

Paraoxonáza 1 a jej vplyv na rejekciu myokardiálneho štepu u pacientov po transplantácii srdca

Sýkora P^{1,2}, Halčák L³, Gonçalvesová E⁴, Varga I⁴, Gbelcová H^{1,5}, Repiská V¹

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta UK, Bratislava, Slovenská republika

Paraoxonase 1 and its effect on myocardial graft rejection in patients after heart transplantation

Sykora P^{1,2}, Halcak L³, Goncalvesova E⁴, Varga I⁴, Gbelcova H^{1,5}, Repiska V¹

¹The Institute of Medical Biology, Genetics and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, University Hospital Bratislava, the Slovak Republic

Sýkora P, Halčák L, Gonçalvesová E, Varga I, Gbelcová H, Repiská V. **Paraoxonáza 1 a jej vplyv na rejekciu myokardiálneho štepu u pacientov po transplantácii srdca.** Cardiology Lett. 2014;23(1):17–25

Abstrakt. *Úvod:* Najčastejšiu skorú komplikáciu po transplantácii srdca (HTx) predstavuje odvrhnutie, rejekcia transplantovaného myokardiálneho štepu. Vzhľadom na opakovaný nález zvýšených markerov oxidačného stresu u mnohých pacientov po HTx a ich účasť pri imunologickej reakcii v priebehu rejekcie, predstavujú enzýmy ako paraoxonáza 1 (PON1) potenciálny diagnostický parameter.

Cieľ: Stanoviť a následne porovnať paraoxonázovú a arylesterázovú aktivitu enzýmu PON1 v závislosti od jej vybraných DNA polymorfizmov u pacientov po HTx s rôznym stupňom a počtom rejekčných epizód (hladina významnosti určená ako $p < 0,05$).

Pacienti a metódy: 110 vzoriek krvi pacientov po HTx (z toho 79 vzoriek pacientov s prekonanou rejekciou po HTx a 31 od pacientov bez rejekčnej epizódy). Na detekciu DNA polymorfizmov génu

Sykora P, Halcak L, Goncalvesova E, Varga I, Gbelcova H, Repiska V. **Paraoxonase 1 and its effect on myocardial graft rejection in patients after heart transplantation.** Cardiology Lett. 2014;23(1):17–25

Abstract. *Background:* The most common early complication after heart transplantation (HTx) is rejection of the transplanted graft. Regarding the recurrent finding of elevated markers of oxidative stress in many patients after HTx and their involvement in the immune response during rejection, enzymes, such as paraoxonase 1 (PON1), present a potential diagnostic parameter.

Aim of the study: To determine and then compare paraoxonase and arylesterase PON1 enzyme activity depending on the selected DNA polymorphisms in patients after HTx with various stages and numbers of rejection episodes (the level of significance stated as $p < 0.05$).

Patients and methods: 110 blood samples from patients after HTx (79 blood samples from patients with overcome reject-

Z ¹Ústavu lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta UK, Bratislava, Slovenská republika; ²Chirurgického oddelenia, Nemocničná a.s., Malacky, Slovenská republika; ³Ústavu lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Bratislava, Slovenská republika; ⁴Oddelenia zlyhávania a transplantácie srdca, Národný ústav srdcových a cievnych chorôb a.s., Bratislava, Slovenská republika a ⁵Ústavu biochémie a mikrobiológie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, Česká republika

Do redakcie došlo dňa 31. októbra 2013; prijaté dňa 8. novembra 2013

Adresa pre korešpondenciu: MUDr. Pavel Sýkora, Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: pali.sykora@gmail.com

From ¹The Institute of Medical Biology, Genetics and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, University Hospital Bratislava, Slovak Republic; ²The Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, Slovak Republic; ³The National Institute of Cardiovascular Diseases, Bratislava, Slovak Republic; ⁴The Department of surgery, Nemocničná a.s., Malacky, Slovak Republic; ⁵The Department of Biochemistry and Microbiology, the Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic
Manuscript received October 31, 2013; accepted for publication November 8, 2013

Address for correspondence: MUDr. Pavel Sýkora, the Institute of Medical Biology, Genetics and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, University Hospital Bratislava, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovak Republic, email: pali.sykora@gmail.com

PON1 bola použitá PCR-RFLP analýza. Vzorky boli na základe PON1 polymorfizmu rozdelené do troch podskupín – „silný genotyp“ (RR/LL, QR/LL), „stredný genotyp“ (QR/LM, QR/MM, QQ/LL, QQ/LM) a „slabý genotyp“ (QQ/MM). Paraoxonázová a arylesterázová aktivita PON1 bola stanovená spektrofotometrickým monitorovaním hydrolyzy daného substrátu (paraoxón, fenylacetát).

Výsledky: Paraoxonázová ($3,136 \pm 2,300 \mu\text{kat/l}$ vs. $4,075 \pm 3,53 \mu\text{kat/l}$, $p = 0,19$) ani arylesterázová aktivita enzýmu PON1 ($2,021 \pm 0,670 \mu\text{kat/l}$ vs. $1,945 \pm 0,680 \mu\text{kat/l}$, $p = 0,61$) nebola v sledovaných skupinách štatisticky významne rozdielna nezávisle od sledovaných genotypov.

Záver: Aktivita PON1 pravdepodobne nemá patofyziologickú súvislosť s výskytom, respektíve závažnosťou rejekcie transplantovaného myokardiálneho štepu. Obr. 6, Lit. 18, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: Paraoxonáza 1 – 55 (L/M) a 192 (Q/R) DNA polymorfizmus – paraoxonázová aktivita – arylesterázová aktivita – oxidačný stres – rejekcia

ion and 31 blood samples from patients without rejection episode). PCR-RFLP analysis was used to determine PON1's gene polymorphisms. All samples were divided into 3 groups according to polymorphism – “strong genotype” (RR/LL, QR/LL), “middle genotype” (QR/LM, QR/MM, QQ/LL, QQ/LM) and “weak genotype” (QQ/MM). Paraoxonase and arylesterase activities were detected by spectrophotometer of hydrolysis substrate (paraoxone and phenylacetate).

Results: Statistically significant difference of paraoxonase ($3.136 \pm 2.300 \mu\text{kat/l}$ vs. $4.075 \pm 3.53 \mu\text{kat/l}$, $p = 0.19$) and arylesterase PON1's activities ($2.021 \pm 0.670 \mu\text{kat/l}$ vs. $1.945 \pm 0.680 \mu\text{kat/l}$, $p = 0.61$) was not found, irrespective of analyzed genotype.

Conclusion: It is assumed that PON1 has no pathophysiologic relationship with incidence or relevancy of rejection after HTx. Fig. 6, Ref. 18, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: paraoxonase 1 – 55 (L / M) and 192 (Q / R) DNA polymorphism – paraoxonase activity – arylesterase activity – oxidative stress – rejection

Transplantácia srdca (HTx) predstavuje náročnú liečebnú metódu indikovanú u vybraných pacientov s pokročilým, inak neriešiteľným srdcovým zlyhávaním. Vo vyspelých spoločnostiach predstavuje súčasť komplexnej starostlivosti o presne definovaných pacientov v konečnom štádiu srdcového zlyhávania, ktoré nie je možné úspešne riešiť žiadnou zo známych a dostupných konzervatívnych, intervenčných alebo akceptovaných kardiochirurgických liečebných metód (1). V potransplantačnom období sa po kratšom či dlhšom intervale prejavujú komplikácie v dôsledku imunitnej reakcie príjemcu voči myokardiálnemu štepu a tiež nevyhnutnej imunosupresívnej liečby.

Za najčastejšiu skorú komplikáciu po HTx pokladáme odvrhnutie, respektíve rejekciu transplantovaného myokardiálneho štepu. V potransplantačnom období sa vyskytne prakticky minimálne raz u každého príjemcu (2). Patofyziologickým podkladom rejekčných epizód je infiltrácia myokardu T-lymfocytmi (celulárna rejekcia) alebo B-lymfocytmi s produkciou protilátok (humorálna rejekcia). Podľa masívnosti infiltrátu vo vzorke získanej invazívne pomocou endomyokardiálnej biopsie (EMB) rozlišujeme viacero stupňov celulárnej rejekcie – 1R (mierna rejekcia), 2R (stredne ťažká rejekcia) a 3R (ťažká rejekcia) a prítomnosť, respektíve neprítomnosť humorálnej rejekcie (AMR1, respektíve AMR0). EMB predstavuje zlatý štandard detekcie rejekcie, avšak je spätá s malým, no nezanedbateľným rizikom sprievodných komplikácií, ako je napríklad tamponáda srdca alebo pneumotorax.

Paraoxonáza 1, známa tiež ako organofosfáthydroláza, A-esteráza alebo aryltrifosfatáza (PON1, EC 3.1.8.1) predstavuje Ca^{2+} dependentnú fosfotriesterázu pozostávajúcu z 354 aminokyselín tvoriacich dve proteínové podjednotky prevažne v β -štruktúre, stabilizované disulfidovou väzbou medzi dvoma jednotkami cysteínu v pozícii 41 a 352. Každá podjednotka má dve väzbové miesta pre vápenatý ión, ktorý má stabilizujúcu

Heart transplantation (HTx) is a challenging treatment method indicated in selected patients with advanced, otherwise ir-resolvable, heart failure. In developed societies part of the comprehensive care of well-defined patients with end-stage heart failure, which cannot be successfully addressed by any of the known and available conservative, is intervention or cardio surgical therapies (1). In the post-transplant period after a shorter or longer interval complications are exhibited due to the immune response of a recipient against cardiac allograft and also the inevitable immunosuppressive therapy.

Rejection or myocardial rejection of the transplanted graft is considered the most common early complication after heart transplantation. In the post-transplant period it practically happens at least once in each recipient (2). The pathophysiological basis of rejection episodes is infiltration of myocardial T-lymphocytes (cellular rejection) or B-lymphocytes producing antibodies (humoral rejection). According to the robustness of the infiltrate in the sample obtained by invasive endomyocardial biopsy (EMB), various stages of cellular rejection are distinguished – 1R (mild rejection), 2R (moderate rejection) and 3R (severe rejection) and presence or absence of humoral rejection (AMR1 or AMR0). EMB is the gold standard for detection of rejection, however, it is linked to a small but a significant risk of accompanying complications, such as cardiac tamponade or pneumothorax.

Paraoxonase 1, also referred to as organophosphate hydrolase, A-esterase or aryltriphosphatase (PON1, EC 3.1.8.1) is a calcium-dependent phosphotriesterase consisting of 354 amino acids constituting two protein subunits predominantly in the β -structure, stabilized by disulfide bonds between two cysteine units at position 41 and 352. Each subunit has two binding sites for a calcium ion, which has a stabilizing function. Molecular weight of PON1 is approximately 45 kDa.

funkciu. Molekulová hmotnosť PON1 je približne 45 kDa. Podobne ako PON3 je aj PON1 viazaná v krvi na lipoproteíny s vysokou hustotou (HDL) (3, 4). PON1 hydrolyzuje a tým inaktivuje mnohé organofosfáty (OP), ako paraoxón (vzniká v organizme metabolickou premenou insekticidu paratión), insekticidy paratión a chlórpyrifos a nervové jedy ako soman a sarín. Vykazuje laktonázovú aktivitu (podobne ako PON2 a PON3), čiže schopnosť štiepiť dihydrokumarín, homocysteíntiolaktón a iné laktóny. Významným účinkom PON1 je aj inhibícia peroxidácie LDL častíc a hydrolytické štiepenie oxidovaných foriem fosfolipidov, čím významne ovplyvňuje rozvoj aterosklerózy a imunologické reakcie v organizme (5). Antiaterogénny účinok PON1 potvrdzujú mnohé epigenetické, genetické a biochemické štúdie s transgénymi a PON1-knockoutovanými myšami. HDL častice takýchto myší nedokázali zabrániť oxidatívne poškodeniu LDL častíc a tým vzniku ich oxidovaných foriem (oxLDL) (3 – 5).

Gén pre PON1, nachádzajúci sa na lokuse 7q21.3 (29 370 bp), je dominantne exprimovaný v ľudských hepatocytoch. V kódujúcej oblasti génu PON1 boli najviac opísané dva jednonukleotidové polymorfizmy (SNP), konkrétne zámena leucínu za metionín v kodóne 55 (55-Leu/Met (L/M)) a v kodóne 192 zámena glutamínu arginínom (192-Gln/Arg (Q/R)) (6). Na základe 192(Q/R) polymorfizmu, respektíve v súvislosti s aktivitou hydrolyzovať OP, rozlišujeme Q a R-izoformu PON1. R-izoforma hydrolyzuje v *in vitro* podmienkach paraoxón (paraoxonázová aktivita), diazoxón, soman alebo sarín omnoho rýchlejšie ako Q-izoforma, pričom schopnosť hydrolyzovať fenyacetát (arylesterázová aktivita) nie je významne odlišná (7). Polymorfizmus 55(L/M) neovplyvňuje interakciu PON1 do takej miery ako 192(Q/R) DNA polymorfizmus. 55(MM) izoforma je asociovaná s celkovo zníženou paraoxonázovou aktivitou séra (aj antioxidačnou schopnosťou) a nižšou koncentráciou enzýmu (8). Uvedené výsledky štúdií podporuje aj kryštalografická analýza 55(LL) izoformy, ktorá poukazuje na kľúčový význam aminokyseliny leucín v procese usporiadania PON1 enzýmu do terciárnej štruktúry. Aktivitu PON1 preto významne ovplyvňuje individuálny genotyp pre uvedené polymorfizmy, a to v súvislosti s poklesom aktivity v poradí RR>QR>QQ v pozícii 192 a LL>LM>MM v pozícii 55 polypeptidového reťazca (9, 10).

Celosvetovo je všeobecnou snahou zadefinovať parametre významne korelujúce s epizódou rejekcie transplantovaného štepu bez nutnosti použitia EMB. Vzhľadom na opakovaný nález zvýšených markerov oxidačného stresu u mnohých pacientov po HTx a ich účasť pri imunologickej reakcii v priebehu rejekcie, stávajú sa tieto potenciálnym diagnostickým cieľom (11, 12).

Materiál a metódy

Do štúdie bolo zaradených 110 vzoriek krvi odobraných pri štandardne realizovaných EMB a kontrolných ambulant-

Like PON3, PON1 is also tied up in blood high-density lipoproteins (HDL) (3, 4). PON1 hydrolyzes and thereby inactivates many organophosphates (OP) such as paraoxon (produced in the body metabolic transformation of the insecticide parathion), parathion and chlorpyrifos insecticides and nerve gases such as sarin and soman. It shows lactonase activity (like PON2 and PON3), i.e. the ability to cleave dihydrocoumarine, homocysteine thiolactone and other lactones. A PON1 strong effect is the inhibition of peroxidation of LDL particles and hydrolytic cleavage of the oxidized form of phospholipids, which significantly influences the development of atherosclerosis and immunological reactions in the body (5). The anti-atherogenic effect of PON1 is confirmed by many epigenetic, genetic and biochemical studies with transgenic and PON1 – knockout mice. HDL particles of the mice failed to prevent oxidative damage to LDL particles and the formation of oxidized forms (oxLDL) (3 – 5).

The PON1 gene, located on the 7q21.3 locus (29 370 bp), is dominantly expressed in human hepatocytes. In the coding region of the PON1 gene two single nucleotide polymorphisms (SNP) have been best described, namely the substitution of leucine for methionine at codon 55 (55-Leu/Met (L/M)) and codon 192 glutamine substitution of arginine (192-Gln/Arg (Q/R)) (6). By 192(Q/R) polymorphism, or linked to the action to hydrolyze OP, Q and R-isoform of PON1 is distinguished. R-isoform hydrolysed *in vitro* conditions paraoxon (paraoxonase activity), diazoxon, soman and sarin much faster than Q-isoform, while the ability to hydrolyze phenylacetate (arylesterase activity) is not significantly different (7). Polymorphism 55(L/M) does not affect the interaction of PON1 as much as 192(Q/R) polymorphism. The 55(MM) isoform is associated with a general reduction in paraoxonase serum activity (including antioxidant ability) and a lower concentration of the enzyme (8). These results of studies are supported by crystallographic analysis of 55(LL) isoforms, demonstrating the crucial importance of the amino acid leucine in the process of design of the PON1 enzyme in the tertiary structure. PON1 activity therefore significantly affects an individual genotype for the polymorphism and in reducing activity in the order of RR>QR>QQ at position 192 and LL>LM>MM at position 55 in the polypeptide chain (9, 10).

There is a worldwide effort to define the general parameters significantly correlated with rejection episodes grafts without the use of EMB. Because of the recurrent finding of elevated markers of oxidative stress in many patients after heart transplantation and their involvement in the immune response during rejection, they become a potential diagnostic target (11, 12).

Materials and methods

The study comprised 110 samples of blood collected in standard EMB and control samplings in patients after HTx

ných odberoch u pacientov po HTx z Oddelenia zlyhávania a transplantácie srdca Národného ústavu srdcových a cievnych chorôb (NÚSCH) v Bratislave. Študijnú skupinu tvorili pacienti s rôznym stupňom a počtom rejekcií vo veku 21 – 71 rokov.

DNA všetkých získaných vzoriek bola izolovaná z krvi pomocou Qiagen Blood DNA mini kitu. Detekcia vybraných PON1 polymorfizmov bola realizovaná pomocou PCR-RFLP analýzy. Reakčná zmes PCR reakcie v celkovom objeme 25 µl obsahovala 2,5 µl vyzisolatej DNA, 0,5 µM z každého primeru (BioTez Berlin-Buch GmbH) a 12,5 µl GoTaq Green Master Mixu (Promega) obsahujúceho 2x Green GoTaq Reaction Buffer (pH 8,5), 400 µM z každého dXTP a 3 mM MgCl₂. Amplifikovaný PCR produkt bol následne štiepaný reštrikčnými endonukleázami *AlwI* a *NlaIII* (New England Biolabs). Získané štiepne fragmenty boli rozdelené elektroforézou v agarózovom géli. Vizualizácia a určenie veľkosti štiepných fragmentov sa uskutočnilo pomocou UV-transiluminátora použitím 50 bp dĺžkového markera (tabuľka 1).

Paraoxonázová aktivita bola stanovená spektrofotometrickým monitorovaním hydrolýzy paraoxónu (O,O-dietyl O-(4-nitrofenyl) fosfát), rozkladom ktorého vzniká dietylfosfát a p-nitrofenol, ktorého koncentráciu možno spektrofotometricky stanoviť pri 412 nm. Stanovovaná bola stimulovaná a nestimulovaná paraoxonázová aktivita použitím 1,0 mM

from the Departments of Failure and Cardiac Transplantation of The National Institute of Cardiovascular Diseases (NÚSCH) in Bratislava. The study group consisted of patients with varying degrees and numbers of rejection at the age from 21 to 71 years.

DNA of all the samples was isolated from blood using the Qiagen Blood DNA mini kit. Detecting chosen PON1 polymorphisms was performed by PCR-RFLP analysis. PCR reaction mixture in a total volume of 25 µl contained 2.5 µl of extracted DNA, 0.5 µM of each primers (BioTez Berlin-Buch GmbH) and 12.5 µl of GoTaq Green Master Mix (Promega) containing 2x Green GoTaq Reaction Buffer (pH 8.5), 400 µM of each dXTP and 3 mM MgCl₂. The amplified PCR product was then digested by restriction endonucleases *AlwI* and *NlaIII* (New England Biolabs). Obtained digested fragments were separated in agarose gel by electrophoresis. Visualization and size determination of digested fragments was performed by using a UV-transilluminator using measures of length 50bp marker (Table 1).

Paraoxonase activity was determined by spectrophotometric monitoring of the hydrolysis of paraoxon (O,O-diethyl O-(4-nitrophenyl) phosphate) decay, from which diethyl phosphate and p-nitrophenol originates: its concentration can be determined spectrophotometrically at 412nm. Stimulated and unstimulated paraoxonase activity was determined using

Tabuľka 1 Protokol DNA analýzy

Table 1 DNA analysis protocol

Polymorfizmus (<i>Polymorphism</i>)	Primery (<i>Primers</i>)	PCR produkt (<i>PCR product</i>)
55(L/M)	5'-CCTGCAATAATATGAAACAACCTG-3' 5'-CTAGAACACAGAAAAGTGAAAGAAAAC-3'	138 bp
192(Q/R)	5'-TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3' 5'-CACGCTAAACCCAAATACATCTC-3'	99 bp
PCR reakcia (<i>reaction</i>)	Biometra UNOII Thermalcycler	Čas (<i>Time</i>)
Iniciálna denaturácia (<i>Initial denaturation</i>)	96 °C	120 s
Denaturácia (<i>Denaturation</i>)	94 °C	60 s
Annealing + elongácia (<i>Annealing + elongation</i>)	58 °C 30 cycles	6 min
Konečná elongácia (<i>Final elongation</i>)	72 °C	10 min
Polymorfizmus (<i>Polymorphism</i>)	Reštrikčná analýza (<i>Restriction analysis</i>)	Enzým (<i>Enzyme</i>)
	PCR produkt (<i>PCR product</i>) 12,5 µl	
	Pufor (<i>Buffer</i>) 1,2 µl	
55(L/M)	Reštrikčná endonukleáza (<i>Restriction endonuclease</i>) 0,4 µl	Nla III
192(Q/R)	Reštrikčná endonukleáza (<i>Restriction endonuclease</i>) 0,25 µl	Alw I
	Teplota (<i>Temperature</i>) 37 °C	
	Čas (<i>Time</i>) 3 h	
Reštrikčné fragmenty (<i>Restriction fragments</i>)	Nla III Fenotyp (<i>Phenotype</i>) Typ (<i>Type</i>)	
	138 bp LL Homozygot (<i>Homozygote</i>)	
55(L/M)	69 + 69 bp MM Homozygot (<i>Homozygote</i>)	
	138 bp, 69 + 69 bp LM Heterozygot (<i>Heterozygote</i>)	
Reštrikčné fragmenty (<i>Restriction fragments</i>)	Alw I Fenotyp (<i>Phenotype</i>) Typ (<i>Type</i>)	
	99 bp QQ Homozygot (<i>Homozygote</i>)	
192(Q/R)	63 + 36 bp RR Homozygot (<i>Homozygote</i>)	
	99 bp, 63 + 36 bp QR Heterozygot (<i>Heterozygote</i>)	

roztoku paraoxónu (Sigma), v reakčnej zmesi, ktorú tvorili 50 mM Tris roztok (pH 8,0; obsahujúci 1,0 mM roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pre nestimulovanú aktivitu a 1,0 mM roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ s 1,0 M roztokom NaCl pre stimulovanú aktivitu) a 40-krát riedené krvné sérum (10).

Arylesterázová aktivita bola stanovená spektrofotometrickým monitorovaním hydrolýzy fenylacetátu ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$), ktorého štiepením vzniká kyselina octová a fenol, ktorého prítomnosť sa spektrofotometricky stanovuje pri 270 nm. Arylesterázová aktivita sa stanovovala použitím 50 mM roztoku fenylacetátu (Sigma), v reakčnej zmesi ako pri nestimulovanej paraoxonázovej aktivite s tým rozdielom, že krvné sérum v reakčnej zmesi bolo 800-krát zriedené (10).

Paraoxonázová a arylesterázová aktivita enzýmu PON1 bola stanovená z nameraných hodnôt absorbičností zaznamenaných v priebehu troch minút a kalibračnej krivky pre štandardné roztoky p-nitrofenolu a fenolu. Okrem uvedených aktivít boli na Oddelení klinickej biochémie NÚSCH stanovené aj parametre lipidového profilu – celkový cholesterol (CCH), triacylglyceroly (TAG) a koncentrácia HDL častíc.

Hodnoty paraoxonázovej a arylesterázovej aktivity enzýmu PON1 boli následne porovnané u pacientov „bez rejekcie“ a u pacientov „s rejekciou“, a to vzhľadom na zastúpenie a vplyv 55(L/M) a 192(Q/R) DNA polymorfizmov PON1 génu, ako aj na jednotlivé parametre lipidového profilu.

Kontrolný súbor pre porovnanie aktivít PON1 pacientov po HTx tvorili vzorky krvi od vybraných, relatívne zdravých jedincov bez transplantácie srdca približne rovnakého veku ($n = 40$).

Všetky vzorky boli na základe stupňa celulárnej a humorálnej rejekcie rozdelené na dve hlavné skupiny: bez prítomnosti rejekcie – 0R a AMR0 ($n = 31$) a s prítomnou rejekciou – 1R, 2R, 3R a AMR1 ($n = 79$). Podľa výsledkov DNA analýzy boli rozdelené ďalej jednotlivé vzorky do troch podskupín – „silný genotyp“ (polymorfizmy RR/LL, QR/LL), „stredný genotyp“ (polymorfizmy QR/LM, QQ/LL, QQ/LM) a „slabý genotyp“ (polymorfizmus QR/MM a QQ/MM) (**tabuľka 2**).

Výsledky

Pri porovnaní paraoxonázovej aktivity (stimulovaná + nestimulovaná aktivita PON1) nebola pozorovaná významne rozdielna aktivita enzýmu PON1 vzhľadom na prítomnosť, či stupeň rejekcie. U pacientov „bez rejekcie“ bola síce priemerná hodnota nestimulovanej aj stimulovanej PON1 aktivity mierne vyššia (**tabuľka 3**), no významný rozdiel nebol dokázaný ($p > 0,05$). Podobne, nebol preukázaný významný rozdiel ani pri porovnaní arylesterázovej aktivity enzýmu PON1 u pacientov bez a s rejekciou (**tabuľka 3**). V rámci porovnania zastúpenia uvedených DNA polymorfizmov a hodnôt jednotlivých parametrov lipidového profilu sa nezistili významné

1.0mM paraoxon solution (Sigma) in the reaction mixture, which consisted of 50mM Tris solution (pH 8.0, containing 1.0mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solution for unstimulated activity and 1.0mM solution $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ with 1.0M NaCl solution for stimulated activity) and 40x diluted blood serum (10).

Arylesterase activity was determined by spectrophotometric monitoring of hydrolysis of phenylacetate ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$) after digesting of which acetic acid and phenol develop, the presence of which was spectrophotometrically determined at 270nm. Arylesterase activity was determined using 50mM sodium phenylacetate (Sigma) in the reaction mixture as in unstimulated paraoxon activity, with exception that the blood serum in the reaction mixture was diluted 800 times (10).

Paraoxonase and arylesterase PON1 enzyme activity was determined from the measured values of the optical densities recorded within 3 minutes and the calibration curve for standard solutions of p-nitrophenol and phenol. In addition to these activities the parameters of lipid profile – total cholesterol (CCH), triacylglycerols (TAG) and HDL particle concentration were determined at The Department of Clinical Biochemistry NÚSCH.

Values of paraoxonase and arylesterase PON1 enzyme activity were subsequently compared in patients “without rejection” and patients “with rejection”, both with respect to representation and influence of 55(L/M) and 192(Q/R) DNA polymorphisms of PON1 gene and the various parameters of lipid profile.

The control group for comparison PON1 activities of patients after heart transplantation comprised blood samples selected from relatively healthy individuals without heart transplantation around the same age ($n=40$).

All samples were based on the degree of cellular and humoral rejection divided into 2 main groups: in the absence of rejection – 0R and AMR0 ($n=31$) and with present rejection – 1R, 2R, 3R and AMR1 ($n=79$). According to the results of DNA analysis the further particular samples were divided into 3 subgroups – “strong genotype” (polymorphisms RR/LL, QR/LL), “mean genotype” (polymorphisms QR/LM, QQ/LL, QQ/LM) and “weak genotype” (polymorphism QR/MM and QQ/MM) (**Table 2**).

Results

When compared paraoxonase activities (stimulated + unstimulated PON1 activity) a significantly different PON1 enzyme activity due to the presence or degree of rejection was not observed. However, in patients with “no rejection” the average value of unstimulated and stimulated PON1 activity was slightly higher (**Table 3**), but a significant difference ($p > 0.05$) was not proved. Similarly, no significant difference was demonstrated in comparison with arylesterase PON1 enzyme activity in patients with and without rejection (**Table 3**). The comparison of the representation of provided DNA polymorphisms and

Tabuľka 2 Charakteristika sledovaných skupín „bez rejekcie“ a „s rejekciou“**Table 2** Characteristics of groups “without rejection” and “with rejection”

Parametre (Parameters)	Bez rejekcie (without rejection)	S rejekciou (with rejection)	p
n	31	79	
Priemerný vek (roky) (mean age in years)	46,93	49,94	
Pohlavie (M/Ž) [sex (M/F)]	28/3	67/12	
Lipidový profil (Lipid profile) (mmol/l)			
Celkový cholesterol (Total cholesterol)	4,76 ± 0,86	4,62 ± 1,21	p = 0,62
Triacylglyceroly (Triacylglycerols)	1,84 ± 0,55	2,19 ± 0,38	p = 0,13
HDL	1,33 ± 0,41	1,28 ± 0,72	p = 0,56
Polymorfizmy (Polymorphisms) (%)			
„silný genotyp“ (“strong genotype”)	43,33	15,19	
„stredný genotyp“ (“middle genotype”)	50,00	82,28	
„slabý genotyp“ (“weak genotype”)	6,67	2,53	
PON1 aktivita (PON1 activity)			
Arylesterázová aktivita (mkat/l séra) (arylesterase activity) (mkat/l of serum)	1,945 ± 0,68	2,021 ± 0,67	p = 0,61
Nestimulovaná paraoxonázová aktivita (μkat/l séra) (non-stimulated paraoxonase activity) (μkat/l of serum)	1,761 ± 1,42	1,376 ± 1,06	p = 0,19
Stimulovaná paraoxonázová aktivita (μkat/l séra) (stimulated paraoxonase activity) (μkat/l of serum)	4,075 ± 3,53	3,136 ± 2,30	p = 0,19

rozdiely u skupiny pacientov „bez rejekcie“ v porovnaní so skupinou „s rejekciou“ (tabuľka 3).

Enzymová aktivita PON1 sa hodnotila aj v rámci jednotlivých podskupín vytvorených na základe výsledkov DNA analýzy – „silný genotyp“, „stredný genotyp“ a „slabý genotyp“.

Pri porovnaní paraoxonázovej aktivity enzýmu PON1 vzhľadom na „silný“ genetický potenciál (polymorfizmy RR/LL, QR/LL) neboli jednoznačne zaznamenané vyššie priemerné hodnoty nestimulovanej i stimulovanej PON1 aktivity u polymorfizmu RR/LL. Uvedená skutočnosť bola pozorovaná u pacientov po HTx, no i v rámci výsledkov jednotlivých účastníkov kontrolného súboru. Priemerné hodnoty paraoxonázovej aktivity PON1 boli síce u pacientov po HTx vyššie, no výsledok sa nejaví ako štatisticky významný ($p > 0,05$).

individual parameters of lipid profile significant differences in “no rejection” patient populations compared to the group “with rejection” was not revealed (Table 3).

PON1 enzyme activity was evaluated in the subgroup generated by results of DNA analysis – “strong genotype”, “mean genotype” and “weak genotype”.

When compared with paraoxonase PON1 enzyme activity due to the “strong” genetic potential (polymorphisms RR/LL, QR/LL) higher average unstimulated and stimulated PON1 activity polymorphism at RR/LL were not clearly recorded. This fact has been observed in patients after heart transplantation, but also from the results of individual participants’ control group. The average values of paraoxonase PON1 activity were admittedly in patients after heart transplantation higher, but the outcome does not appear to be statistically significant ($p > 0,05$).

Tabuľka 3 „Silný genotyp“ a PON1 aktivita – pacienti po HTx v porovnaní s kontrolným súborom (K)**Table 3** “Strong genotype” and PON1 activity – patients after HTx and control group (C)

„Silný genotyp“ (“Strong genotype”)	HTx	K (C)	p	HTx	K (C)	p
	RR/LL	RR/LL		QR/LL	QR/LL	
Počet vzoriek (Number of samples) (n)	10	2		15	11	
Paraoxonázová aktivita (μkat/l séra) (Paraoxonase activity) (μkat/l of serum)						
– stimulovaná (stimulated)	3,144	3,087	p > 0,05	1,943	1,330	p > 0,05
SDPP	± 1,396	± 0,667		± 1,035	± 0,856	
– nestimulovaná (non-stimulated)	7,165	7,429	p > 0,05	4,535	3,326	p > 0,05
SDPP	± 3,103	± 1,708		± 2,846	± 2,044	
Arylesterázová aktivita (mkat/l séra) (Arylesterase activity) (mkat/l of serum)						
	1,706	1,760	p > 0,05	2,032	1,881	p > 0,05
SDPP	± 0,636	± 0,383		± 0,667	± 0,768	

Výsledky arylesterázovej aktivity nepreukázali žiadnu súvislosť vzhľadom na uvedené polymorfizmy. V skupine charakterizovanej polymorfizmom RR/LL bola arylesterázová aktivita dokonca vyššia ako v skupine s polymorfizmom QR/LL.

V rámci skupiny „stredný genotyp“ charakterizovanej polymorfizmami QR/LM, QQ/LL a QQ/LM ukázali výsledky podobnú závislosť paraoxonázovej aktivity vzhľadom na genetické pozadie jednotlivých účastníkov štúdie. Zaznamenaný bol obdobný pokles paraoxonázovej PON1 aktivity vzhľadom na klesajúcu „silu genotypu“ v poradí QR/LM > QQ/LL > QQ/LM. Pri porovnaní pacientov po HTx vzhľadom na kontrolný súbor boli výsledky pri polymorfizmoch QR/LL a QQ/LM štatisticky významné ($p = 0,013$, respektíve $p = 0,005$ a $p = 0,016$, respektíve $p = 0,029$) (tabuľka 4).

Pri porovnaní arylesterázových aktivít enzýmu PON1 opäť nebola zaznamenaná žiadna súvislosť medzi aktivitou samotného enzýmu PON1 a jednotlivými typmi DNA polymorfizmov (tabuľka 4).

Čo sa týka skupiny „slabý genotyp“, vzhľadom na nízky počet vzoriek – pacientov po HTx ($n = 5$), respektíve účastníkov štúdie v rámci kontrolného súboru ($n = 9$), nemohli byť tieto výsledky relevantne spracované s vytvorením adekvátneho záveru.

Pri analýze výsledkov lipidového profilu sme hľadali závislosť medzi paraoxonázovou aktivitou enzýmu PON1, respektíve stupňom rejekcie myokardiálneho štepu a jednotlivými parametrami lipidového profilu – CCH, TAG a HDL cholesterol. V rámci uvedených parametrov bola zaznamenaná priemerne stúpajúca hodnota paraoxonázovej aktivity enzýmu PON1 vzhľadom na rastúci trend koncentrácie HDL lipoproteínov v sére.

Pri analýze výsledkov paraoxonázovej aktivity enzýmu PON1, koncentrácie HDL lipoproteínov a stupňa rejekcie myokardiálneho štepu (0R = “0”, 1R = “1” a 2R = “2”), nebola zaznamenaná evidentná korelácia závislosti stupňa rejekcie od paraoxonázovej aktivity enzýmu PON1, respektíve koncentrácie HDL častíc v krvi

The results of arylesterase activity did not show any correlation with regard to the polymorphisms. In the group characterized by polymorphisms RR/LL arylesterase activity was even higher than in the group characterized by polymorphism QR/LL.

Within the group of “mean genotype” characterized by polymorphisms QR/LM, QQ/LL and QQ/LM the results showed similar dependence of paraoxonase activity due to the genetic background of study participants. There has been a similar decline of paraoxonase PON1 activity due to declining “power of genotype” in order of QR/LM > QQ/LL > QQ/LM. Comparing patients after HTx regarding the results of a control group the results of polymorphisms in the QR/LL and QQ/LM) were statistically significant ($p = 0.013$ or $P = 0.005$ and $p = 0.016$, respectively $P = 0.029$) (Table 4).

Comparing arylesterase PON1 enzyme activity no association between PON1 enzyme activity itself and the different types of DNA polymorphisms was observed (Table 4).

Regarding the “weak genotype”, owing to the low number of samples, heart transplantation patients ($n=5$) or study participants in the control group ($n=9$), these results could not be relevantly treated with the creation of an adequate conclusion.

When analyzing the results of the lipid profile we were looking for paraoxonase relationship between PON1 enzyme activities or the degree of myocardial graft rejection and the various parameters of lipid profile – CCH, TAG and HDL cholesterol. Within the given parameters a slightly rising average value of paraoxonase PON1 enzyme activity was observed due to the growing trend of concentration in serum HDL lipoproteins.

When analyzing the results of paraoxonase PON1 enzyme activity, concentrations of HDL lipoproteins and the degree of myocardial graft rejection (0R = “0”, 1R = “1” and 2R = “2”), an evident correlation depending on the degree of rejection from paraoxonase PON1 enzyme activity or HDL particles

Tabuľka 4 „Stredný genotyp“ a PON1 aktivita – pacienti po HTx v porovnaní s kontrolným súborom (K)

Table 4 “Middle genotype” and PON1 activity – patients after HTx and control group (C)

„Silný genotyp“ (“Middle genotype”)	HTx	K (C)	p	HTx	K (C)	p	HTx	K (C)	p
	QR/LM	QR/LM		QQ/LL	QQ/LL		QQ/LM	QQ/LM	
Počet vzoriek (Number) (n)	30	9		21	4		30	5	
Paraoxonázová aktivita (μkat/l séra) (Paraoxonase activity) (μkat/l of serum)									
– stimulovaná (stimulated)	5,185	3,550	$p = 0,013$	1,732	2,190	$p > 0,05$	1,457	0,832	$p = 0,016$
SDPP	± 1,608	± 1,587		± 1,005	± 1,681		± 1,254	± 0,194	
– nestimulovaná (non-stimulated)	2,318	1,462	$p = 0,005$	0,757	1,380	$p > 0,05$	0,609	0,391	$p = 0,029$
SDPP	± 0,771	± 0,635		± 0,433	± 1,556		± 0,446	± 0,095	
Arylesterázová aktivita (mkat/l séra) (Arylesterase activity) (mkat/l of serum)									
	2,223	1,796	$p > 0,05$	2,205	2,055	$p > 0,05$	1,814	1,637	$p > 0,05$
SDPP	± 0,582	± 0,495		± 0,622	± 0,110		± 0,702	± 0,360	

pacientov po HTx. Čo sa týka ďalších parametrov lipidového profilu, nebol zaznamenaný významný vzťah či už so samotnou rejekciou po HTx, alebo aktivitou enzýmu PON1.

Diskusia a záver

V potransplantačnom období sa u mnohých pacientov opakovane zistili zvýšené markery oxidačného stresu a vyššie hodnoty nielen celkového cholesterolu, triacylglycerolov, ale aj LDL a VLDL lipoproteínov (13).

Antiaterogénny efekt enzýmu PON1 by mohol byť významný vzhľadom na zníženie oxidačného poškodenia LDL lipoproteínov s následným poklesom tvorby negatívne pôsobiacich lipoperoxidov.

Na základe vyššie uvedených výsledkov možno predpokladať, že aktivita PON1 nemá patofyziologickú súvislosť s výskytom, respektíve závažnosťou rejekcie transplantovaného myokardiálneho štepu. Vyššia priemerná aktivita PON1 u pacientov „bez rejekcie“ môže súvisieť s častejším výskytom „silného genotypu“ (43 vs. 15 %) v tejto skupine.

Podobne autori Puk a Bocchi (13) vo svojej štúdii dospeli k záveru, že PON1 aktivita sa neodlišuje pri porovnaní hodnôt u pacientov po transplantácii srdca a zdravých, normolipidemických ľudí. Limitáciou práce je iste aj veľkosť súboru s nižším počtom vzoriek (31 : 79). Cieľom do budúcnosti zostáva naďalej hľadať iný, významne korelujúci parameter s epizódami rejekcií, čo by viedlo k ich včasnejšej detekcii a menšiemu výskytu komplikácií v súvislosti s realizáciou EMB.

Okrem samotnej rejekcie by bolo potrebné zamerať sa i na výskyt, respektíve rozvoj koronárnej vaskulopatie, ktorá vo významnej miere ohrozuje pacientov po HTx v stredno- a dlhodobom horizonte.

Klinický nález na koronárnych artériách transplantovaného myokardiálneho štepu, biochemické zmeny v lipidových parametroch a vplyv vybraných DNA polymorfizmov PON1 génu otvárajú možnosť ďalšieho vedeckého bádania u pacientov ohrozených vaskulárnou chorobou štepu (koronárnou vaskulopatiou), preto budeme v budúcom výskume sledovať vybrané DNA polymorfizmy s cieľom prispieť k objasneniu tohto patofyziologického procesu.

PodĎakovanie

Táto vedecká výskumná úloha bola podporená grantovou komisiou VEGA pre lekárske a farmaceutické vedy – číslo projektu 1/0186/11 a CZ.1.07/2.3.00/30.0060. Štúdiu pred jej začiatkom schválila etická komisia v roku 2011.

with the blood of patients after heart transplantation was not recorded. As for the other parameters of lipids profile, there was not a significant relationship either with self rejection after heart transplantation or PON1 enzyme activity.

Conclusion and discussion

As has already been mentioned, in the post-transplant period, many patients presented repeatedly increased markers of oxidative stress and higher levels of both total cholesterol, triacylglycerols, as well as LDL and VLDL lipoproteins (13).

Anti-atherogenic effect of PON1 enzyme could be important in reducing oxidative damage to LDL lipoproteins with subsequent decrease of negative operating lipoperoxides.

Based on the above results, it can be assumed that the activity of PON1 has not any pathophysiological correlation with the incidence or severity of myocardial rejection of the transplanted graft. Higher mean PON1 activity in patients “without rejection” may reflect a higher frequency of “strong genotype” (43 vs. 15%) in this group.

Similarly, the authors Puk and Bocchi in their study concluded that PON1 activity is not different when compared with values in cardiac transplant patients and healthy, normolipidemic people (14). A limitation of this work is certainly the file size with fewer samples (31:79). The prospective is to hunt for another significantly correlated parameter with episodes of rejection, which would lead to the earlier detection and lower incidence of complications in the implementation of the EMB.

In addition to the rejection it is necessary to focus also on the incidence or development of coronary vasculopathy, which significantly endangers patients after heart transplantation in the medium and long term.

Clinical findings on coronary arteries of myocardial transplanted graft, biochemical changes in lipid parameters and the impact of selected DNA polymorphisms of PON1 gene open up the possibility of further scientific investigation in patients at risk of graft vascular disease (coronary vasculopathy): therefore, in the future research we will follow the selected DNA polymorphisms in order to help clarify the pathophysiological process.

Acknowledgement

This scientific research has been supported by the VEGA grant committee for medical and pharmaceutical sciences – no. projects 1/0186/11 and CZ.1.07/2.3.00/30.0060. The study was approved before the start by an ethics committee in 2011.

Literatúra/References

1. Goncalvesová E. Transplantácia srdca – konečné riešenie pre pacientov s pokročilým srdcovým zlyhávaním. *Via practica* 2006;3(9):400-403.
2. Taylor DO, Stehlik J, Edwards LB, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Heart Transplant Report-2009. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:1007-1022.
3. Carey JNG, Diana M. Shih, Susan Y. Hama, et al. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine* 2005;38:153-163.
4. Demirdögen BC, Türkanoglu 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.
5. Flekač M, Škrha J, Novotný Z. Faktory ovlivňující aktivitu a koncentraci antioxidantního enzymu paraoxonáza 1. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2006;14(35);1:33-39.
6. Shin BS, Oh SY, Kim YS. The paraoxonase gene polymorphism in stroke patients and lipid profile. *Acta Neurologica Scandinavica* 2007;10:126-130.
7. 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.
8. Blatter Garin MC, James RW, Dussoix P. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 1997;99:62-66.
9. 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.
10. Sýkora P, Repiská V, Halčák L. 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. *Journal of special education and rehabilitation* 2010;11(1-2):103-113.
11. Akhlaghi F, Jackson CH, Parameshwar, J. Risk factors for the development and progression of dyslipidemia after heart transplantation. *Transplantation* 2002;73:1258-1264.
12. Bellotti G, Bocchi EA, Goiato MA. Lipid profile changes during the late follow-up after heart transplantation. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 1996;66:263-266.
13. Valantine H, Rickenbacker P, Kemm M. Metabolic abnormalities characteristic of dysmetabolic syndrome predict development of transplant coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:2144-2152.
14. Puk CG, Bocchi EA, Lo Prete AC. Transfer of cholesterol and other lipids from a lipid nanoemulsion to high-density lipoprotein in heart transplant patients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2009;28(10):1075-1080.