, диетилфосфат и p-нитрофенол, беа мерени со спектрометрија на 412 nm (10). Стимулираните и нестимулираните параоксоназни активности на ПОН1 беа одредувани преку користење на 1,0 mM раствор на параоксон (сигма). Во реакција смесата содржи раствор од 50 mM Tris. (pH 8,0; содржи 1,0 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  раствор за не-стимулираните активности и 1,0 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  раствор со 1,0 M NaCl раствор за да стимулираат активност) и 40x разреден крвен серум.

Арилестеразната активност беше одредена преку спектрометриски мерења на хидролиза на производи на фенилацетатите ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$ ), оцетна киселина и концентрација на фенол од кои е можно спектрометриски да се измери на 270 nm (11). ПОН1 арилестеразната активност беше заснована врз употреба на 5 mM раствор на фенилацетат (Сигма), во истата реакциона смеса како и кај нестимулираните параоксоназни активности, само разликата е во тоа што конечното разредување на крвниот серум беше 800x.

utilization (2.5 ml EDTA blood at  $-25^{\circ}\text{C}$  and blood serum at  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

DNA was extracted from all the (whole) blood using Qiagen DNA mini kit. PON1 polymorphisms were determined by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. PCR conditions were 2.5  $\mu\text{l}$  template DNA, 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer (BioTez Berlin-Buch GmbH) (3, 11) and 12.5  $\mu\text{l}$  GoTaq Green Master Mix (Promega) containing 2x Green GoTaq Reaction Buffer (pH 8.5), 400  $\mu\text{M}$  of each dNTP and 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , in a reaction total volume 25  $\mu\text{l}$ . The PCR product was digested with AlwI (192Q/R) and NlaIII (55(L/M) restriction endonucleases (New England Biolabs). Restriction fragments were separated by agarose gel electrophoresis. Visualisation and determination of restriction fragments's length was carried out using UV transillumination and DNA ladder (tab. 1).

The NaCl-stimulated and basal (non-stimulated) paraoxonase activities were determined by spectrophotometry. Concentration of paraoxon (O,O-diethyl O-(4-nitrophenyl) phosphate) hydrolysis products, diethylphosphate and p-nitrophenol, was measured spectrophotometrically at 412 nm (10). Stimulated and non-stimulated paraoxonase PON1 activities were determined using 1.0 mM paraoxon solution (Sigma), in a reaction mixture containing 50 mM Tris solution (pH 8.0; containing 1.0 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  solution for non-stimulated activity and 1.0 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  solution with 1.0 M NaCl solution for stimulated activity) and 40x diluted blood serum.

The arylesterase activity was determined by spectrophotometric measurement of hydrolysis products of phenylacetate ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$ ), acetic acid and phenol the concentration of which is possible to measure spectrophotometrically at 270 nm (11). PON1 arylesterase activity was established using 5 mM phenylacetate solution (Sigma), in the same reaction mixture such as non-stimulated paraoxonase activity, the only difference being that the final dilution of blood serum was 800x.

Табела 1. ДНК протокол за анализа

Table 1. DNA analysis protocol

Полиморфизам/ Polymorphism	Прајмери/Primers		ПЦР продукт/ PCR product/
55 (L/M)	5'-CCTGCAATAATATGAAACAACCTG-3'		138 bp
	5'-CTAGAACACAGAAAAGTGAAAGAAAAC-3'		
192 (Q/R)	5'-TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3'		99 bp
	5'-CACGCTAAACCCAAATACATCTC-3'		
ПЦР реакција/ PCR reaction/	Биометриски УНО II Термациклер/ Biometra UNOII Thermalcycler		Време/Time
Почетна денатурација/ Initial denaturation	96 °C		120 s
Денатурација/Denaturation	94 °C		60 s
Анеалирање+елонгација/ Annealing + elongation	58 °C <b>30 cycles</b>		6 min.
Финална елонгација/ Final elongation	72 °C		10 min.
Полиморфизам/ Polymorphism	Рестрикциона анализа/Restriction analysis		Ензим/Enzyme
	PCR product/ПЦР продукт	12,5 µl	
	буфер на ензим/ enzyme buffer	1,2 µl	
55 (L/M)	рестриktivна ендонуклеаза/ restriction endonuclease	0,4 µl	<b>Nla III</b>
192 (Q/R)	рестриktivна ендонуклеаза/ restriction endonuclease	0,25 µl	<b>Alw I</b>
	Температура/Temperature	37 °C	
	време/Time	3 h.	
Рестриktivни фрагменти/ Restriction fragments	Nla III	Фенотип/ Phenotype	Тип/Type
55 (L/M)	138 bp	LL	Хомозигот/ Homozygote
	69 + 69 bp	MM	Хомозигот/ Homozygote
	138 bp, 69 + 69 bp	LM	Хетерозигот/ Heterozygote
Рестриktivни фрагменти/ Restriction fragments	Alw I	Фенотип/ Phenotype	Тип/Type
192 (Q/R)	99 bp	QQ	Хомозигот/ Homozygote
	63 + 36 bp	RR	Хомозигот/ Homozygote
	99 bp, 63 + 36 bp	QR	Хетерозигот/ Heterozygote

Вредностите за апсорпција беа забележани за 3 минути. Тоа беше во времетраење од додавањето на супстратот до појавата на реакцијата.

The absorbance values were recorded within 3 minutes from the addition of the substrate to the reaction blend.

Врз база на добиените вредности и кривата на калибрацијата за стандардниот п-нитро-фенол и фенолните раствори, ја пресметавме активноста на параоксоназата и арилестеразата ПОН1 [ $\mu\text{mol/s/l}$ ]. Независно од споменатите активности параметрите на липидниот профил (TCH, TAG, HDL, LDL and VLDL) беа определени во рамките на соработката со одделот за Клиничка биохемија СЗУ.

Согласно ДНК анализите и резултатите од другите студии (4, 5), ги поделивме учесниците на оваа студија во 3 групи: 1. „силен генотип“ (полиморфизми за висока ПОН1 активност – RR/LL, QR/LL), 2. „среден генотип“ (полиморфизми за средна ПОН активност – QR/LM, QR/MM, QQ/LL, QQ/LM) и 3. „слаб генотип“ (полиморфизми за слаба ПОН активност – QQ/MM) (таб.2).

Потоа ги споредивме вредностите за параоксоназната и арилестеразната активност од лицата со ДС, со контролната група во рамките на индивидуалните групи (субјекти со „истиот генотип“). Резултатите ги евалуиравме статистички со употреба на двонасочен Ф-тест и двонасочен Студентов т-тест (MS Excel 2007).

## Резултати

Забележавме значително намалување на стимулираната параоксоназна активност ( $p=0,019$ ; сл.1) кај субјектите со ДС ( $n=6$ ) во споредба со контролната група ( $n=11$ ) во првата група (RR/LL или QR/LL). Вредностите на нестимулираните параоксоназни и арилестеразни активности, исто така беа пониски за лицата со ДС, меѓутоа намалувањето не беше значително ( $p>0,05$ ).

Во втората (со среден генотип) група, не воочивме значително намалување на активностите на параоксоназата и арилестеразата (субјекти со ДС,  $n=12$ ) во споредба со контролната група ( $n=7$ ) ( $p>0,05$ ; фиг.2). Овие откритија може да бидат поврзани со многу мал број на субјекти во оваа група.

Го воочивме QQ/MM полиморфизмот („слабиот генотип“) само кај еден од субјектите со ДС и во еден од контролните субјекти и токму поради тоа, најденото намалување на активноста на параоксоназата и арилестеразата не може да биде статистички анализирана (таб.2).

On the basis of the obtained values and calibration curve for standard p-nitrophenol and phenol solutions, we calculated the paraoxonase and arylesterase PON1 activity [ $\mu\text{mol/s/l}$ ]. Apart from mentioned activities, the parameters of lipid profile (TCH, TAG, HDL, LDL and VLDL) were determined within the cooperation with Department of Clinical Biochemistry SZU. According to DNA analysis and results of others studies (4, 5), we divided the participants of this study into 3 groups: 1. „strong genotype“ (polymorphisms for high PON1 activity – RR/LL, QR/LL), 2. „middle genotype“ (polymorphisms for middle PON1 activity – QR/LM, QR/MM, QQ/LL, QQ/LM) and 3. „weak genotype“ (polymorphisms for weak PON1 activity – QQ/MM) (tab.2).

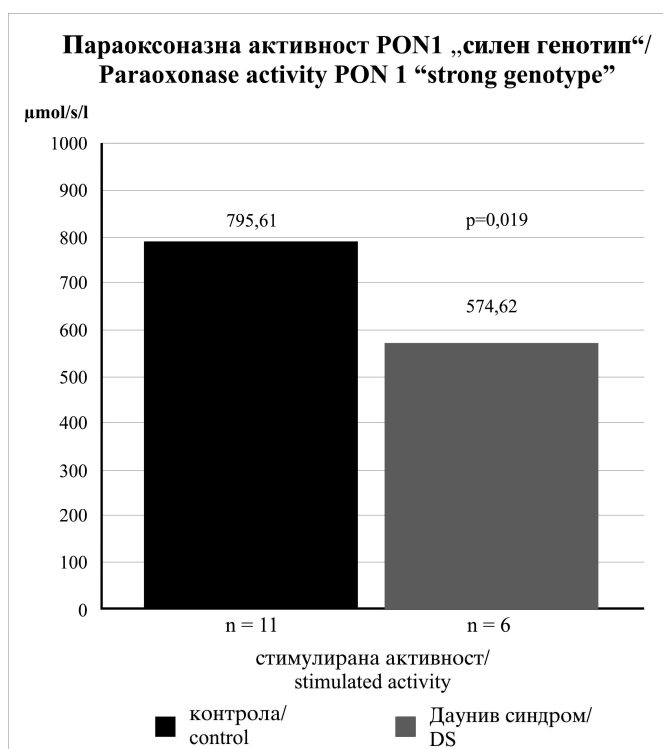
Afterward, we compared the values of paraoxonase and arylesterase activity from people with DS to the control group within individual groups (subjects with the „same“ genotype). We evaluated the results statistically using two-tailed F-test and two-tailed Student's T-test (MS Excel 2007).

## Results

We have observed a significant decrease of stimulated paraoxonase activity ( $p=0.019$ ; fig.1) in subjects with DS ( $n=6$ ) in comparison to the control group ( $n=11$ ) in the first group (RR/LL or QR/LL). The values of non-stimulated paraoxonase and arylesterase activities were lower for subjects with DS as well, but the decrease was not of any significance ( $p>0.05$ ).

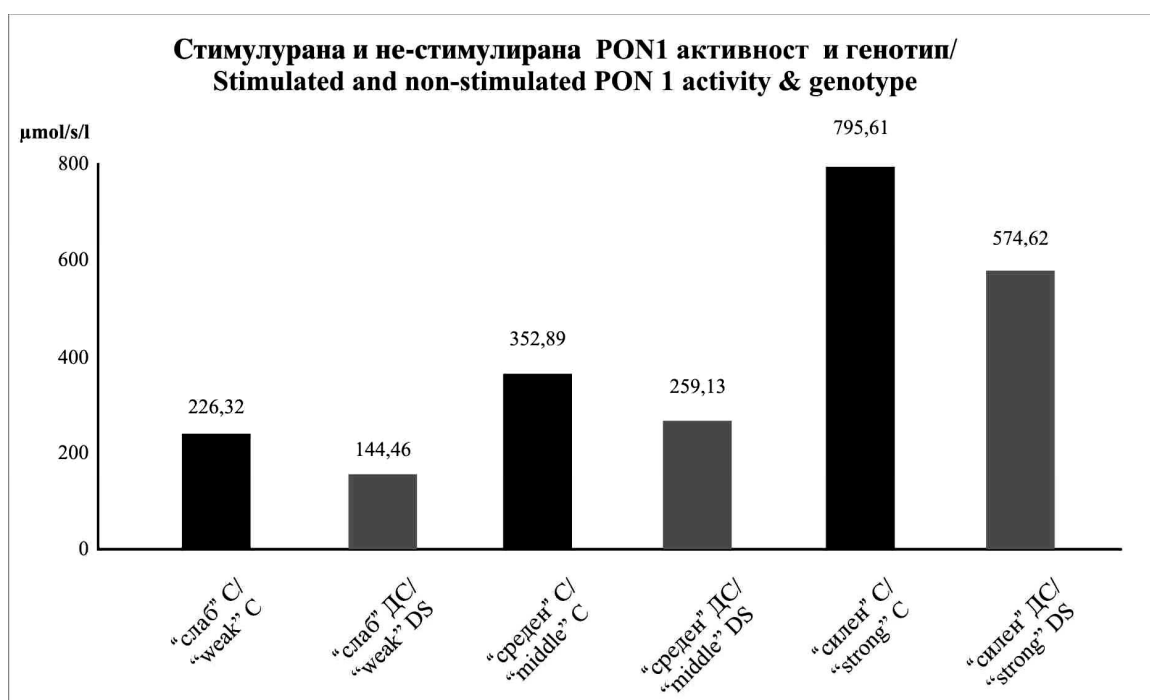
In the second (middle genotype) group („middle genotype“), no significant decrease in paraoxonase and arylesterase activities has been observed (subjects with DS,  $n=12$ ) in comparison to the control group ( $n=7$ ) ( $p>0.05$ ; fig.2). This finding may be related to a very small number of subjects in this group.

We have detected the QQ/MM polymorphism („weak genotype“) only in one of the subjects with DS and in one control subject, and therefore the found decrease of paraoxonase and arylesterase activity could not be statistically analysed (tab.2).



**Слика 1.** Значително намалување на стимулираната параоксоназна активност кај субјекти со ДС

**Figure 1.** Significantly decreased stimulated paraoxonase activity in subjects with DS

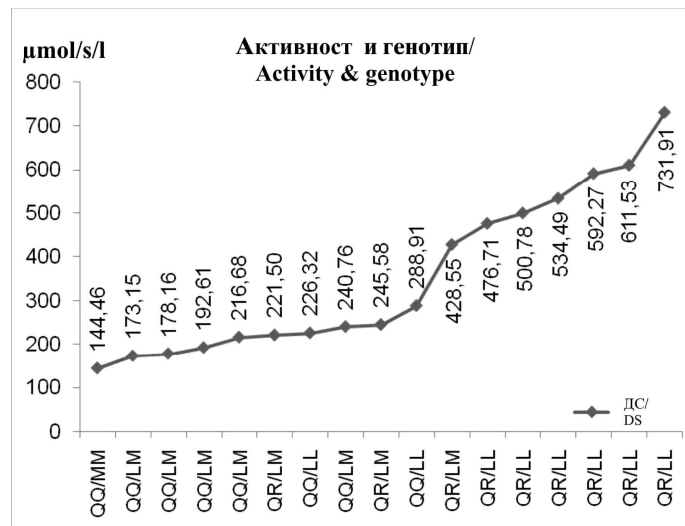


**Слика 2.** Споредба на стимулираната и нестимулираната параоксоназна активност во сите групи на генотипи

**Figure 2.** Comparison of stimulated and non-stimulated paraoxonase activity in all genotype groups

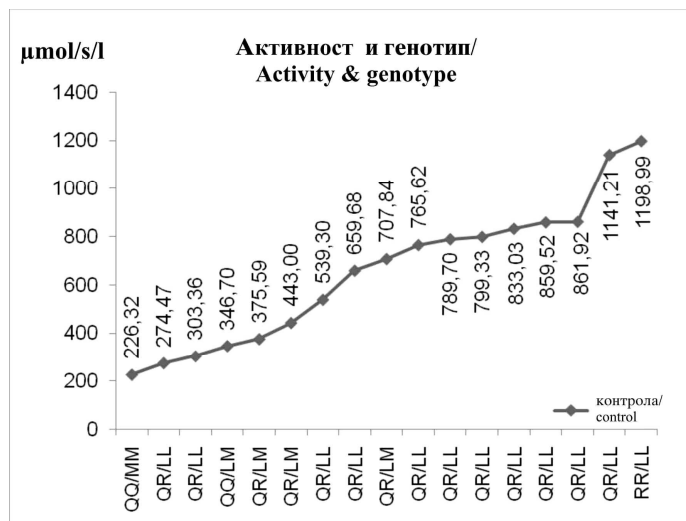
Го воочивме влијанието на 55(L/M) и 192(Q/R) ПОН1 полиморфизмот врз активноста на ПОН1. Забележавме прогресивна тенденција на активноста на параоксоназата која кореспондира со овој распоред на ПОН1 полиморфизмот QQ/MM < QQ/LM < QR/LM < QR/LL < RR/LL (сл. 3 и 4). Влијанието на активноста на арилестеразата не може да биде јасно демонстрирана.

We found the influence of 55(L/M) and 192(Q/R) PON1 polymorphism on PON1 activity. We noticed a progressive tendency of paraoxonase activity corresponding to this PON1's polymorphism order QQ/MM < QQ/LM < QR/LM < QR/LL < RR/LL (fig. 3 and 4). The influence on arylesterase activity could not be clearly demonstrated.



Слика 3. Прогресивен тренд на стимулирана параоксоназна активност соодветно на генотипот (ПОН1 полиморфизам) кај субјекти со ДС

Figure 3. Progressive trend of stimulated paraoxonase activity with regard to genotype (PON1 polymorphism) in subjects with DS



Слика 4. Прогресивен тренд на стимулирана активност на параоксоназата соодветно на генотипот (ПОН1 полиморфизам) во контролната група

Figure 4. Progressive trend of stimulated paraoxonase activity with regard to genotype (PON1 polymorphism) in control group



Табела 2. Резултати и карактеристики на генотипните групи

Table 2. Results and genotype groups's characteristic

Параметри/ Parameters	„силен генотип“/ "strong" genotype		„среден генотип“/ "middle" genotype		„слаб генотип“/ "weak" genotype	
	C	DS	C	DS	C	DS
<b>n</b>	12	6	7	13	1	1
<b>возраст - просек (години)/ age - average (years)</b>	29,42	25	29	22	31	30
<b>sex (M/F)</b>	6/6	2/4	4/3	7/6	1/0	1/0
<b>TCH [mmol/l]</b>	4,48 ± 0,53	4,65 ± 1,01	3,98 ± 0,88	4,52 ± 1,02	5,13	4,40
<b>TAG [mmol/l]</b>	1,11 ± 0,83	1,11 ± 0,46	1,34 ± 1,27	1,57 ± 0,99	1,61	1,17
<b>HDL [mmol/l]</b>	1,43 ± 0,39	1,10 ± 0,23	1,27 ± 0,44	1,10 ± 0,28	0,90	1,00
<b>LDL [mmol/l]</b>	2,55 ± 0,50	3,05 ± 1,02	2,10 ± 0,54	2,71 ± 0,86	3,50	2,87
<b>VLDL [mmol/l]</b>	0,51 ± 0,38	0,50 ± 0,21	0,61 ± 0,58	0,71 ± 0,45	0,73	0,53
<b>Фреквенција на полморфизми/ Frequency of polymorphisms</b>						
<b>LL/RR [%]</b>	8,33	-	-	-	-	-
<b>LL/QR [%]</b>	91,67	100	-	-	-	-
<b>LL/QQ [%]</b>	-	-	28,57	15,38	-	-
<b>LM/QR [%]</b>	-	-	57,14	30,77	-	-
<b>LM/QQ [%]</b>	-	-	14,29	38,46	-	-
<b>MM/QR [%]</b>	-	-	-	15,38	-	-
<b>MM/QQ [%]</b>	-	-	-	-	100	100
<b>ПОН активност/ PON1 activity [µmol/s/l]</b>						
<b>активност на арилестераза/ arylesterase activity</b>	2976,88	2769,55	2970,02	3046,02	2370,37	4320,99
<b>СД/SD</b>	± 832,16	± 674,61	1123,75	± 638,27	-	-
<b>активност на параоксаназата- нестимулирана/ paraoxonase activity-nonstimul./</b>	386,22	332,25	189,52	134,83	72,23	130,01
<b>СД/SD</b>	± 148,22	± 52,31	± 98,27	± 76,36	-	-
<b>активност на параоксаназата- стимулирана/ paraoxonase activity-stimulated</b>	795,61	574,62	352,89	259,13	144,46	226,32
<b>СД/SD</b>	± 237,31	± 84,72	± 171,73	± 130,50	-	-

Заклучокот од претходно изнесените податоци, е дека ДНК анализите и резултатите од спектрометријата индицираат поврзаност меѓу активноста на ПОН1 и параметрите за липидниот профил. Не забележавме поврзаност меѓу активноста на ПОН1 и параметрите како тотален холестерол, TAG, HDL, LDL и VLDL.

To conclude, the DNA analysis and spectrophotometry results indicate an association between PON1 activity and lipid profile's parameters. We did not observe any connection between PON1 activity and parameters such as total cholesterol, TAG, HDL, LDL and VLDL.

## Дискусија

Постојат различни мислења за регулацијата на експресијата на ПОН1 генот кај пациентите со ДС. Јанел и сор. укажуваат на зголемена експресија на ПОН1 генот во црнодробните клетки на фетусите со ДС. Дополнително, тие нашле редуцирана експресија на генот ПОН1 во црниот дроб на глувци со дефицит на цистатионин-бета синтетазата (ЦБС), модел на хиперхомоцистеинија, чија клиничка слика е асоцирана со зголемен ризик од атеросклероза (13). Откако ЦБС генот е лоциран на хромозомот 21, тие предлагаат дека зголемената „генетска доза“ на ЦБС може да иницира горна регулирана експресија на ПОН1 генот кај субјекти со ДС. Од друга страна, некои студии потврдуваат дека регулацијата на експресијата на ПОН1 генот е долно регулирана од оксидативен стрес (2, 14).

Бидејќи не постои ниту една студија која се занимава со мерењето на активноста на ПОН1 кај лица со ДС, целта на нашата студија беше да се евалуира партиципацијата на овој антиоксидантен ензим врз намалената преваленција на атеросклероза кај лица со ДС. Базирано врз резултатите на студија која ја истражува експресијата на ПОН1 генот кај фетуси со ДС (зголемена горна регулација на експресијата на ПОН1 генот), претпоставивме дека постои зголемена ПОН1 активност и кај лица со ДС. Ова откритие може да го објасни нормалното ниво на oxLDL кај лица со ДС, во споредба со контролната група, покрај зголемениот оксидативен стрес кај овие субјекти. Но и покрај тоа, нашите резултати покажаа редуција на активноста на ПОН1 кај лица со ДС. Иако намалувањето на вредностите во „средниот“ и „слабиот“ генотип не беше значително (кое можеби се должи на мал број на субјекти во овие групи), просечните вредности беа пониски кај лицата со ДС, што е спротивно со намалениот развој на атеросклерозата кај ДС. Исто така може да се заклучи дека ПОН1 нема директен ефект врз пониската преваленција на атеросклерозата кај лицата со ДС.

Сè уште треба да се одговори дали намалувањето на активноста на ПОН1 кај возрасни лица со ДС е директна последица на намале-

## Discussion

There are different opinions on the regulation of PON1 gene expression in patients with DS. Janel et al. reports increased PON1 gene expression in hepatic cells of fetuses with DS. In addition, they found reduced gene expression of PON1 in liver of cystathionine-beta synthetase (CBS) deficient mice, a murine model of hyperhomocysteinemia, clinical picture of which is associated with an increased risk of atherosclerosis (13). Since the CBS gene is located on chromosome 21, they propose that increased „genetic dose“ of CBS can initiate up-regulated PON1 gene expression in subjects with DS. On the other hand, some studies affirm that the regulation of PON1 gene expression is down-regulated by oxidative stress (2, 14).

Since there is no study dealing with the measurement of activity of PON1 in people with DS, the aim of our study was to evaluate the participation of this antioxidant enzyme on decreased prevalence of atherosclerosis in people with DS. Based on results of the study dealing with PON1 gene expression in fetuses with DS (increased up-regulation PON1 gene expression), we assumed increased PON1 activity also in people with DS. This finding might explain the normal level of oxLDL in people with DS compared to the control group, despite increased oxidative stress in these subjects. Nevertheless, our results showed the reduction of PON1 activity in people with DS. Even though the decrease of values in „middle“ and „weak“ genotype was not significant (maybe due to small number of subjects in these groups), the average values were lower in people with DS, which is in contrast to decreased development of atherosclerosis in DS. Therefore, it can be concluded that PON1 does not have a direct effect on a lower prevalence of atherosclerosis in people with DS.

It still needs to be answered whether the decrease of PON1 activity in adult people with

ната експресија на ПОН1 генот или секундарна акција на непознат фактор (на пр. зголемен оксидативен стрес). Анализата на експресијата на ПОН1 генот во црнодробните клетки на возрасните лица со ДС употребувајќи квантитативен PCR метод во реално време, може да биде корисен при одговарањето на ова прашање и поради тоа треба да биде вклучен во идни студии во кои се истражува ПОН1 ензимот и неговата поврзаност со ДС.

#### Литература / References

- Demirdogen BC, Turkanoglu A, Bek S. Paraoxonase/arylesterase ratio, PON1 192Q/R polymorphism and PON1 status are associated with increased risk of ischemic stroke. *Clinical Biochemistry* 2008; 41:1-9.
- Flekach M, Shkrha J, Novotny Z. Factors modulating activities and concentration of the antioxidant enzyme paraoxonase 1. *Klin Biochem Metab* 2006; 14(35):33-39.
- Shin BS, Oh SY, Kim YS. The paraoxonase gene polymorphism in stroke patients and lipid profile. *Acta Neurol Scand* 2007; 101:104-107.
- Mutch E, Daly KA, Williams FM. The relationship between PON1 phenotype and PON1-192 genotype in detoxification of three oxons by human liver. *Drug metabolism and disposition* 2007; 35: 315-320.
- Sirivarasai J, Kaojarern S, Yoovathaworn K. Paraoxonase (PON1) polymorphism and activity as the determinants of sensitivity to organophosphates in human subjects. *Chemico-Biological Interactions* 2007; 168: 184-192.
- Nagyova A, Shustrova M, Rashlova K. Plasma lipid and lipoprotein levels and LDL oxidation in subjects with Down syndrome. *Biologia* 1999; 54(6):719-723.
- Dorner K, Gaethke AS, Tolksdorf M. Cholesterol fractions and triglycerides in children and adults with Down's syndrome. *Clinica Chimica Acta* 1984; 142(3): 307-311.
- Licastro F, Dogliotti G, Goi G. Oxidated low-density lipoproteins (oxLDL) and peroxides in plasma of Down syndrome patients. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 2007; 44(1): 225-232.
- Yla-Herttuala S, Luoma J, Nikkari T. Down's syndrome and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1989; 76(2-3):269-272.
- Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos* 1991; 19:100-106.
- Bełtowski J, Wojcicka G, Marciniak A. Species and substrate-specific stimulation of human plasma paraoxonase 1 (PON1) activity by high chloride concentration. *Acta Biochim Pol.* 2002; 49(4):927-36.
- Kim YJ, Park H, Lee HY, Ahn Y, Ha EH, Suh SH, Pang MG. Paraoxonase gene polymorphism, serum lipid, and oxidized low-density lipoprotein in preeclampsia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2007; 133:47-52.
- Janel N, Christophe O, Yahya-Graison EA. Paraoxonase-1 expression is up-regulated in Down syndrome fetal liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 346: 1303-1306.
- Carey JN, Shih DM, Hama SY. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine* 1005; 38: 153-163.