

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

Dorota Zawiślak

Polimorfizmy i aktywność paraoksonazy 1 a ryzyko rozwoju  
sporadycznej postaci stwardnienia bocznego zanikowego

*Praca doktorska*

Promotor: dr hab. med. Agnieszka Słowik

Pracę wykonano w Klinice Neurologii i Laboratorium  
Neurogenetycznym Kliniki Neurologii UJ CM  
Kierownik jednostki: Prof. dr hab. med. Andrzej Szczudlik

Kraków, 2009 rok

## SPIS TREŚCI

I. WPROWADZENIE.....	3
I.1. PARAOKSONAZY .....	3
I.1.1. Paraoksonazy – charakterystyka .....	3
I.1.2. Specyficzność substratowa paraoksonaz .....	3
I.1.3. Paraoksonaza 1 (PON1) .....	4
I.1.3.1. Budowa PON1 .....	5
I.1.3.2. Funkcja PON1 .....	10
I.1.3.3. Rola PON1 w procesach patofizjologicznych .....	10
I.1.3.4. Czynniki wpływające na aktywność PON1 .....	12
I.1.4. Paraoksonaza 2 (PON2) .....	17
I.1.5. Paraoksonaza 3 (PON3) .....	18
I.2. STRES OKSYDACYJNY .....	20
I.2.1. Antyoksydanty.....	20
I.2.2. Markery stresu oksydacyjnego .....	22
I.3. NEURODEGENERACJA .....	24
I.4. STWARDNIENIE BOCZNE ZANIKOWE .....	25
I.4.1. Sporadyczna postać stwardnienia bocznego zanikowego.....	26
I.4.2. Rodzinna postać stwardnienia bocznego zanikowego.....	27
I.5. ETIOPATOGENEZA I CZYNNIKI RYZYKA SPORADYCZNEJ POSTACI STWARDNIENIA BOCZNEGO ZANIKOWEGO. ....	30
I.5.1. Etiopatogeneza .....	30
I.5.1.1. Stres oksydacyjny w SLA .....	32
I.5.2. Czynniki ryzyka.....	34
I.5.3. Leczenie SLA.....	40
I.6. STWARDNIENIE BOCZNE ZANIKOWE A PON .....	41
II. CEL NAUKOWY PROJEKTU I ZADANIA BADAWCZE.....	42
II.1. CEL NAUKOWY PROJEKTU .....	42
II.2. ZADANIA BADAWCZE.....	42
III. MATERIAŁ .....	43
III.1. GRUPA BADANA .....	43
III.2. GRUPA KONTROLNA .....	44
III.3. MATERIAŁ BIOLOGICZNY .....	45
IV. METODY.....	46
IV.1. BADANIE NEUROLOGICZNE .....	46
IV.2. METODYKA BADAŃ LABORATORYJNYCH.....	46
IV.2.1. Izolowanie DNA .....	46
IV.2.2. Oznaczenie polimorfizmów genów .....	46
IV.2.2.1. Polimorfizm genu paraoksonazy 1 Gln192Arg (Q/R).....	46
IV.2.2.2. Polimorfizm genu paraoksonazy 1 Leu54Met (L/M).....	47
IV.2.2.3. Polimorfizm genu paraoksonazy 2 Cys311Ser (C/S).....	48
IV.2.2.4. Polimorfizm genu paraoksonazy 1 –A162G.....	48
IV.2.3. Oznaczanie aktywności paraoksonazy 1.....	49
IV.2.3.1. Aktywność paraoksonazowa (substrat – paraokson).....	49
IV.2.3.2. Aktywność arylesterazowa (substrat – octan fenylu).....	49
IV.3. ANALIZA STATYSTYCZNA .....	50
IV.4. INFORMACJE DODATKOWE .....	50
V. WYNIKI.....	51
V.1. BADANIA GENETYCZNE.....	51
V.1.1. Charakterystyka badanych grup – dane demograficzne.....	51
V.1.2. Polimorfizm Q192R genu PON1.....	53
V.1.3. Polimorfizm L55M genu PON1 .....	57
V.1.4. Polimorfizm –A162G genu PON1 .....	61

V.1.5. Polimorfizm C311S genu PON2 .....	65
V.1.6. Analiza haplotypów .....	69
V.1.7. Modele logistyczne.....	72
V.2. BADANIA AKTYWNOŚCI PARAOKSONAZ .....	73
VI. DYSKUSJA .....	79
VI.1. ZWIĄZEK POLIMORFIZMÓW GENU PON1 I PON2 Z RYZYKIEM ZACHOROWANIA NA SLA .....	79
VI.1.1. Związek polimorfizmów genu PON1 i PON2 z ryzykiem zachorowania na SLA w zależności od pierwszych objawów choroby .....	88
VI.1.2. Związek polimorfizmów genu PON1 i PON2 z ryzykiem zachorowania na SLA – podsumowanie .....	90
VI.2. AKTYWNOŚĆ PON1.....	91
VI.2.1. Aktywność PON1 – podsumowanie.....	96
VII. WNIOSKI .....	98
VIII. STRESZCZENIE .....	99
IX. SUMMARY .....	102
X. PIŚMIENNICTWO.....	104

## I. WPROWADZENIE

### I.1. Paraoksonazy

#### I.1.1. Paraoksonazy – charakterystyka

W 1946 roku Abraham Mazur po raz pierwszy opisał enzym w tkankach zwierzęcych mający zdolność hydrolizowania związków fosforoorganicznych [Mazur, 1946]. Został on nazwany paraoksonazą 1 (PON1, EC 3.1.8.1) ze względu na zdolność do hydrolizy paraoksonu, jednego ze związków fosforoorganicznych [Draganov i La Du, 2004]. Obecnie znane są trzy białka paraoksonazy. Białka te są kodowane przez trzy geny, tzn. *PON1*, *PON2*, *PON3* [Primo–Parmo i wsp., 1996]. Geny te zlokalizowane są na ramieniu długim chromosomu 7 (7q21.3–22.1) [Primo–Parmo i wsp., 1996, Mochizuki i wsp., 1998]. Najprawdopodobniej powstały one w wyniku duplikacji wspólnego ewolucyjnego prekursora genu. Świadczy o tym ich podobna budowa molekularna (w obrębie rodziny genów *PON* stwierdzono 70% podobieństwa sekwencji nukleotydów) oraz ich przyległe umiejscowienie na tym chromosomie [Primo–Parmo i wsp., 1996, Mochizuki i wsp., 1998].

#### I.1.2. Specyficzność substratowa paraoksonaz

Paraoksonazy to rodzina hydrolaz, która wykazuje aktywność względem bardzo dużej liczby substratów [Harel i wsp., 2004]. Aktywność hydrolityczną paraoksonaz w stosunku do różnych substratów można podzielić na trzy rodzaje: aktywność laktonazową (np. względem tiolaktonu homocysteiny), arylosterazową (np. względem octanu fenylu) i fosfotriesterazową (np. względem paraoksonu) [Rosenblat i wsp., 2006].

PON1 posiada wszystkie wyżej wymienione aktywności, PON2 wykazuje jedynie aktywność laktonazową [Reddy i wsp., 2001, Draganov i La Du, 2004, Draganov i wsp., 2005, Tavori i wsp., 2008]. PON3 wykazuje też aktywność laktonazową [Draganov i wsp. 2000, Reddy i wsp., 2001, Khersonsky i Tawfik, 2006]. Nie ma jak dotąd zgody na temat pozostałych dwóch aktywności tego enzymu. Według Draganova i wsp. [2000] PON3 ma śladową aktywność arylosterazową i paraoksonazową, inni badacze negują taką aktywność PON3 [Reddy i wsp., 2001, Khersonsky i Tawfik, 2006].

Aktywność fosfotriesterazowa i arylesterazowa jest ukierunkowana na związki fosforoorganiczne sztucznie wytworzone przez człowieka. Za tym przemawia odkrycie, że PON1 nie hydrolizuje naturalnego związku fosforoorganicznego, jakim jest anatoksyna-a [Draganov i La Du, 2004].

Obecnie uważa się, że jedynymi fizjologicznymi substratami paraoksonaz są laktony. Laktony to organiczne związki chemiczne, pochodne hydroksykwasów, w których grupa estrowa występuje w ugrupowaniu cyklicznym. Stanowią naturalny składnik pokarmów roślinnych i zwierzęcych. Obecne są między innymi w owocach (jagody, truskawki, orzechy kokosowe), w mięsie, nabiale, szczególnie w maśle i serze. Ponadto dodawane są do żywności jako środki zapachowe [Adams i wsp., 1998]. Powstają także w organizmie ludzkim w trakcie utleniania kwasów tłuszczowych [Khersonsky i Tawfik, 2006]. Tak więc, w przeciwieństwie do aktywności arylesterazowej i fosfotriesterazowej, tylko aktywność laktonazowa paraoksonaz ukierunkowana jest na naturalnie występujące w środowisku substraty.

Argumentem przemawiającym za tym, że naturalnymi substratami paraoksonaz są laktony, jest fakt, że wszystkie trzy paraoksonazy wykazują aktywność laktonazową. Wiadomo również, że zdolność do hydrolizy laktonów jest jedyną właściwością PON2, a to ona właśnie jest uważana za najstarszą filogenetycznie paraoksonazę. Wielokrotnie udokumentowano też, że paraoksonazy katalizują nie tylko hydrolizę laktonów, ale też reakcję odwrotną – laktonizację [Billecke i wsp., 2000, Reddy i wsp., 2001, Draganov i La Du, 2004, Draganov i wsp., 2005, Khersonsky i Tawfik, 2006, Tavori i wsp., 2008].

Ostatnio pojawia się coraz więcej dowodów, że to właśnie aktywność laktonazowa tego enzymu jest odpowiedzialna za właściwości przeciwmiażdżycowe PON1. Rosenblat i wsp. [2006] wykazali, że osłabienie aktywności laktonazowej (poprzez substytucję pary katalitycznej His115 i His134 przez glutaminę) hamuje właściwości przeciwmiażdżycowe PON1.

### I.1.3. Paraoksonaza 1 (PON1)

Białko będące produktem genu *PON1* jest wapniowo–zależnym enzymem wykazującym aktywność laktonazową, arylesterazową i fosfotriesterazową. PON1 jest produkowana w wątrobie, a następnie wydzielana do krwi, gdzie wiąże się z frakcją HDL (ang. *High Density*

*Lipoproteins*). Występuje też w innych w tkankach i narządach głównie w wątrobie, sercu i jelitach [Li, Liu i Liang, 2003, Draganov i wsp., 2005].

#### I.1.3.1. Budowa PON1

Paraoksonaza ludzka składa się z 354 aminokwasów, jej masa mieści się w przedziale 43–47 kDa. Enzym ten jest zamocowany w cząsteczce HDL za pomocą hydrofobowego N-końca, działającego jak peptyd sygnałowy [Draganov i La Du, 2004, Harel i wsp., 2004]. Białkiem stabilizującym PON1 w cząsteczce HDL jest apoA1 (apolipoproteina A1). Białko to wiąże PON1 z dużym powinowactwem i selektywnie zwiększa jej aktywność laktonazową (około 20 razy w porównaniu do wolnej PON1). Ma ono niewielki wpływ na aktywność fosfotriesterazową i arylesterazową [Rosenblat i wsp., 2006].

PON1 jest zbudowana z 6 walcowatych struktur beta-śmigłowych, każda z tych struktur składa się z 4 pasm. Połączenie między pasmami jest uzupełnione mostkiem dwusiarczkowym między Cys42 a Cys353. W kanale centralnym enzymu znajdują się 2 jony wapnia oddalone od siebie o 7,4 Å. Pierwszy z tych jonów (Ca1) nazywany jest „wapniem katalitycznym”. Ca1 jest wiązany przez atomy tlenu z łańcuchów bocznych pięciu aminokwasów (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269, Glu53). Dwa kolejne potencjalne ligandy „wapnia katalitycznego” to cząsteczka wody i atom tlenu w anionie fosforanowym. Jon Ca2 określany jest jako strukturalny, ponieważ jego dysocjacja powoduje nieodwracalną denaturację PON1 [Harel i wsp., 2004].

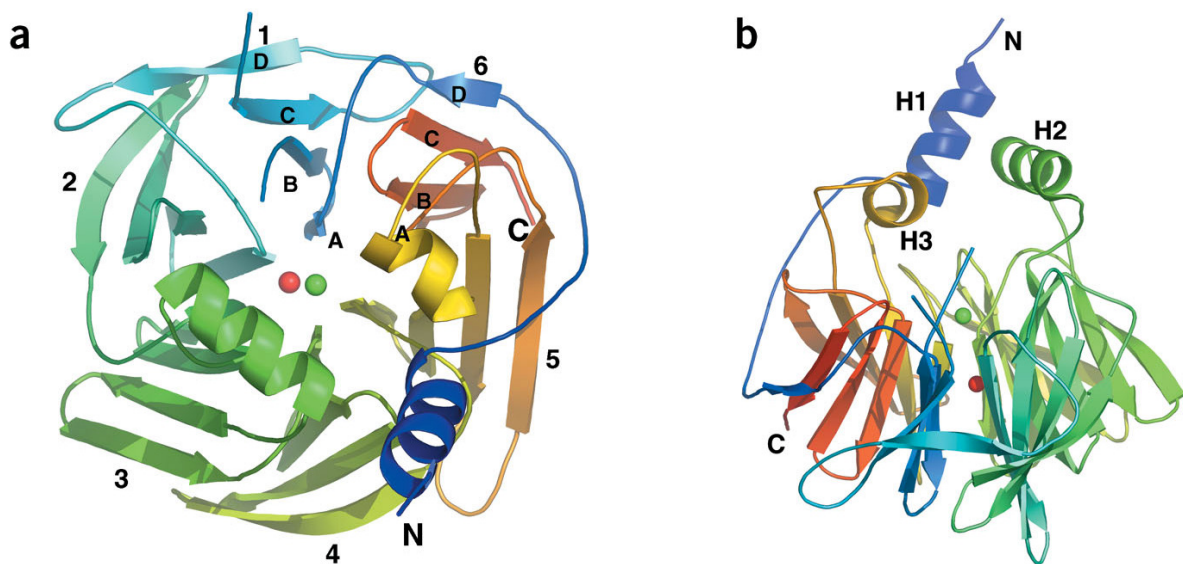
Główne elementy centrum katalitycznego tworzą wysoce stabilną strukturę. Składają się na nią łańcuchy boczne aminokwasów wiążących Ca1, aminokwasy tworzące wiązania wodorowe z poprzednimi oraz para histydyn katalitycznych (His115, His134) [Harel i wsp., 2004].

Kheronsky i Tawfik [2006] oraz Rosenblat i wsp. [2006] wykazali, że PON1 wykazuje aktywność laktonazową i arylesterazową tylko wtedy, gdy obecna jest ta para histydyn katalitycznych.

Zidentyfikowano 16 aminokwasów w pobliżu centrum katalitycznego enzymu, które poprzez swoją lokalizację wpływają na jego specyficzność substratów. Jednym z nich jest

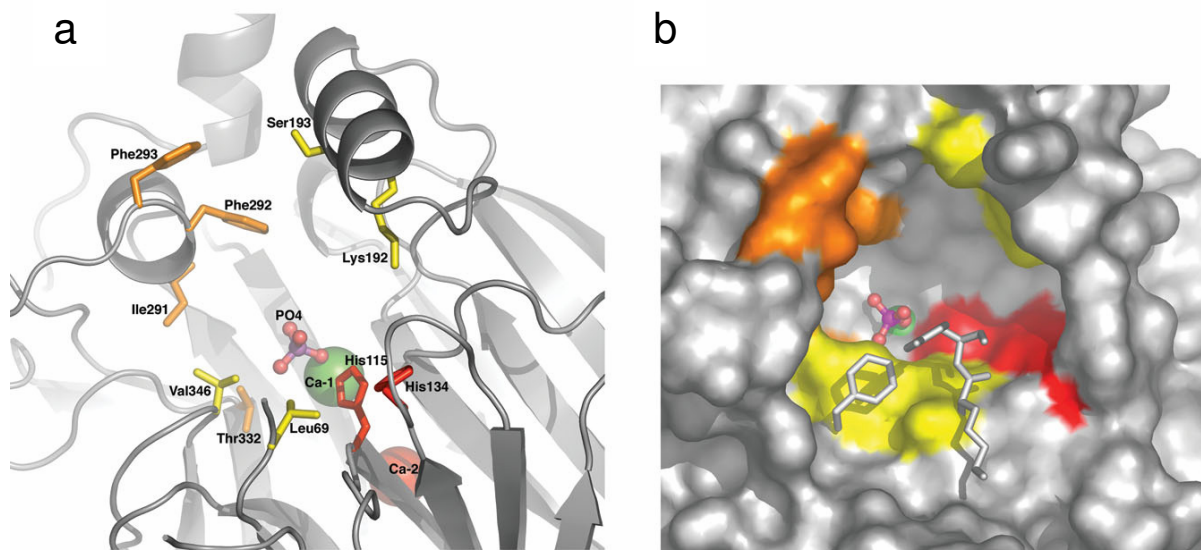
aminokwas kodowany w pozycji 192. W prezentowanym badaniu oznaczano polimorfizm, który determinuje rodzaj aminokwasu w tej pozycji. Oznaczano także polimorfizm, który determinuje rodzaj aminokwasu w pozycji 55. Aminokwas w pozycji 55 ma wpływ na strukturę kanału centralnego w cząsteczce białka PON1 [Harel i wsp., 2004, Tavori i wsp., 2008].

**Ryc. 1.** Schemat struktury trzeciorzędowej PON1; **(a)** Widok z góry na sześćoelementową strukturę beta-śmigłową. Za szczyt umownie przyjęto stronę białka, która zawiera pętlę łączące zewnętrzne beta-pasma (D) z pasmem wewnętrznym kolejnego elementu (A). Uwidoczniono N- i C-końce, oraz dwa atomy wapnia w kanale centralnym śmigła (Ca1 – na zielono; Ca2 – na czerwono); **(b)** Widok z boku na strukturę śmigła, uwidocznione położenie przestrzenne trzech struktur helikalnych na szczycie (H1, H2, H3), nie uwidoczniono pierwszych piętnastu aminokwasów N-końca i zewnętrznych pętli łączących pasma 1B i 1C (aminokwasy 72–79). (Rycina z pracy Harel M. i wsp. „Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes”. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 May; 11(5): 412–9. Zamieszczona za zgodą autorów).

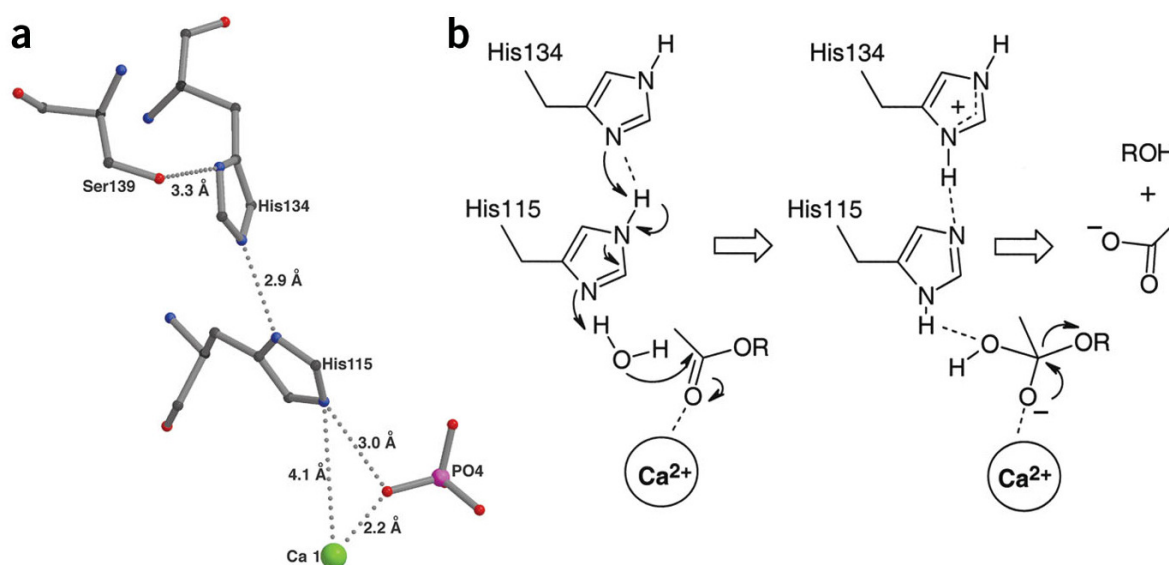




**Ryc. 2.** Schemat centrum katalicznego PON1; **(a)** Centralny kanał śmigła z widocznymi dwoma atomami wapnia; oznaczone łańcuchy boczne aminokwasów: na pomarańczowo zaznaczono aminokwasy, których mutacje odgrywają rolę w aktywności esterazowej i laktonazowej, na żółto – odgrywające rolę w aktywności fosfodiesterazowej (tu również polimorfizm R192Q, przedstawiono wariant zrekombinowanego białka PON1, w którym w pozycji 192 występuje lizyna); przypuszczalna katalityczna para histydynowa oznaczona na czerwono. **(b)** Widok powierzchni miejsca aktywnego enzymu; Lys70, Tyr71, Phe347 przedstawione schematycznie; na dnie zagłębienia leży „górny” atom wapnia (Ca1 – zaznaczony na zielono) ze związanym jonem fosforanowym. (Rycina z pracy Harel M. i wsp. „Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes”. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 May;11(5):412–9. Zamieszczona za zgodą autorów).



**Ryc. 3.** Proponowany schemat centrum katalitycznego i mechanizm działania PON1. **(a)** Centrum katalityczne zawierające „górny” atom wapnia (Ca1), jon fosforanowy oraz parę histydynową. **(b)** Proponowany mechanizmu działania PON1 na substraty estrowe: hydroliza cząsteczki wody przy udziale pary histydynowej prowadzi do wytworzenia anionu wodorotlenowego reagującego z grupą karbonylową estru, dając w efekcie przejściowy anion rozpadający się na jon octanowy i fenol lub 2-naftol. (Rycina z pracy Harel M. i wsp. „Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes”. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 May; 11(5): 412–9. Zamieszczona za zgodą autorów).



### I.1.3.2. Funkcja PON1

Główne zadania PON1 to ochrona LDL przed modyfikacją oksydacyjną oraz hydroliza związków fosforoorganicznych [Harel i wsp., 2004, Draganov i La Du, 2004].

PON1, hydrolizując nadtlenki fosfolipidowe i wodorotlenki estrów cholesterolu oraz nadtlenek wodoru, [Aviram i wsp., 1998 (a), Aviram i wsp., 2000] chroni przed modyfikacją oksydacyjną zarówno LDL, jak i HDL [Mackness, Arrol i Durrington, 1991, Aviram i wsp., 1998 (a), Rosenblat i wsp., 2006]. Enzym ten hydrolizuje także już utlenione reszty lipidowe w tych lipoproteinach [Aviram i wsp., 1998 (a)], w blaszkach miażdżycowych [Aviram i wsp., 2000] i w makrofagach [Fuhrman, Volkova i Aviram, 2002]. PON1 hamuje także syntezę cholesterolu w makrofagach [Rozenberg, Shih i Aviram, 2003] oraz stymuluje wypływ cholesterolu z tych komórek [Aviram i wsp., 1998 (a), Rosenblat i wsp., 2006]. Hydrolizuje także tiolakton homocysteiny [Jakubowski, 2000], katalizuje hydrolizę fosforoorganicznych insektycydów (parathion, diazinon, chlorpyrifos) oraz gazów bojowych (sarin, soman) [Draganov i La Du, 2004]. Ponadto bierze udział w metabolizmie leków mających budowę laktonów (spironolakton, inhibitory reduktazy hydroksymetyloglutarylo koenzymu A, HMG-CoA) [Billecke i wsp., 2000] oraz w hydrolizie czynnika aktywującego płytki krwi (PAF, ang. *platelet-activating factor*), który jest mediatorem zapalenia [Rodrigo i wsp., 2001].

### I.1.3.3. Rola PON1 w procesach patofizjologicznych

Jednym z kluczowych elementów inicjujących proces miażdżycowy jest modyfikacja oksydacyjna LDL, której konsekwencją jest powstanie cząsteczek MM-LDL (ang. *minimally modified LDL, minimally oxidized LDL*). Badania *in vitro* wskazują, że MM-LDL indukują śródbłonek do ekspresji molekuł adhezyjnych, chemokin i cytokin aktywujących monocyty. Powoduje to przechodzenie monocytów do przestrzeni podśródbłonkowej i przekształcanie się ich w makrofagi, tworzenie komórek piankowatych i inicjację procesu miażdżycowego [Shih i wsp., 2000, Fuhrman, Volkova i Aviram, 2002].

HDL mają właściwości antyoksydacyjne i przeciwmiażdżycowe. Uczestniczą w procesie redystrybucji cholesterolu w organizmie – transportują nadmiar cholesterolu z obwodowych tkanek oraz chronią LDL przed modyfikacją oksydacyjną. Właściwość hamowania

modyfikacji oksydacyjnej LDL wiąże się z aktywnością enzymatyczną białek zawartych w HDL. Do nich należy PON1, acylotransferaza lecytyno–cholesterolowa (LCAT, ang. *lecithin–cholesterol acyl transferase*) oraz acetylohydrolaza czynnika aktywującego płytki (PAFAH, ang. *platelet–activating factor actetylhydrolase*) [Aviram i wsp., 1998 (a), Harel i wsp., 2004].

Badania przeprowadzone na myszach transgenicznym pozbawionych możliwości ekspresji genu *PON1* wykazały, że zwierzęta te są znacznie bardziej podatne na proces miażdżycowy [Shih i wsp., 2000]. Natomiast badania przeprowadzone na myszach transgenicznym wykazujących nadmierną ekspresję *PON1* wykazały, że zwierzęta te mają znacznie mniej zaawansowane zmiany miażdżycowe w porównaniu do myszy z normalną ekspresją *PON1*. Ponadto HDL wyizolowane od tych myszy skuteczniej chroniły LDL przed oksydacją w porównaniu do HDL wyizolowanych od myszy z normalną ekspresją *PON1* [Tward i wsp., 2002].

Działanie przeciwmiażdżycowe PON1 może wynikać nie tylko z hamowania modyfikacji oksydacyjnej lipidów i ich gromadzenia w LDL, ale również z hydrolizy tiolaktonu homocysteiny.

Tiolakton homocysteiny to pochodna homocysteiny, która stanowi niezależny czynnik ryzyka chorób sercowo–naczyniowych u ludzi. Coraz więcej badań wskazuje, że najprawdopodobniej to nie sama homocysteina jest czynnikiem ryzyka, tylko tiolakton homocysteiny. Tiolakton homocysteiny uszkadza białka poprzez homocysteinyłację reszt lizynowych, zwiększając w ten sposób agregację LDL i potęgując aktywację makrofagów [Jakubowski, 2000, Billecke i wsp., 2000].

Tiolakton homocysteiny jest hydrolizowany w surowicy ludzkiej jedynie przez PON1. Ta reakcja prowadzi do zahamowania procesu homocysteinyłacji [Jakubowski, 2000].

PON1 jest także jednym z dwóch systemów ochrony przed truciznami fosforoorganicznymi u ssaków. Enzym ten katalizuje hydrolizę związków fosforoorganicznych do mniej szkodliwych produktów, które są następnie wydalane z organizmu. Drugi system stanowi butyrylocholinesteraza (BuChE), która wychwytuje związki fosforoorganiczne z tkanki

nerwowej i wiążąc je, uniemożliwia w ten sposób hamowanie cholinesterazy. BuChE ulega w tym procesie inaktywacji [Haley, Billecke i La Du, 1999].

PON1 bierze udział w metabolizmie leków posiadających w swojej budowie elementy laktonu. W ten sposób PON1 ma najprawdopodobniej znaczenie w aktywacji proleków do aktywnych substancji (statyny, spironolakton) oraz w unikaniu niepożądanych efektów ogólnoustrojowych leków stosowanych zewnętrznie (glikokortykosteroidy) [Billecke i wsp., 2000].

Ze względu na potencjalną zdolność do hydrolizy mediatora stanu zapalnego, jakim jest PAF, PON1 może wywierać także działanie przeciwzapalne [Rodrigo i wsp., 2001].

#### I.1.3.4. Czynniki wpływające na aktywność PON1

Aktywność PON1 jest zależna od czynników genetycznych oraz środowiskowych. Zidentyfikowano ponad 200 polimorfizmów genu *PON1* [Draganov i La Du, 2004]. Dwa polimorfizmy miejsca kodującego tego genu będące przyczyną substytucji aminokwasów w pozycjach 192 i 55: Gln192Arg (Q192R rs662) i Leu55Met (L55M rs854560). W pierwszym przypadku obecność glutaminy w pozycji 192 warunkuje fenotyp Q, obecność arginy determinuje fenotyp R. Te dwa alloenzymy różnią się powinowactwem i katalityczną aktywnością w stosunku do licznych substratów PON1. Niektóre substraty, takie jak paraokson, są hydrolizowane szybciej przez alloenzym R, podczas gdy inne, np. octan fenylu, sarin, soman czy  $\gamma$ -butyrolakton są szybciej hydrolizowane przez alloenzym Q [Aviram i wsp., 1998 (b), Draganov i La Du, 2004]. Polimorfizm w pozycji 192 wpływa także na właściwości przeciwmiażdżycowe PON1. Obecność allelu Q wiąże się z większą zdolnością do ochrony przed oksydacją [Aviram i wsp., 1998 (b), Aviram i wsp., 2000]. Miejsce aminokwasowe w pozycji 192 stanowi część centrum aktywnego oraz elementu kotwiczącego PON1 w cząsteczce HDL, stąd wpływ polimorfizmu Q192R na specyficzność substratową tego enzymu [Harel i wsp., 2004, Gaidukov i wsp., 2006].

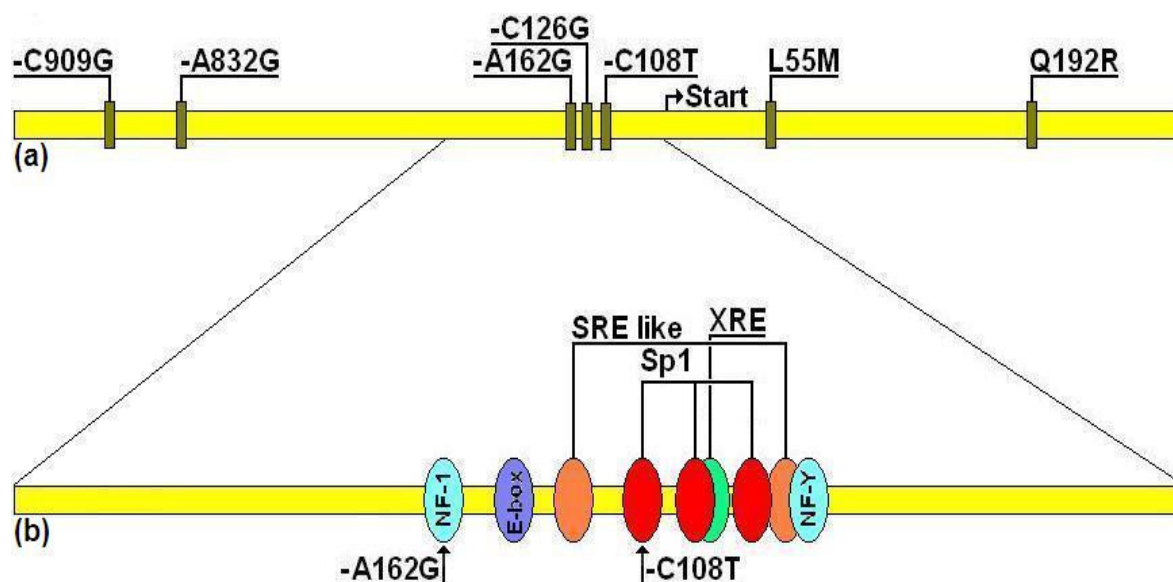
Polimorfizm genu *PON1*, wynikający z substytucji w pozycji 55 leucyny na metioninę, wpływa także na aktywność i stężenie PON1 [Garin i wsp., 1997]. Obecność leucyny w pozycji 55 jest związana ze zwiększeniem aktywności enzymu w porównaniu z izoformą M55 [Draganov i La Du, 2004, Deakin i James, 2004].

Aktywność paraoksonazowa jest największa u osób z fenotypami PON1 192RR i PON1 55LL, a najmniejsza u osób z fenotypami PON1 192QQ i PON1 55MM. Natomiast zdolność do ochrony LDL przed oksydacją jest największa u osób z fenotypem PON1 192QQ i PON1 55MM [Li, Liu i Liang, 2003].

Obok polimorfizmów miejsca kodującego znane są polimorfizmy genu *PON1* w miejscu regulatorowym: -C108T, -C126G, -A162G (rs705381), -A832G i -C909G, które w różnym stopniu mogą wpływać na aktywność i stężenie PON1 [Brophy i wsp., 2001 (a)].

Aktualnie uważa się, że największy wpływ na poziom aktywności PON1 względem octanu fenylu wywiera polimorfizm -C108T, -A162G ma mniejszy wpływ, natomiast -C126G, -A832G i -C909G znikomy [Brophy i wsp., 2001 (b)]. Obecność alleli -108C i -162A zwiększa ekspresję PON1 [Brophy i wsp., 2001 (b)]. Badania miejsca regulatorowego genu *PON1* przy użyciu sekwencji promotorowych różnej długości wykazały, że obszar promotorowy obejmujący miejsce -108 i -162 jest wystarczający do transkrypcji genu *PON1* [Brophy i wsp., 2001 (b)]. Region zawierający miejsce -162 stanowi obszar przyłączania się czynnika transkrypcyjnego NF-1 (ang. *nuclear factor-1*), obecność allelu -162A warunkuje powstanie miejsca wiążącego NF-1, obecność allelu G zakłóca wiązanie NF-1 [Brophy i wsp., 2001 (a)].

**Ryc. 4.** Schemat regionu promotorowego i kodującego genu *PON1*. **(a)** Lokalizacja niektórych polimorfizmów; **(b)** Powiększenie fragmentu promotorowego genu (ok. 200 bp); zaznaczono położenie polimorfizmów -A162G oraz -C108T oraz miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych: NF-1 (ang. *nuclear factor-1*), NF-Y (ang. *nuclear factor-Y*) oraz Sp1; SRE, ang. *sterol regulatory element*; XRE, ang. *xenobiotic responsive element*. Na podstawie: Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci (Lond)*. 2004 Nov;107(5):435-47. Review. (Fig. 1.), modyfikacja własna.



Poziom aktywności PON1 jest zależny także od czynników środowiskowych takich jak: dieta, stosowane używki, zażywane leki, toksyczne czynniki chemiczne i in. [Draganov i La Du, 2004, Deakin i James, 2004].

Aktywność PON1 wzrasta od urodzenia do około 15–25 miesiąca życia, osiąga *plateau* w okresie dojrzałości, następnie zmniejsza się wraz z upływem lat [Li, Liu i Liang, 2003]. Zmniejszanie się aktywności PON1 wraz z wiekiem może tłumaczyć zwiększona wrażliwość HDL na modyfikację oksydacyjną u starszych osób [Deakin i James, 2004]. Znaczenie ma także polimorfizm genu *PON1* w pozycji 192, homozygoty QQ wykazują silniejszy spadek aktywności paraoksonazy w miarę starzenia się [Sentí i wsp., 2001]. Aktywność PON1 w surowicy jest zmniejszona także w okresie ciąży i menopauzy [Li, Liu i Liang, 2003].

Obniżona aktywność PON1 występuje w cukrzycy [Abbott i wsp., 1995], chorobach nerek [Dantoine i wsp., 1998, Hasselwander i wsp., 1998], hipercholesterolemii [Tomás i wsp., 2000], chorobie niedokrwiennej serca [Sentí i wsp., 2001, Mackness i wsp., 2001] i przewlekłych chorobach wątroby (marskość wątroby, zapalenie wątroby) [Ferre i wsp., 2002]. Obniżenie aktywności PON1 w cukrzycy zarówno typu 1 jak i 2, prawdopodobnie jest związane z wysokim poziomem glukozy we krwi i procesem glikozylacji, który może inaktywować PON1. Może być też wynikiem nieprawidłowego składu cząsteczek HDL występujących u osób chorych na cukrzycę, co może upośledzać wiązanie PON1 z HDL [Abbott i wsp., 1995]. W przewlekłych chorobach nerek za niski poziom aktywności PON1 może odpowiadać zmniejszone stężenie HDL. Sugeruje się również, że wysokie wartości mocznika mogą także hamować aktywność PON1 [Hasselwander i wsp., 1998]. Zmniejszona aktywność PON1 w chorobach wątroby może wynikać z ograniczenia syntezy tego białka lub być efektem zmienionego wytwarzania lub wydzielania HDL [Ferre i wsp., 2002].

Do zmniejszenia zawartości PON1 w cząsteczkach HDL dochodzi także w stanie zapalnym [Van Lenten i wsp., 1995]. Endotoksyny indukujące zapalenie oraz mediatory stanu zapalnego takie jak, czynnik martwicy nowotworu (TNF, ang. *tumor necrosis factor*) i interleukina 1 (IL-1, ang. *interleukin-1*) obniżają aktywność PON1 w surowicy oraz indukują spadek mRNA *PON1* w wątrobie [Feingold i wsp., 1998].

Wpływ diety na aktywność PON1 badano u zwierząt oraz ludzi. U myszy stwierdzono spadek aktywności PON1 we krwi po zastosowaniu diety bogatotłuszczowej [Forte i wsp., 2002,



Hedrick i wsp., 2000]. Spożywanie oliwy z oliwek wiązało się ze zwiększeniem aktywności PON1 w populacji kobiet z cukrzycą typu 2 [Wallace i wsp., 2001]. Badania Sutherlanda i wsp. [1999] potwierdziły, że aktywność PON1 zmienia się w zależności od rodzaju spożytego posiłku. Dwie godziny po zjedzeniu posiłku o wysokiej zawartości utlenionych tłuszczów (tłuszcz wielokrotnie użyty do smażenia) aktywność PON1 obniżyła się, niski poziom aktywności utrzymywał się przez kolejne osiem godzin i powrócił do stanu wyjściowego dwanaście godzin później. Natomiast dwie godziny po spożyciu posiłku zawierającego tłuszcz niewykorzystany do smażenia, zaobserwowano wzrost aktywności PON1 w surowicy, który utrzymywał się do ośmiu godzin. Autorzy badania tłumaczą zaobserwowane zmiany jako konsekwencję odmiennego wpływu, jaki wywierają tłuszcze nasycone i nienasycone na zawartość apoA1 w HDL oraz na same cząsteczki HDL [Sutherland i wsp., 1999]. Spożywanie antyoksydantów, takich jak witamina C czy E zwiększa aktywność PON1 [Jarvik i wsp., 2002].

Badania dotyczące wpływu leków obniżających poziom cholesterolu na aktywność PON1 przyniosły rozbieżne wyniki. Balogh i wsp. [2001] oraz Paragh i wsp. [2003] w badaniach przeprowadzonych wśród chorych z hiperlipidemią, cukrzycą i chorobą niedokrwienną serca wykazali wzrost aktywności PON1 w trakcie leczenia gemfibrozilem i fenofibratem. Gouédard i wsp. [2003] w badaniach na ludzkiej linii komórkowej HuH7 wykazali, że fibraty zwiększają poziom ekspresji mRNA PON1 i aktywność PON1, ponadto wpływają na aktywność promotora genu *PON1*. Natomiast Durrington i wsp. [1998] nie wykazał wpływu gemfibrozilu i bezafibratu na aktywność PON1. Podobnie, rozbieżne wyniki uzyskano w badaniach dotyczących wpływu statyn na aktywność PON1. Tomás i wsp. [2000] oraz Deakin i wsp. [2003] stwierdzili wzrost aktywności PON1 w surowicy u osób z rodzinną hipercholesterolemią oraz osób z hipercholesterolemią i chorobą niedokrwienną serca w trakcie leczenia simwastatyną. Natomiast badania przeprowadzone z atorwastatyną na grupie pacjentów z dyslipidemią typu IIA i IIB przez Tsimihodimos i wsp. [2002] nie wykazały takiego wpływu na aktywność PON1 w surowicy. Gouédard i wsp. [2003] stwierdzili spadek aktywności PON1 i obniżenie poziomu mRNA PON1 oraz aktywności promotora genu *PON1* pod wpływem statyn. Autorzy wiązali ten wynik z hamowaniem przez statyny aktywności reduktazy HMG-CoA, czego konsekwencją jest mniejsza produkcja zmodyfikowanych oksydacyjnie LDL.

Spośród używek badano wpływ palenia papierosów i spożywania alkoholu na aktywność PON1. Nishio i Watanabe [1997] wykazali, że wyciąg z dymu papierosowego hamuje aktywność PON1 w surowicy ludzkiej. Palenie papierosów obniża poziom i aktywność PON1 najprawdopodobniej wskutek modyfikacji wolnych grup tiolowych enzymu [Nishio i Watanabe, 1997]. W badaniach przeprowadzonych przez James, Leviev i Righetti [2000] wśród pacjentów z chorobą niedokrwienną serca wykazano, że stężenie i aktywność PON1 były obniżone w grupie palących w porównaniu do grupy niepalących. Byli palacze mieli poziom aktywności i stężenia PON1 porównywalny do grupy niepalących.

Spożywanie alkoholu w stopniu umiarkowanym powoduje wzrost aktywności PON1, najprawdopodobniej poprzez zwiększenie stężenia frakcji HDL i apoA1 w osoczu [van der Gaag i wsp., 1999]. Natomiast u osób uzależnionych od alkoholu aktywność enzymu w surowicy zmniejsza się w porównaniu z osobami niepijącymi. Spożywanie dużych ilości alkoholu przez długi okres hamuje ekspresję genu i aktywność enzymatyczną PON1 niezależnie od polimorfizmu [Costa i wsp., 2005].

#### I.1.4. Paraoksonaza 2 (PON2)

Białko będące produktem genu *PON2*, podobnie do białka PON1, posiada reszty cysteinowe i mostki dwusiarczkowe, reszty histydynowe oraz potencjalne odpowiedniki struktur wiążących jony wapnia jak w PON1 [Mochizuki i wsp., 1998].

PON2 mRNA jest wykrywane niemal w każdej tkance ludzkiej, szczególnie w wątrobie, mózgu i sercu [Mochizuki i wsp., 1998]. PON2 ulega także ekspresji w makrofagach jako jedyny przedstawiciel rodziny PON [Rosenblat i wsp., 2003]. PON2 nie występuje w surowicy, nie wiąże się z lipoproteinami, pozostaje wewnątrzkomórkowo związana z błoną komórkową [Ng i wsp., 2001, Ng i wsp., 2006]. PON2 ma właściwości antyoksydacyjne podobnie jak PON1 i PON3, ale swój wpływ wywiera na poziomie komórkowym [Ng i wsp., 2001].

Badania przeprowadzone na ludzkiej linii komórkowej HeLa, wykazującej nadmierną ekspresję *PON2* wykazały, że PON2 zapobiega modyfikacji oksydacyjnej LDL, a także hydrolizuje już utlenione reszty lipidowe [Ng i wsp., 2001]. Natomiast badanie na myszach transgenicznym pozbawionych możliwości ekspresji *PON2* wykazało znacznie bardziej

zaawansowane zmiany miażdżycowe u tych myszy w porównaniu do myszy z normalną ekspresją *PON2* [Ng i wsp., 2006]. *PON2* zmniejsza nasilenie reakcji stresu oksydacyjnego, hamuje wytwarzanie przez monocyty substancji chemotaktycznych i ich przekształcanie się w makrofagi oraz rozwój miażdżycy [Ng i wsp., 2001, Ng i wsp., 2006].

W miejscu kodującym genu *PON2* zidentyfikowano dwa miejsca polimorficzne odpowiedzialne za substytucję aminokwasów w pozycjach 148 i 311: Ala148Gly (A148G) i Cys311Ser (C311S rs6954345) [Mochizuki i wsp., 1998].

Mochizuki i wsp. [1998] wysunęli hipotezę, że wprowadzenie dodatkowej reszty cysteinowej w polimorfizmie 311 może wpływać na strukturę i funkcję białka *PON2*. Martinelli i wsp. [2004] wykazali, że obecność allelu C polimorfizmu C311S genu *PON2* wiąże się ze zwiększonym poziomem w surowicy dialdehydu malonowego, uważanego za marker peroksydacji lipidów. Autorzy ci wykazali także, że wśród osób palących papierosy ryzyko wystąpienia zawału mięśnia sercowego wiązało się z polimorfizmem C311S genu *PON2*. Homozygoty CC miały pięciokrotnie zwiększone ryzyko zachorowania w porównaniu do homozygot SS tego polimorfizmu. Osoby palące papierosy miały zwiększone ryzyko wystąpienia zawału serca, jeżeli były nosicielami przynajmniej jednego allelu C.

Wielokrotnie wykazywano związek tych polimorfizmów z chorobami układu sercowo–naczyniowego [Martinelli i wsp., 2004, Su i wsp., 2005], cukrzycą typu 2 [Hegele i wsp., 1997], chorobą Alzheimera [Shi i wsp., 2004] oraz takimi stanami jak hiperglikemia [Hegele i wsp., 1997] i hiperlipidemia [Hegele i wsp., 1998].

#### I.1.5. Paraoksonaza 3 (PON3)

*PON3* jest białkiem o masie 40 kDa, syntetyzowanym w wątrobie. Uważa się, że *PON3* jest wydzielana do krwi gdzie wiąże się z frakcją HDL lipoprotein [Reddy i wsp., 2001, Rosenblat i wsp., 2003]. Istnieją także hipotezy mówiące, że *PON3* działa głównie wewnątrzkomórkowo i nie jest fizjologicznie wydzielana do krwi, natomiast jej obecność w surowicy jest konsekwencją procesów patologicznych [Draganov, 2007].

Dotychczasowe badania na liniach komórkowych HepG2, HAECs, HeLa oraz na myszach transgenicznym wskazują, że *PON3* ma działanie antyoksydacyjne i przeciwmiażdżycowe,

hamuje oksydacyjną modyfikację LDL oraz zależną od MM-LDL aktywację monocytów [Draganov i wsp., 2000, Reddy i wsp., 2001, Shih i wsp., 2007]. Shih i wsp. [2007] wykazali, że zwiększona ekspresja ludzkiej *PON3* u myszy transgenicznych znacząco zmniejsza nasilenie procesu tworzenia blaszek miażdżycowych i redukuje otyłość, ale tylko u osobników płci męskiej. Draganov i wsp. [2000] w badaniu na linii komórkowej ssaków 293T/17 wykazali, że *PON3* jest bardziej efektywna niż *PON1* w ochronie LDL przed modyfikacją oksydacyjną sztucznie indukowaną jonami miedzi. Niektóre polimorfizmy genu *PON3* (A10340C, A2115T) modyfikują poziom aktywności *PON1* w surowicy [Sanghera i wsp., 2008].

## I.2. Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny to stan, w którym dochodzi do zachwiania równowagi pomiędzy tempem produkcji wolnych rodników a ich usuwaniem przez ustrojowe systemy antyoksydacyjne [Fisher–Wellman i Bloomer, 2009]. Każdy atom lub cząsteczka, zdolne do samodzielnego istnienia, posiadające jeden lub więcej niesparowanych elektronów na zewnętrznej powłoce określany jest jako wolny rodnik [Gendźwił, 2007]. W organizmach żywych główną grupę wolnych rodników stanowią te pochodzące z tlenu lub azotu. Wolne rodniki oraz substancje nie-wolnorodnikowe, które powstały w wyniku reakcji z wolnymi rodnikami nazywane są reaktywnymi formami tlenu (pol. RFT, ang. ROS, *reactive oxygen species*) lub odpowiednio reaktywnymi formami azotu (RNS, ang. *reactive nitrogen species*) [Fisher–Wellman i Bloomer, 2009]. Źródłem RFT jest naturalne środowisko życia (promieniowanie widzialne, ultrafioletowe, gamma; obecność ozonu) oraz fizjologiczne procesy wewnątrzkomórkowe takie jak: aktywacja fagocytów, reakcje łańcucha oddechowego, metabolizm nukleotydów purynowych, mikrosomalny cykl hydroksylacyjny (cytochrom P-450), reakcje zachodzące z udziałem oksydoreduktaz [Rutkowski i wsp., 2007, Łuszczewski i wsp., 2007]. Natomiast nadmierna produkcja RFT jest związana między innymi z rodzajem i ilością spożywanej żywności, paleniem papierosów, wysiłkiem fizycznym [Gracy i wsp., 1999, Fisher–Wellman i Bloomer, 2009]. Niskie stężenia RFT są niezbędne dla prawidłowego przebiegu sygnalizacji międzykomórkowej oraz zapewniają prawidłowe funkcjonowanie komórek, natomiast RFT w wysokich stężeniach są włączone w patogenezę wielu schorzeń [Gendźwił, 2007, Fisher–Wellman i Bloomer, 2009]. Szkodliwe działanie RFT wiąże się bowiem z modyfikacją kwasów nukleinowych, białek i lipidów, co może prowadzić do uszkodzenia organelli komórkowych i śmierci komórki [Gracy i wsp., 1999]. Stan równowagi komórek jest utrzymywany przez związki antyoksydacyjne, które umożliwiają usuwanie nadmiaru RFT z komórki.

### I.2.1. Antyoksydanty

Do antyoksydantów nieenzymatycznych zaliczamy: glutation (GSH), witaminę E, witaminę C, albuminy, bilirubinę, kwas moczowy, kreatyninę, cysteinę, karotenoidy, flawonoidy, koenzym Q (zredukowany). Do antyoksydantów enzymatycznych: dysmutazę nadtlenkową zależną od jonów miedzi i cynku (CuZnSOD) i manganu (MnSOD), peroksydazę

glutationową (GPx), katalazę, ceruloplazminę, białka hemowe, tioredoksynę (TRX) i paraoksonazę (PON1) [Łuszczewski i wsp., 2007].

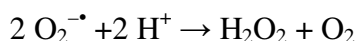
Antyoksydanty można także podzielić na endogenne (np. bilirubina, kwas moczowy, SOD, PON, peroksydaza glutationowa itd.) i egzogenne (np. karotenoidy, witamina E, witamina C, flawonoidy itd.). Źródłem antyoksydantów egzogennych jest spożywany pokarm, głównie owoce i warzywa [Fisher–Wellman i Bloomer, 2009].

Można wyróżnić trzy podstawowe systemy obrony organizmu przed RFT [Łuszczewski i wsp., 2007]:

- pierwsza linia obrony – zapobieganie powstawaniu rodnika wodorotlenowego;
- druga linia obrony – skierowanie reakcji wolnorodnikowych na tor terminacji;
- trzecia linia obrony – naprawa uszkodzeń już powstałych w wyniku działania RFT.

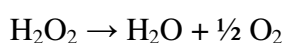
Wśród antyoksydantów enzymatycznych pierwszej linii obrony największe znaczenie ma dysmutaza nadtlenkowa, która katalizuje reakcję przekształcenia anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru i tlenu cząsteczkowego.

### **Reakcja 1.**



Nadtlenek wodoru, silny utleniacz, który łatwo przechodzi przez błony komórkowe i działa toksycznie na komórki jest następnie neutralizowany przez dwa równie ważne enzymy antyoksydacyjne – katalazę i peroksydazę glutationową. Końcowym produktem obu enzymów jest woda, a w przypadku katalazy również cząsteczka tlenu [Gendźwiłł, 2007, Łuszczewski i wsp., 2007].

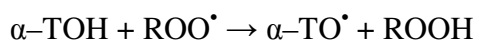
### **Reakcja 2.**



Do antyoksydantów drugiej linii obrony należą m.in. witamina C i E. Antyoksydanty te konkurują z innymi związkami chemicznymi, które mogłyby zostać utlenione przez RFT (np.  $\text{O}_2^{\cdot -}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HOCl}$ ). W wyniku reakcji RFT z antyoksydantem powstaje wolny rodnik, który jest znacznie mniej reaktywny niż rodnik, który powstałby np. w wyniku modyfikacji

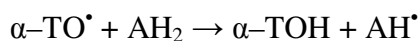
oksydacyjnej lipidów. Następuje wtedy przerwanie łańcuchowej reakcji wolnorodnikowej i zahamowanie peroksydacji kolejnych związków biologicznie czynnych [Łuszczewski i wsp., 2007].

### **Reakcja 3.**



Produkt utlenienia – rodnik  $\alpha$ -tokoferolowy ( $\alpha\text{-TO}^\bullet$ ) – dzięki reakcji z kwasem askorbinowym może zostać następnie zredukowany znowu do witaminy E [Łuszczewski i wsp., 2007].

### **Reakcja 4.**



Trzecią linię obrony przed RFT stanowią enzymy naprawcze. Do tej linii obrony należą enzymy antyoksydacyjne o aktywności oksydoreduktaz, które potrafią zredukować produkty modyfikacji oksydacyjnej lipidów (paraoksonaza) lub mostki disulfidowe powstałe w wyniku peroksydacji DNA (tiodoksyna, peroksydaza glutationowa) [Łuszczewski i wsp., 2007].

## **I.2.2. Markery stresu oksydacyjnego**

Za markery peroksydacji lipidów uważa się dialdehyd malonowy (MDA, ang. *malonyldialdehyde*), 4-hydroksynonenal (HNE, ang. *4-hydroxynonenal*) oraz izoprostany (iPs). W celu oceny nasilenia procesu utlenienia lipidów oznacza się także w surowicy przeciwciała przeciw oksydacyjnie zmodyfikowanym LDL (Ab oxLDL). Uszkodzenia białek spowodowane przez RFT wykrywane są poprzez oznaczenie zawartości grup karbonylowych w tych cząsteczkach. Za wskaźnik uszkodzenia DNA uznaje się 8-hydrokso-2'-deoksyguanozynę (8-OH2'dG) [Zarkovic, 2003, Flirski i Sobów, 2003, Tokarz, Jelińska i Ozga, 2004, Łuszczewski i wsp., 2007]. Markerem stresu oksydacyjnego zależnym od rodników azotowych jest natomiast 3-nitrotyrozyna [Flirski i Sobów, 2003, Kowalczyk i wsp., 2006].

Do chorób i stanów, w których stres oksydacyjny odgrywa kluczową rolę, zalicza się m.in.: choroby układu sercowo-naczyniowego (miażdżycę, nadciśnienie tętnicze, chorobę

niedokrwienią serca), cukrzycę, otyłość, dnę moczanową, udar mózgu, choroby neurodegeneracyjne (chorobę Parkinsona, chorobę Alzheimera, stwardnienie boczne zanikowe, ataksję Friedreicha, zapalne choroby stawów (reumatoidalne zapalenie stawów), toczeń trzewny układowy, choroby płuc (astma, POChP), nowotwory, zapalenie, posocznicę oraz proces starzenia się [Gendźwił, 2007, Łuszczewski i wsp., 2007, Rutkowski i wsp., 2007, Kell, 2009].



### I.3. Neurodegeneracja

Choroby zwyrodnieniowe (neurodegeneracyjne) to grupa wrodzonych lub nabytych postępujących chorób układu nerwowego, w których podstawowym zjawiskiem patologicznym jest utrata komórek nerwowych [Martin, 1999]. Tradycyjnie są definiowane jako grupa chorób ośrodkowego układu nerwowego, dla których nie został zidentyfikowany żaden czynnik przyczynowy [Bradley i wsp., 2006]. Obserwowany obecnie wzrost częstości występowania takich schorzeń wydaje się być w dużej mierze związany ze starzeniem się populacji ludzkiej [Mattson, 2003].

Neurodegeneracja jest procesem postępującym i nieodwracalnym. W przebiegu tego procesu dochodzi do nieprawidłowej agregacji białek, zaburzenia prawidłowego działania mitochondriów, nasilenia reakcji stresu oksydacyjnego; znaczenie ma także narażenie na toksyny środowiskowe takie jak pestycydy i metale [Mattson, 2003].

Wśród chorób neurodegeneracyjnych wyróżnia się jednostki o znanym podłożu genetycznym na przykład choroba Huntingtona, choroby prionowe (kuru, choroba Creutzfelda–Jakoba), choroby prawdopodobnie spowodowane wpływem środowiska (stwardnienie boczne zanikowe w kompleksie z parkinsonizmem i otępieniem, tzw. wariant z Guam) oraz choroby o niepoznanej etiologii (sporadyczne przypadki choroby Parkinsona, Alzheimerera oraz stwardnienia bocznego zanikowego, postępującego porażenia nadjądrowego, zaniku wieloukładowego) [Martin, 1999].

#### I.4. Stwardnienie boczne zanikowe

Stwardnienie boczne zanikowe (łac. *sclerosis lateralis amyotrophica* – SLA, ang. *amyotrophic lateral sclerosis* – ALS) jest chorobą zwyrodnieniową ośrodkowego układu nerwowego, prowadzącą do uszkodzenia neuronów ruchowych kory mózgowej, pnia mózgu i rdzenia kręgowego, cechującą się występowaniem objawów uszkodzenia górnego i dolnego neuronu ruchowego [Wijesekera i Leigh, 2009]. Według najnowszych koncepcji [Wijesekera i Leigh, 2009] uszkodzenie neuronów ruchowych jest pierwszą, najwcześniejszą fazą choroby. Dodatkowo w trakcie jej trwania dochodzi także do uszkodzenia strukturczołowo–skroniowych, hipokampa, wzgórza, istoty czarnej, dróg rdzeniowo–mózdkowych, sznurów tylnych oraz obwodowych nerwów czuciowych [Wijesekera i Leigh, 2009].

SLA występuje rzadko, zapadalność określa się na poziomie 1,5–2,7 przypadków na 100 000 osób na rok w krajach Europy i Ameryki Północnej [Wijesekera i Leigh, 2009]. Średni wiek zachorowania mieści się w przedziale od 55 do 65 roku życia, nieco częściej chorują mężczyźni niż kobiety (ok. 1,5:1) [Wijesekera i Leigh, 2009]. Mniej niż 5% wszystkich przypadków SLA rozwija się u osób poniżej 30 roku życia [Wijesekera i Leigh, 2009].

Choroba ta stopniowo ogranicza możliwość samodzielnego poruszania się poprzez narastający niedowład kończyn i tułowia. Pojawiają się także zaburzenia komunikacji z otoczeniem wskutek zaburzeń mowy (dyszartria) oraz niedożywienie ze względu na narastające zaburzenia połykania (dysfagia) [Adamek i Tomik, 2005, str. 11]. Kontrola zwieraczy oraz ruchy gałek ocznych zostają zachowane [Adamek i Tomik, 2005, str.14]. SLA jest chorobą postępującą, nieuchronnie prowadzi do śmierci, najczęściej wskutek narastającej niewydolności oddechowej, w ciągu średnio 2–4 lat od wystąpienia pierwszych objawów chorobowych [Adamek i Tomik, 2005, str. 11 i 13].

SLA rozpoznaje się w oparciu o obraz kliniczny, badanie elektromiograficzne, histopatologiczne, pomocnicze badania laboratoryjne i obrazowe (kryteria El Escorial – WFN 1998) [Brooks i wsp., 2000]. W badaniu histopatologicznym poszukuje się obecności zwyrodniałych neuronów ruchowych dających początek drodze korowo–rdzeniowej oraz tych znajdujących się w pniu mózgu i rdzeniu kręgowym [Strong, 2003, Strong, Kesavapany i Pant, 2005]. Neuropatologiczną oznaką SLA jest obecność wewnątrzneuronalnych agregatów, takich jak: ciała Buniny, agregaty złożone z ufosforylozowanych i

nieufosforylozowanych neurofilamentów oraz wtręty z dodatnim odczynem immunohistochemicznym na ubikwitynę [Wijesekera i Leigh, 2009]. SLA w większości przypadków występuje sporadycznie, 5–10% to przypadki rodzinne [Strong, 2003].

#### I.4.1. Sporadyczna postać stwardnienia bocznego zanikowego.

Obraz klasycznego (najczęstszego) fenotypu sporadycznej postaci SLA obejmuje występowanie objawów ze strony zarówno górnego, jak i dolnego neuronu ruchowego. U chorego jednocześnie występują objawy uszkodzenia górnego neuronu ruchowego: spastyczne napięcie, niedowład z wygórowaniem odruchów głębokich, obecność objawu Babińskiego, klonusy, zespół rzekomoopuszkowy, jak i dolnego neuronu ruchowego: zanik mięśni, niedowład z obniżonym napięciem mięśniowym, fascykulacje, osłabienie odruchów głębokich, zespół opuszkowy [Brooks i wsp., 2000].

Przez zespół opuszkowy rozumie się zespół objawów wynikających z uszkodzenia jąder ruchowych i nerwów czaszkowych V, VII, IX, X, XI i XII pnia mózgu, takich jak: dyzartria, dysfagia, zniesienie odruchu żuchwowego, zanik mięśni policzków, zniesienie odruchów podniebieno–gardłowych oraz zanik, fascykulacje i niedowład mięśni języka [Adamek i Tomik, 2005, str. 12].

Zespół rzekomoopuszkowy, który jest konsekwencją uszkodzenia dróg korowo–jądrowych, cechuje się obecnością następujących objawów: dyzartrii, dysfagii, labilności emocjonalnej, wygórowaniem odruchu żuchwowego i odruchów podniebieno–gardłowych, spastycznym niedowładem mięśni języka [Adamek i Tomik, 2005, str. 12].

Klasyfikacja kliniczna SLA wyróżnia dwie początkowe postaci choroby: postać z początkowymi objawami zlokalizowanymi w kończynach (postać kończynowa; ang. *limb onset*), która stanowi 75% przypadków SLA oraz postać z początkowymi zaburzeniami mowy, połykania (postać opuszkowa; ang. *bulbar onset*), która stanowi 25% przypadków SLA [Wijesekera i Leigh, 2009].

Inne rzadkie fenotypy tej postaci SLA to postępujące porażenie opuszkowe (ang. *progressive bulbar palsy, PBP*), pierwotne stwardnienie boczne (ang. *primary lateral sclerosis, PLS*), postępujący zanik mięśni (ang. *progressive muscular atrophy, PMA*), zespół ramienia

cepowatego (ang. *flail arm*, zespół Vulpiana–Bernhardta), zespół nogi cepowatej (ang. *flail leg*, postać pseudopolineuropatyczna) oraz SLA w kompleksie z innymi objawami (np. SLA w kompleksie z otępieniem) [Adamek i Tomik, 2005, str. 16-18, Wijesekera i Leigh, 2009]. Przebieg SLA różni się w zależności od postaci klinicznej. W postępującym porażeniu opuszkowym występują objawy opuszkowo–rzekomoopuszkowe. Ten zespół, izolowany niekiedy przez kilka lat, może być początkiem pełnoobjawowego SLA. Postępujące porażenie opuszkowe jest postacią o najgorszym rokowaniu, w której okres przeżycia wynosi najczęściej poniżej trzech lat. W pierwotnym stwardnieniu bocznym występują cechy uszkodzenia tylko górnego neuronu ruchowego, najczęściej jest to powoli narastająca parapareza spastyczna z wygórowaniem odruchów i objawem Babińskiego. W postaci tej, stanowiącej około 5% SLA, progresja jest bardzo powolna, wieloletnia. Dolny motoneuron, z wiotkim niedowładem kończyn, osłabieniem odruchów głębokich, zanikami mięśni i fasykulacjami zajęty jest w postępującym zaniku mięśni. W postępującym zaniku mięśni zwykle nie ma objawów uszkodzenia na poziomie opuszki. W tej postaci choroby (ok. 10% SLA) przeżycia są długie, do 30–40 lat [Adamek i Tomik, 2005, str. 16-18, Wijesekera i Leigh, 2009]. Zespół ramienia cepowatego i nogi cepowatej cechuje się zajęciem dolnego neuronu ruchowego. W zespole ramienia cepowatego dochodzi do symetrycznego zajęcia proksymalnych odcinków kończyn górnych, natomiast w zespole nogi cepowatej wiotki niedowład obejmuje symetrycznie dystalne odcinki kończyn dolnych. Te dwa zespoły cechują się wolniejszą progresją objawów w porównaniu do klasycznych postaci SLA [Wijesekera i Leigh, 2009].

#### I.4.2. Rodzinna postać stwardnienia bocznego zanikowego.

Rodzinne występowanie SLA zostało po raz pierwszy opisane przez Kurlanda i wsp. w 1955 roku. W 1993 roku Rosen i wsp. odkryli mutację w genie kodującym SOD1, która związana jest z występowaniem rodzinnej postaci SLA [Graham, Macdonald i Hawkes, 1997].

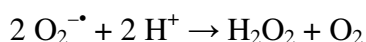
15–20% przypadków rodzinnej postaci SLA spowodowanych jest mutacją punktową w genie *SOD1* dla cytozolowej miedziowo–cynkowej dysmutazy nadtlenkowej [Wijesekera i Leigh, 2009].

Mutacje w innych genach są jeszcze rzadsze. Jest to na przykład mutacja w genie *SETX* (ang. *senataxin*) zlokalizowanym na chromosomie (9q34), która dziedziczona jest autosomalnie

dominująco. Powoduje ona wystąpienie objawów SLA u młodych osób, przebieg choroby w tych przypadkach jest powolny. Mutacja w genie *ALSIN* dziedziczona recesywnie, wiąże się z zachorowaniem w pierwszej lub drugiej dekadzie życia [Strong, Kesavapany i Pant, 2005]. Inne mutacje będące przyczyną rodzinnych postaci SLA występują w genach dla angiogeniny, podjednostki p150 dynaktyny (*DCTN1*, ang. *dynactin 1*) oraz w genie *VAPB* (ang. *vesicle-associated membrane protein-associated protein B*) kodującym białko VAPB związane z transportem pęcherzykowym (ang. *vesicle associated membrane protein*) [Wijesekera i Leigh, 2009].

SOD1 jest enzymem antyoksydacyjnym, kodowanym przez gen zlokalizowany na chromosomie 21q22.1. Katalizuje ona reakcję peroksydacji anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) do nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) i tlenu.

#### **Reakcja 5.**



Znanych jest ponad 120 mutacji genu *SOD1* odpowiedzialnych za występowanie rodzinnej postaci SLA [Wijesekera i Leigh, 2009]. Główny model dziedziczenia jest autosomalny dominujący, ale są także modele recesywne i sprzężone z chromosomem X [Strong, Kesavapany i Pant, 2005]. Rodzaj mutacji genu *SOD1* może mieć wpływ na wiek zachorowania, na przebieg choroby, na to jakie objawy są dominujące, a także jaki jest spodziewany okres przeżycia [Strong, Kesavapany i Pant, 2005]. W przypadku mutacji punktowej Asp90Ala genu *SOD1* dziedziczonej recesywnie, choroba rozwija się powoli, objawiając się głównie niedowładem kończyn dolnych, przeżycia są nawet powyżej 10 lat. Są też mutacje genu *SOD1* z bardzo szybką progresją choroby np. Ala4Val, Ala4Thr i His43Arg, gdzie średni czas przeżycia wynosi około jednego roku [Adamek i Tomik, 2005, str. 23].

Istnieje szereg hipotez dotyczących wystąpienia neurodegeneracji zależnej od SOD1. Można je podzielić na dwie grupy: hipotezy zakładające „zyskanie funkcji” (ang. *gain of function*), oraz hipotezy zakładające „zyskanie zdolności do nowych oddziaływań” (ang. *gain of interaction*) przez zmutowane białko SOD1 [Strong, Kesavapany i Pant, 2005].

Zgodnie z hipotezami pierwszej grupy winę za rozwój choroby ponoszą nowe własności katalityczne zmutowanej dysmutazy, spowodowane zmianami struktury trzeciorzędowej tego

białka. Tymi nowymi własnościami może być zdolność do wytwarzania rodników hydroksylowych (zamiast nadtlenu wodoru), zdolność katalizowania reakcji peroksydacji lipidów, bądź zdolność do przyłączania grup NO do reszt tyrozyny innych białek [Strong, Kesavapany i Pant, 2005].

Hipotezy drugiej grupy zakładają, że toksyczność tego białka nie jest związana z zyskaniem nowej funkcji katalitycznej, lecz z zyskaniem nowych możliwości interakcji z cząsteczkami białek. SOD1 zawiera strukturę, która jeśli nie zostanie prawidłowo sfałdowana, przybiera postać tzw. beta-kartki (ang. *beta-sheet*) zdolnej tworzyć (przez przyłączenie innych molekuł białkowych) oligomery, fibrylle i agregaty. Takie agregaty złożone z nieprawidłowego białka SOD1 są wykrywane w neuronach myszy transgenicznym wykazujących ekspresję zmutowanej SOD1 [Vijayvergiya i wsp., 2005].

Proponuje się, że agregaty złożone ze SOD1 wywierają efekt neurotoksyczny poprzez ingerencję w prawidłowo działające proteasomy lub poprzez tworzenie kompleksów z białkami szoku cieplnego (HSP, ang. *heat shock protein*). Niedobór HSP jest odpowiedzialny za brak hamowania czynników aktywujących apoptozę i w konsekwencji prowadzi do aktywacji tego procesu [Strong, Kesavapany i Pant, 2005].

I.5. Etiopatogeneza i czynniki ryzyka sporadycznej postaci stwardnienia bocznego zanikowego.

#### I.5.1. Etiopatogeneza

Etiopatogeneza SLA wciąż nie jest poznana. Uważa się, że mają w niej udział czynniki genetyczne i środowiskowe, za czym przemawiają badania przeprowadzone na bliźniętach mono i dzygotycznych, u których rozpoznano SLA [Graham, Macdonald i Hawkes, 1997]. Podkreśla się, że pierwotna przyczyna leżąca u podłoża zwyrodnienia neuronów ruchowych w SLA jest wieloczynnikowa i poszczególne patomechanizmy nakładają się na siebie [Zarkovic, 2003, Strong, 2003].

Za potencjalne przyczyny rozwoju choroby bierze się pod uwagę: reakcję zapalną i aktywację gleju, nadmierną aktywność aminokwasów ekscytotoksycznych, dezorganizację neurofilamentów, zaburzenie transportu aksonalnego, niedobór czynników neurotroficznych oraz stres oksydacyjny [Rowland i Shneider, 2001, Strong, 2003, Wijesekera i Leigh, 2009].

Aktywacja astrocytów i mikrogleju stanowi jedną z głównych zmian patologicznych stwierdzanych w SLA [Strong, 2003, Bruijn, Miller i Cleveland, 2004, Strong, Kesavapany i Pant, 2005]. Aktywowany mikroglej wpływa na neurony oraz pozostałe komórki gleju (astrocyty, oligodendrocyty) poprzez uwalniane czynniki prozapalne oraz cytotoksyczne, jak tlenek azotu (NO), glutaminian, prostaglandyny, TNF- $\alpha$ , a także wolne rodniki [Strong, 2003, Bruijn, Miller i Cleveland, 2004]. He, Wen i Strong [2002] w badaniu *in vitro* na liniach komórkowych (BV-2, NSC-34, L929) wykazali, że aktywowany mikroglej, wydzielając TNF- $\alpha$ , powoduje zwyrodnienie neuronów ruchowych i ich śmierć. Pojawienie się aktywowanego mikrogleju oraz mediatorów prozapalnych (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, M-CSF) stanowi także wczesne stadium rozwoju choroby neuronu ruchowego u myszy transgenicznych będących zwierzęcym modelem SLA [Alexianu, Kozovska i Appel, 2001, Elliott, 2001].

Wiele badań wskazuje, że w SLA dochodzi do uszkodzenia neuronów wskutek nadmiernej stymulacji postsynaptycznych receptorów dla aminokwasów ekscytotoksycznych, takich jak NMDA i AMPA [Wijesekera i Leigh, 2009]. Nadmierna aktywacja receptorów przez glutaminian wynika ze zwiększonego stężenia tego aminokwasu w przestrzeniach międzykomórkowych, co tłumaczone jest upośledzeniem transportu zwrotnego glutaminianu

(utrata transporterów glutaminianowych EAAT2 związanych z astrocytami) [Cid i wsp., 2003]. Aktywacja receptorów dla aminokwasów ekscytotoksycznych prowadzi do nadmiernego napływu wapnia do neuronów, co kaskadowo uaktywnia enzymy: lipazy, proteazy, endonukleazy, kalpajny, kaspazy, fosfatazy i kinazy białkowe, prowadząc do uszkodzenia cytoszkieletu, upośledzenia produkcji ATP, produkcji wolnych rodników, uszkodzeniu DNA i w efekcie do śmierci komórki [Cid i wsp., 2003, Strong, Kesavapany i Pant, 2005].

Neurofilamenty to główne białka strukturalne w neuronach ruchowych, ich obecność jest niezbędna do utrzymania prawidłowej średnicy aksonów [Bruijn, Miller i Cleveland, 2004]. Liczne badania dowodzą, że zarówno nadmierne jak i nieprawidłowe gromadzenie się neurofilamentów jest częstym znaleziskiem patologicznym tak w rodzinnej jak i sporadycznej postaci SLA [Bruijn, Miller i Cleveland, 2004]. Jednym z czynników sprawczych powstania agregatów jest modyfikacja neurofilamentów przez wolne rodniki [Strong, 2003]. Badania przeprowadzone na myszach transgenicznym wykazujących mutację w genie kodującym neurofilament lekki, wykazały kumulowanie się nieprawidłowych neurofilamentów w motoneuronach co prowadziło do śmierci tych komórek [Cañete-Soler i wsp., 1999].

Do uszkodzenia motoneuronów może prowadzić również zaburzenie transportu aksonalnego. Zwolnienie tego transportu stwierdzono we wczesnym stadium choroby u myszy transgenicznym wykazujących mutację w genie *SOD1* [Williamson i Cleveland, 1999].

Czynniki neurotroficzne odpowiadają za wzrost i przeżycie neuronów w centralnym i obwodowym układzie nerwowym. Ich głównym źródłem są astrocyty i komórki mikrogleju [Bruijn, Miller i Cleveland, 2004]. Wiadomo, że w tkankach chorych na SLA dochodzi do obniżenia ich stężenia, między innymi rzęskowego czynnika neurotrofowego (CNTF, ang. *ciliary neurotrophic factor*), czynnika neurotrofowego pochodzenia mózgowego (BDNF, ang. *brain derived neurotrophic factor*), glijopochodnego czynnika wzrostu nerwów (GDNF, ang. *glial cell line-derived neurotrophic factor*) i insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1, ang. *Insulin-like Growth Factor 1*) [Bruijn, Miller i Cleveland, 2004, Wijesekera i Leigh, 2009]. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia na temat związku naczyniowego czynnika wzrostu (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) z SLA [Bruijn, Miller i Cleveland, 2004]. Hamowanie aktywności VEGF w układzie nerwowym prowadzi do miejscowego niedokrwienia, generowania wolnych rodników, a ostatecznie do zwyrodnienia i



śmierci neuronów [Bruijn, Miller i Cleveland, 2004, Lambrechts, Storkebaum i Carmeliet, 2004]. Niższe stężenie VEGF wykazano w surowicy krwi chorych ze sporadyczną, jak i rodzinną postacią SLA w porównaniu do grupy kontrolnej [Lambrechts i wsp., 2003]. Devos i wsp. [2004] stwierdzili obniżony poziom VEGF w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na SLA w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych oraz z grupą kontrolną osób z innymi schorzeniami neurologicznymi.

#### I.5.1.1. Stres oksydacyjny w SLA

Uważa się, że motoneurony są szczególnie narażone na stres oksydacyjny poprzez wysoką aktywność metaboliczną związaną z neurotransmisją, wysoką zawartość nienasyconych reszt lipidowych w błonach neuronów oraz ekscytotoksyczność związaną z glutaminianem. Dodatkowo centralny układ nerwowy cechuje się słabo rozwiniętym systemem antyoksydacyjnym [Strong, Kesavapany i Pant, 2005].

Nieprawidłowe funkcjonowanie mitochondriów wiąże się z nasileniem reakcji stresu oksydacyjnego. Zachodzące w tych organellach reakcje łańcucha oddechowego są głównym źródłem wolnych rodników wewnątrz komórki.

U osób chorych na SLA wykryto obecność mitochondriów o nieprawidłowej morfologii w zakończeniach nerwów ruchowych, wątrobie i mięśniach. Stwierdzono także zaburzenie funkcji mitochondriów w płytkach krwi i limfocytach [Strong, 2003]. Nieprawidłowe działanie mitochondriów powoduje generowanie wolnych rodników, które modyfikują kwasy nukleinowe, białka (między innymi neurofilamenty) i lipidy, co prowadzi do uszkodzenia organelli komórkowych i śmierci komórki. Uszkodzenie mitochondriów stanowi jeden ze szlaków powodujących przekształcenie prokaspaz w aktywne proteazy i indukcję procesu apoptozy. Dochodzi do uwolnienia z mitochondriów do cytozolu cytochromu c, który wiąże się z białkiem Apaf-1 (ang. *apoptotic protease-activating factor-1*) i prokaspazą 9 tworząc kompleks zwany apoptosomem. Apoptosom aktywuje kaskadę kaspaz i zapoczątkowuje proces apoptozy [Strong, 2003].

W badaniach na hodowlach komórkowych, tkankach myszy transgenicznym oraz tkankach i płynach ustrojowych osób chorych na SLA stwierdzono zwiększone stężenie markerów

uszkodzenia wywołanego przez stres oksydacyjny takich jak: 8OH2'dG czy HNE [Bogdanov i wsp., 2000, Pedersen i wsp., 1998].

Bogdanov i wsp. [2000] wykazali podwyższony poziom 8OH2'dG w płynie mózgowo-rdzeniowym, krwi i moczu u chorych na SLA w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych. Aguirre i wsp. [2005] w badaniu na modelu zwierzęcym SLA (myszy transgeniczne wykazujące ekspresję zmutowanej *SOD1*), wykazali podwyższony poziom 8OH2'dG w rdzeniach kręgowych tych zwierząt w porównaniu do kontroli zarówno w okresie presymptomatycznym, objawowym i zaawansowanym choroby. Przy pomocy reakcji z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), wykazano zwiększone stężenie utlenionych lipidów w surowicy krwi chorych na SLA w porównaniu do kontrolnej grupy zdrowych osób [Bonfont-Rousselot i wsp., 2000]. Pedersen i wsp. [1998] wykazali zwiększoną modyfikację białek przez HNE w homogenatach rdzenia kręgowego chorych na SLA w porównaniu z grupą kontrolną. Na przekrojach poprzecznych rdzenia kręgowego kumulacje HNE zaobserwowano w rejonie neuronów ruchowych rogów przednich rdzenia. Ponadto wykazano, że białkami uszkodzonymi przez HNE są głównie transportery EAAT2, których niedobór stanowi istotę mechanizmu ekscytotoksyczności. Dalsze prace tej grupy badawczej, na linii komórkowej NSC-19 (wykazującej charakterystyczne cechy neuronów ruchowych) wykazały, że pod wpływem oddziaływania HNE dochodzi do znacznego upośledzenia transportu glutaminianu. Podanie antyoksydantu (glutationu) do hodowli komórkowej przed ekspozycją na HNE chroniło przed jego szkodliwym wpływem. Dłuższa ekspozycja hodowli komórkowej na HNE wiązała się ze zwiększeniem wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia i śmiercią komórek w mechanizmie apoptozy [Pedersen, Cashman i Mattson, 1999].

Stres oksydacyjny wymieniany jest jako jeden z możliwych mechanizmów mających odgrywać rolę w etiopatogenezie SLA, obok zaburzenia transportu aksonalnego, ekscytotoksyczności związanej z glutaminianem czy reakcji zapalnej. Należy jednak podkreślić, że stres oksydacyjny ma wpływ na te pozostałe mechanizmy. Wolne rodniki zwiększają wrażliwość neuronów na ekscytotoksyczność związaną z glutaminianem poprzez zaburzenie jego transportu przez komórki gleju, a także promują tworzenie agregatów białkowych [Ascherio i wsp., 2005].

Nie ma dotychczas jednoznacznego rozstrzygnięcia czy do śmierci motoneuronów w SLA dochodzi na drodze nekrozy, apoptozy czy też kombinacji tych dwóch procesów [Strong, 2003]. Trudno morfologicznie rozróżnić te dwa procesy w przewlekłej, wolno rozwijającej się

chorobie, ze względu jednak na zidentyfikowanie w tkankach chorych na SLA markerów apoptozy, uważa się, że to właśnie ta droga odgrywa główną rolę w śmierci neuronów [Strong, Kesavapany i Pant, 2005, Wijsekera i Leigh, 2009].

### I.5.2. Czynniki ryzyka

Za niemodyfikowalne czynniki ryzyka wystąpienia SLA uznaje się wiek, płeć oraz wywiad rodzinny w kierunku choroby [Chio, 2000, Brooks, 2000]. Z czynników egzogennych wykazano, że palenie papierosów ma prawdopodobnie wpływ na wystąpienie SLA [Armon, 2003]. Sugeruje się także wpływ narażenia na toksyczne związki chemiczne obecne w środowisku, szczególnie ekspozycję na środki stosowane w rolnictwie takie jak pestycydy, herbicydy [Brooks, 2000].

W metaanalizie przeprowadzonej przez Armon [2003] stwierdzono, że palenie papierosów jest prawdopodobnym czynnikiem ryzyka rozwoju SLA. Nelson i wsp. [2000 (a)] przedstawili następujące wyniki: palenie papierosów (kiedykolwiek) dwukrotnie zwiększa ryzyko SLA, dla aktualnie palących papierosy ryzyko jest trzykrotnie zwiększone, podczas gdy dla byłych palaczy tylko nieznacznie podwyższone. Ponadto, ryzyko to związane jest z czasem palenia papierosów i liczbą wypalanych papierosów. Weisskopf i wsp. [2004] w badaniu prospektywnym wykazali związek między aktualnym paleniem papierosów a zwiększonym ryzykiem zgonu z powodu SLA w populacji kobiet. Sutedja i wsp. [2007] wykazali, że aktualne palenie papierosów jest niezależnym czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia SLA. Opublikowana w tym roku kolejna analiza potwierdza poprzednie wyniki [Gallo i wsp., 2009]. W badaniu prospektywnym (zakwalifikowano 517 890), stwierdzono, że palenie papierosów w momencie włączenia do badania prawie dwukrotnie zwiększało ryzyko zgonu z powodu SLA w porównaniu do osób nigdy niepalących. Status byłego palacza w momencie włączenia do badania zwiększało to ryzyko o 50% w stosunku do osób nigdy niepalących. Stwierdzono także korelację z czasem palenia papierosów. Osoby palące dłużej niż 33 lata miały ponad dwukrotnie większe ryzyko zachorowania na SLA niż osoby niepalące. Odwrotnie, liczba lat od zaprzestania palenia papierosów korelowała ze zmniejszeniem ryzyka zachorowania na SLA w porównaniu do nadal palących.

Podawane są dwie główne hipotezy dotyczące wpływu palenia papierosów na zwiększone ryzyko zachorowania na SLA. Pierwsza mówi o bezpośrednim efekcie neurotoksycznym

wywieranym na motoneurony, druga o nasileniu reakcji stresu oksydacyjnego przez dym tytoniowy. Dym tytoniowy zawiera liczne toksyczne związki chemiczne, między innymi pestycydy używane do uprawy tytoniu, ponadto ołów i inne metale ciężkie. Za mechanizmem związanym z nasileniem stresu oksydacyjnego przemawia fakt, że we krwi osób palących stwierdza się zwiększony poziom produktów oksydacji lipidów [Rumley i wsp., 2004]. Ponadto, dym tytoniowy hamuje VEGF w stanach stresu oksydacyjnego, a obniżony poziom VEGF jest związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju SLA [Weisskopf i wsp., 2004]. Gallo i wsp. [2009] podkreślają znaczenie formaldehydu w wydychanym dymie tytoniowym, jako czynnika, który nasila stres oksydacyjny poprzez utlenianie lipidów w komórkach nerwowych mózgu. Formaldehyd powstaje w trakcie palenia tytoniu ze składnika tytoniu jakim jest sacharyna.

Wyniki badania przeprowadzonego przez McGuire i wsp. [1997] wskazują, że narażenie na chemiczne środki stosowane w rolnictwie (szczególnie insektycydy) jest czynnikiem ryzyka zachorowania na SLA w populacji mężczyzn. Także w badaniu Bharucha i wsp. [1983] wykazano, że z ryzykiem zachorowania na SLA związany jest status socjoekonomiczny oraz zamieszkiwanie terenów rolniczych. Badania Chio i wsp. [2005] sugerują, że profesjonalna gra w piłkę nożną związana ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na SLA może być konsekwencją między innymi narażenia na herbicydy używane do pielęgnacji boisk sportowych.

Wyniki badań dotyczących związku narażenia na metale ciężkie z ryzykiem rozwoju SLA są rozbieżne. Chancellor i wsp. [1993] wykazali, że narażenie na ołów i rozpuszczalniki było znamienne częstsze w grupie chorych na SLA w porównaniu z grupą kontrolną. W innym badaniu [Graham, Macdonald i Hawkes, 1997] w grupie chorych na SLA stwierdzono częstsze wykonywanie zawodów, które wiążą się z kontaktem z takimi substancjami jak rozpuszczalniki, paliwa oraz farby. Wszystkie te substancje zawierają ołów. Podobnie w pracy Armon i wsp. [1991] ujawniono związek między zachorowaniem na SLA wśród mężczyzn a wykonywaniem pracy takiej jak: spawanie czy lutowanie. Sutedja i wsp. [2007] analizując ryzyko zachorowania na SLA w zależności od rodzaju wykonywanego zawodu, stwierdzili większe ryzyko wystąpienia choroby w grupie kobiet zajmujących się rzemiosłem. Natomiast Bharucha i wsp. [1983] w swoim badaniu nie wykazali związku SLA z poziomem urbanizacji, wykonywaniem pracy fizycznej, narażeniem na ołów i rtęć.

Uważa się, że ołów zaburza prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów, nasila stres oksydacyjny oraz ekcytotoksyczność, prowadzi to do zaburzenia wewnątrzkomórkowej homeostazy wapnia. Ołów oddziałuje także bezpośrednio na neurony i komórki glejowe, głównie astrocyty [Kamel i wsp., 2005]. Dodatkowo Li i wsp. [2006] wykazali odwrotną zależność między poziomem ołowiu a poziomem aktywności PON1. Najniższy poziom aktywności PON1 względem zarówno paraoksonu, diazoksonu jak i octanu fenylu stwierdzono w grupie osób z największą ekspozycją na ołów. Narażenie na ołów wiązało się z obniżeniem aktywności PON1, ten efekt był szczególnie widoczny u nosicieli allelu R polimorfizmu Q192R genu *PON1*.

Wśród czynników ryzyka SLA wymienia się również ekspozycję na środki fosforoorganiczne. Udokumentowano większą zapadalność na SLA wśród weteranów Wojny w Zatoce Perskiej, którzy byli narażeni na te substancje [Haley, 2003].

W badaniach poszukujących zależności między ryzykiem zachorowania na SLA a rodzajem wykonywanej pracy wykazano, że ze zwiększonym ryzykiem SLA u mężczyzn wiąże się wykonywanie takich także zawodów jak programista i technik laboratoryjny natomiast u kobiet praca przy składaniu maszyn (ang. *machine assemblers*). Autorzy uważają, że wykonywanie tych zawodów związane jest z kolei z narażeniem na pole elektromagnetyczne [Weisskopf i wsp., 2005].

Przeprowadzono także badania dotyczące wpływu diety na ryzyko zachorowania na SLA. Nelson i wsp. [2000 (b)] w prospektywnym badaniu kohortowym znaleźli zależność między spożywaniem tłuszczów (nasyconych i wielonienasyconych, kwasu linolenowego) oraz glutaminianu a zwiększonym ryzykiem zachorowania na SLA oraz odwrotną zależność ze spożywaniem pokarmów zawierających składniki roślinne (pektyny, celulozę, ligninę). Autorzy podkreślają, że mózg jest szczególnie wrażliwy na stres oksydacyjny związany z utlenieniem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, a ich zawartość w błonach komórkowych jest uzależniona w dużej mierze od ilości tych składników w diecie. Dieta bogata w błonnik przyspiesza czas przejścia pokarmu przez jelito grube i w ten sposób skraca czas możliwej absorpcji związków toksycznych, ponadto hamuje przekształcanie się glutaminy w glutaminian, który odgrywa zasadniczą rolę w indukowaniu ekcytotoksycznej śmierci neuronów. Dodatkowo zmniejsza wchłanianie tłuszczów z jelit. W badaniu przeprowadzonym przez Ascherio i wsp. [2005] wykazano, że śmiertelność z powodu SLA w

grupie osób stosujących wieloletnią suplementację ( $\geq 10$  lat) witaminą E, była o 62% mniejsza niż w grupie osób niestosujących suplementacji tą witaminą. Witamina E uważana jest za główny antyoksydant komórkowy, chroniący lipidy błon komórkowych przed utlenieniem. Nelson i wsp. [2000 (a)] w swoim badaniu nie znaleźli zależności między spożywaniem alkoholu a ryzykiem zachorowania na SLA.

Za czynniki ryzyka SLA podaje się także uraz, nadmierny wysiłek fizyczny. Chen i wsp. [2007] wykazali, że przebycie jakiegokolwiek urazu nie jest ryzykiem SLA, jedynie uraz głowy wydaje się być związany z większym ryzykiem zachorowania. Natomiast liczne urazy głowy, szczególnie te przebyte do 10 lat wstecz od zachorowania, są związane z ponad trzykrotnym zwiększeniem ryzyka rozwoju SLA. Także Chio i wsp. [2005] wskazuje na nadmierny wysiłek fizyczny związany z uprawianiem sportu oraz występowanie licznych urazów i mikrourazów (głowy, kończyn), jakich doznają zawodowi piłkarze za przyczynę częstszego zachorowania na SLA w tej grupie zawodowej. Uraz głowy może indukować stan zapalny w obrębie ośrodkowego układu nerwowego lub aktywację mikrogleju, może powodować uszkodzenie bariery krew–mózg, zaburzenie funkcji mitochondriów, nadmierną produkcję wolnych rodników tlenowych i azotowych, akumulację białka tau [Chen i wsp., 2007]. Wykonywanie ćwiczeń fizycznych prowadzi do zwiększenia produkcji wolnych rodników tlenowych, z którymi z wiekiem układ antyoksydacyjny nie w każdym przypadku jest w stanie sobie poradzić [Rousseau i wsp., 2006]. U osób młodych umiarkowany wysiłek fizyczny, poprzez nasilenie reakcji stresu oksydacyjnego, indukuje zwiększoną syntezę białek mających właściwości antyoksydacyjne. Wyniki badania przeprowadzonego przez Rousseau i wsp. [2006] wskazują, że u starszych osób ten mechanizm nie jest na tyle wydolny, aby zbalansować związane z wiekiem nasilenie reakcji stresu oksydacyjnego. Ten mechanizm może tłumaczyć korelację czasu wyczynowego uprawiania sportu z ryzykiem zachorowania na SLA [Chio i wsp., 2005]. Zawodowi piłkarze poddani wyczynowemu treningowi poniżej 5 lat mieli 3,5 razy większe ryzyko zachorowania na SLA niż osoby z grupy kontrolnej, natomiast osoby poddane wyczynowemu treningowi powyżej 5 lat miały to ryzyko 15 razy większe.

W badaniach epidemiologicznych zauważono także, że osoby chore na SLA, częściej w porównaniu do osób zdrowych, posiadają przynajmniej jednego krewnego z chorobą zwyrodnieniową [Armon i wsp., 1991]. Dodatkowo osoby chore na SLA w porównaniu do grupy kontrolnej miały nieco większy wskaźnik masy ciała (BMI, ang. *body mass index*) niż

grupa kontrolna na 5 lat przed postawieniem diagnozy [Nelson i wsp., 2000 (b)]. U chorych na SLA stwierdzono także globalnie mniejszą liczbę lat nauki szkolnej i rzadsze występowanie wyższego wykształcenia w porównaniu do grupy kontrolnej [Nelson i wsp., 2000 (b), Gallo i wsp., 2009]. Sutedja i wsp. [2007] wykazali, że niski poziom wykształcenia (oddający najniższy status socjoekonomiczny) łączył się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju SLA.

Dodatkowe dowody nad rolę czynników środowiskowych i toksycznych w rozwoju SLA przyniosło odkrycie współwystępowania SLA w kompleksie z parkinsonizmem i otępieniem u członków plemienia Chamorros, zamieszkujących wyspę Guam na zachodnim Pacyfiku (tzw. wariant z Guam, ang. *ALS-parkinsonism-dementia complex, ALS-PDC*).

Przeprowadzone badania epidemiologiczne wskazują na częstsze występowanie tego zespołu u spokrewnionych osób, jednak nie udało się dotąd ustalić żadnego modelu dziedziczenia, ponadto zachorowania często występowały także u współmałżonków [Reed, Torres i Brody, 1975]. Zauważono, że rdzenni mieszkańcy mieli zwiększone ryzyko zachorowania na ALS-PDC, jeżeli stosowali tradycyjną, lokalną dietę (m.in. jedli mięso nietoperzy). Osoby, które przejęły zachodni styl życia, w tym nawyki żywieniowe, miały mniejsze ryzyko zachorowania [Reed i wsp., 1987].

Za ewentualną przyczynę występowania endemicznego ALS-PDC uważa się spożywanie przez tubylców mąki, uzyskiwanej z nasion sagowca oraz spożywanie mięsa nietoperzy żywiących się głównie tymi nasionami. W sagowcach znajduje się niebiałkowy aminokwas beta-N-metyloamino-I-alanina (BMAA) o silnych właściwościach neurotoksycznych. Źródłem BMAA w sagowcach są cyjanobakterie (sinice). Uważa się, że w organizmach nietoperzy dochodzi do akumulacji neurotoksycznego aminokwasu [Cox, Banack i Murch, 2003]. Rao i wsp. [2006] w badaniu na komórkach rdzenia kręgowego myszy udowodnili, że motoneurony są selektywnie wrażliwe na BMAA, wykazano także, że efekt ten jest zależny od dawki. Praca Rao i wsp. [2006] wskazuje, że BMAA niszczy neurony przez receptory AMPA/kainowe. Aktywacja tych receptorów powoduje wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia i generację wolnych rodników wskazując na znaczny udział stresu oksydacyjnego w tym patomechanizmie.

Opisano także kilka genów, których mutacje mogą potencjalnie zwiększać ryzyko wystąpienia sporadycznych przypadków SLA. Jest to m.in. delecja lub insercja w domenie

KSP genu *NEFH* kodującego podjednostkę ciężką neurofilamentu (NF-H), mikrodelecje w mitochondrialnym DNA odpowiadającym za kodowanie oksydazy cytochromu c, błędy w obróbce RNA w transporterach aminokwasów ekscytotoksycznych typu 2 (EAAT2), nadmiar kopii genu *SMN* (ang. *survival motor neuron gene*) oraz delecja związana z genem *NAIP* (ang. *neuronal apoptosis inhibitory protein*) w pozycji 5q13. Ponadto donoszono o częstszym występowaniu genotypu epsilon3/epsilon4 genu *apoE* w postaci opuszkowej SLA oraz o zmienności w genie *VEGF* u chorych na SLA [Strong, Kesavapany i Pant, 2005, Wijesekera i Leigh, 2009].



### I.5.3. Leczenie SLA

Jedynym lekiem mającym wpływ na przebieg SLA jest jak dotąd Rilutek (Riluzole).

Dokładny mechanizm działania Riluteku w SLA jest nieznan, ale lek ten ma co najmniej trzy uchwytny punkty działania, które mogą wpływać na jego skuteczność: (1) hamuje uwalnianie glutaminianu [Martin, Thompson i Nadler, 1993], (2) hamuje receptory NMDA i kainowe [Debono i wsp., 1993, Hubert i wsp., 1994], (3) utrzymuje w stanie nieaktywnym zależne od potencjału kanały sodowe [Hebert i wsp., 1994]. Ponadto w szeregu badań *in vitro* i *in vivo* wykazano jego działanie neuroprotektyjne [Couratier i wsp., 1994, Estevez, Stutzmann i Barbeito, 1995, Rothstein i Kuncl, 1995, Gurney i wsp., 1996]. Dwie wieloośrodkowe próby kliniczne wykazały, że po 18 miesiącach terapii lek zmniejsza ryzyko śmierci (lub tracheostomii) o 35%, co w praktyce oznacza wydłużenie życia przeciętnie o 2–3 miesiące; i to nie u wszystkich chorych [Miller i wsp., 1996]. Badania dowodzą, że leczenie Rilutekiem w dawce 100 mg dziennie (2 x 50 mg) przez 18 miesięcy nieznacznie wydłuża przeżycia chorych, ale niestety nie wpływa na poprawę ich stanu klinicznego i jakości życia [Bensimon, Lacomblez i Meininger, 1994, Lacomblez i wsp., 1996, Miller i wsp., 2002]. Lek jest bezpieczny, dając niekiedy niewielkie podniesienie poziomu enzymów wątrobowych, stąd wskazana jest ich systematyczna kontrola. Leczenie powinno być rozpoczęte tak szybko jak to możliwe, zaraz po przedstawieniu choremu diagnozy [Andersen i wsp., 2005]. Nie zaleca się stosowania Riluzole w innych postaciach SLA (PBP, PMA, PLS).

Należy podkreślić, że w literaturze brak, w chwili obecnej, naukowych przesłanek dotyczących stosowania w SLA następujących substancji: witamin, antyoksydantów (koenzym Q<sub>10</sub>, β-karoten, selegilina), preparatów *Gingko biloba*, kreatyny, immunoglobulin podawanych dożylnie, sterydów, leków immunosupresyjnych (cyklosporyna), interferonów, Copaxone, minocykliny, ceftriaksonu, czynników neurotroficznych (VEGF) oraz terapii komórkami macierzystymi [Andersen i wsp., 2005]. Ze względu na intensywnie prowadzone badania naukowe, zarówno na poziomie doświadczalnym jak i klinicznym oraz próby lekowe być może niektóre z wymienionych substancji staną się w przyszłości elementem leczenia przyczynowego choroby, jednak w chwili obecnej brak takich dowodów.

## I.6. Stwardnienie boczne zanikowe a PON

Badania prowadzone na grupie weteranów Wojny w Zatoce Perskiej wykazały, że ryzyko wystąpienia objawów i chorób neurologicznych takich jak apraksja, ataksja, neuropatia u tych osób wiązało się z przebytych narażeniem na toksyczne substancje chemiczne (związki fosforoorganiczne, gazy bojowe) oraz z poziomem aktywności enzymów detoksyfikacyjnych (BuChE, PON1) w surowicy krwi [Haley, Billecke i La Du, 1999, Mackness, Durrington i Mackness, 2000]. Haley, Billecke i La Du [1999] wykazał, że obok niskiej aktywności BuChE i PON1 w surowicy także obecność allelu R w pozycji 192 genu *PON1* wiąże się z tym ryzykiem. Stwierdzono także, że nawet wysoka aktywność BuChE nie była w stanie skompensować niskiej aktywności PON1, co wskazuje, że główną rolę w ochronie przed szkodliwymi czynnikami środowiska pełni PON1 [Haley, Billecke i La Du, 1999].

W 2003 roku, Horner i wsp. [2003] i wsp. oraz Haley [2003] w badaniach epidemiologicznych wykazali, że SLA występuje znamienne częściej wśród weteranów Wojny w Zatoce Perskiej. U przeważającej większości weteranów pierwsze objawy SLA pojawiły się przed ukończeniem 45 roku życia, co jest rzadkie w populacji ogólnej [Haley, 2003]. Osoby biorące udział w Wojnie w Zatoce Perskiej były narażone na liczne substancje toksyczne m.in. pestycydy, gazy bojowe (sarin), wielokrotną immunizację szczepionkami zawierającymi rtęć, szkodliwe promieniowanie pochodzące z używania broni zawierającej wzbogacony uran, a także na nadmierny wysiłek fizyczny i liczne urazy fizyczne ciała [Haley, 2003].

Powyższe doniesienia wskazują, że zmniejszenie zdolności do hydrolizy szkodliwych czynników środowiskowych oraz osłabienie właściwości antyoksydacyjnych może być związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju SLA.

Opublikowana przez naszą grupę badawczą wstępna analiza wskazuje, że obecność allelu R w pozycji 192 genu *PON1* oraz allelu C w pozycji 311 genu *PON2* stanowi czynnik ryzyka rozwoju sporadycznej postaci SLA [Słowik i wsp., 2006]. Związek między SLA a paraoksonazami wykazali także inni badacze: Saeed i wsp. [2006], Cronin i wsp. [2007], Morahan i wsp. [2007], Valdmanis i wsp. [2008], Wills i wsp. [2008], Landers i wsp. [2008].

Jak dotychczas, wpływ polimorfizmu tego genu był badany w chorobie Alzheimera oraz w chorobie Parkinsona, które podobnie jak SLA, należą do chorób neurodegeneracyjnych [Zintzaras i Hadjigeorgiou, 2004, Erlich i wsp. 2006].

## II. CEL NAUKOWY PROJEKTU I ZADANIA BADAWCZE

### II.1. Cel naukowy projektu

Celem naukowym projektu było określenie wpływu wybranych polimorfizmów genu *PON1* i *PON2* oraz aktywności enzymatycznej PON1 na ryzyko wystąpienia sporadycznej postaci SLA.

### II.2. Zadania badawcze

Cel naukowy projektu zrealizowano poprzez następujące zadania badawcze:

- Porównanie częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów genu *PON1* (Q192R rs662, L55M rs854560, -A162G rs705381) w grupie chorych na sporadyczną postać SLA i w grupie kontrolnej.
- Porównanie częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu C311S (rs6954345) genu *PON2* w grupie chorych na sporadyczną postać SLA i w grupie kontrolnej.
- Porównanie częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów genu *PON1* (Q192R rs662, L55M rs854560, -A162G rs705381) i *PON2* (C311S rs6954345) u chorych z kończynowym i opuszkowym początkiem choroby.
- Ocena aktywności enzymatycznej PON1 w surowicy krwi u chorych na sporadyczną postać SLA i w grupie kontrolnej.
- Ocena związku między zbadanymi polimorfizmami genu *PON1* (Q192R rs662, L55M rs854560, -A162G rs705381) a aktywnością enzymatyczną PON1 w surowicy krwi u chorych na sporadyczną postać SLA i w grupie kontrolnej.

### III. MATERIAŁ

#### III.1. Grupa badana

Do badania włączono kolejne osoby z diagnozą klinicznie prawdopodobnego lub pewnego SLA postawioną według kryteriów WFN El Escorial 1998 [Brooks i wsp., 2000], które były diagnozowane i leczone w Klinice Neurologii UJ CM w Krakowie w latach od 2005 do 2008. Zakwalifikowane osoby należały do rasy kaukaskiej i były polskiego pochodzenia.

Wszystkie osoby uczestniczące w badaniu wyraziły świadomą zgodę na udział.

Wykluczono osoby z wywiadem rodzinnym w kierunku SLA, z rozpoznaniem możliwego SLA, ze współistniejącymi chorobami nerek, wątroby oraz chorobami nowotworowymi, a także z zespołem SLA-plus, czyli osoby, które obok klasycznych objawów SLA prezentowały objawy uszkodzenia innych struktur układu nerwowego.

Rozpoznanie SLA stawiano na podstawie aktualnie obowiązujących kryteriów diagnostycznych WFN El Escorial, według których do rozpoznania tej choroby konieczne jest stwierdzenie objawów uszkodzenia dolnego i górnego neuronu ruchowego w badaniu klinicznym oraz progresji choroby w danym regionie anatomicznym lub pojawienia się objawów choroby w nowym regionie [Brooks i wsp., 2000].

Klinicznie pewną diagnozę SLA stawiano w przypadku, gdy w badaniu neurologicznym stwierdzano cechy uszkodzenia górnego i dolnego neuronu ruchowego w obszarze opuszki i przynajmniej w dwóch regionach rdzenia kręgowego lub uszkodzenie górnego i dolnego neuronu ruchowego w trzech regionach rdzenia [Brooks i wsp., 2000].

Klinicznie prawdopodobną diagnozę SLA stawiano w przypadku, gdy w badaniu neurologicznym stwierdzano cechy uszkodzenia górnego i dolnego neuronu ruchowego przynajmniej w dwóch regionach anatomicznych, przy czym część objawów uszkodzenia górnego neuronu ruchowego występowała w regionie powyżej uszkodzenia dolnego neuronu ruchowego [Brooks i wsp., 2000].

Klinicznie możliwą diagnozę SLA stawiano w przypadku, gdy w badaniu neurologicznym stwierdzano cechy uszkodzenia zarówno górnego jak i dolnego neuronu ruchowego tylko w jednym regionie, albo cechy uszkodzenia wyłącznie górnego neuronu ruchowego występujące w dwóch lub więcej regionach, lub w przypadkach gdy cechy uszkodzenia dolnego i górnego neuronu ruchowego były stwierdzane w różnych regionach ale uszkodzenie dolnego neuronu ruchowego było w regionie powyżej objawów z górnego neuronu ruchowego [Brooks i wsp., 2000].

W przeprowadzonym badaniu pacjentów przydzielono do dwóch grup, biorąc pod uwagę początek objawów klinicznych choroby. Wyróżniono postać z początkowym niedowładem kończyn (postać kończynowa SLA) oraz postać z początkowymi objawami opuszkowymi, tzn. z zaburzeniami mowy i/lub połykania (postać opuszkowa SLA).

Do celów badania przygotowano kwestionariusz, który uwzględniał:

- dane demograficzne;
- wiek zachorowania (wiek wystąpienia pierwszych objawów);
- lokalizację pierwszych objawów, co stanowiło podstawę do określenia postaci SLA (opuszkowa/kończynowa);
- choroby współistniejące (cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienności serca, hipercholesterolemia, choroby wątroby, choroby nerek, choroby nowotworowe);
- palenie papierosów (aktualne palenie papierosów, palenie w przeszłości, negatywny wywiad w kierunku palenia papierosów);
- wywiad rodzinny w kierunku SLA.

Według powyższego kwestionariusza przeprowadzono wywiad u zakwalifikowanych osób.

### III.2. Grupa kontrolna

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano kolejne osoby, bez wywiadu w kierunku chorób neurologicznych oraz bez objawów neurologicznych, które wyraziły świadomą zgodę na udział w badaniu. Zakwalifikowane osoby należały do rasy kaukaskiej i były polskiego pochodzenia.

Do celów badania przygotowano kwestionariusz, który uwzględniał:

- dane demograficzne;
- wywiad w kierunku chorób neurologicznych;
- wywiad w kierunku chorób współistniejących (cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienna serca, hipercholesterolemia, choroby wątroby, choroby nerek, choroby nowotworowe)
- palenie papierosów (aktualne palenie papierosów, palenie w przeszłości, negatywny wywiad w kierunku palenia papierosów).

Według powyższego kwestionariusza przeprowadzono wywiad u zakwalifikowanych osób.

### III.3. Materiał biologiczny

Materiał biologiczny stanowiła krew żylna pobrana od chorych i osób zdrowych z grupy kontrolnej.

W celu wykonania izolacji DNA i przeprowadzenia badań genetycznych od wszystkich chorych na SLA oraz od wszystkich osób z grupy kontrolnej pobrano 5 ml krwi żyłnej.

W celu oznaczenia aktywności PON1 dodatkowo od 63 chorych na SLA oraz od 57 osób z grupy kontrolnej, będących na czczo, pobrano 5 ml krwi żyłnej na skrzep. Po wytworzeniu skrzepu (min. 30 minut) próbki krwi odwirowywano (4000 obrotów/minutę przez 15 minut), a otrzymaną surowicę przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania oznaczeń. Czas przechowywania surowicy od momentu pobrania do momentu wykonania oznaczenia wahał się od 2 do 40 miesięcy.

## IV. METODY

### IV.1. Badanie neurologiczne

Każda osoba z podejrzeniem SLA była badana neurologicznie, w celu postawienia ostatecznej diagnozy, określenia poziomu klinicznej wiarygodności rozpoznania tej choroby (SLA możliwe, prawdopodobne lub pewne) i ustalenia lokalizacji pierwszych objawów choroby (postać opuszkowa, postać kończynowa). Wszystkie osoby z grupy kontrolnej były badane neurologicznie w celu wykluczenia objawów uszkodzenia układu nerwowego.

### IV.2. Metodyka badań laboratoryjnych

#### IV.2.1. Izolowanie DNA

Leukocytarne DNA zostało wyizolowane przy użyciu DNAzolu (DNAzol Reagent) firmy Invitrogen, część DNA uzyskano przy użyciu zestawu QIAamp DNA Blood Mini kit firmy Qiagen.

#### IV.2.2. Oznaczenie polimorfizmów genów

Polimorfizmy Q192R i L55M genu *PON1* oraz C311S genu *PON2* zostały oznaczone przy pomocy reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz trawienia enzymami restrykcyjnymi z rozdziałem otrzymanych fragmentów na żelach agarozowych (4,0% i 4,5%) barwionych bromkiem etydyny. Polimorfizm –A162G genu *PON1* został oznaczony przy pomocy reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR).

##### IV.2.2.1. Polimorfizm genu paraoksonazy 1 Gln192Arg (Q/R)

Reakcja łańcuchowa polimerazy została przeprowadzona w końcowej objętości 15  $\mu$ L mieszaniny reakcyjnej, która zawierała 0,7  $\mu$ L każdego ze starterów w stężeniu 10  $\mu$ M, 10x bufor (Qiagen), 0,3  $\mu$ L dNTP w stężeniu 10 mM (Qiagen), 0,08  $\mu$ L Taq DNA polimerazy (Qiagen) oraz 1,5  $\mu$ L ludzkiego DNA o stężeniu 100 ng/ $\mu$ L. Sekwencje starterów zastosowane w reakcji PCR były następujące: 5'–TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G–

3' i 5'-CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC TC-3' (Tib-Mol Biol). Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu aparatu UNO I firmy Biometra.

Po wstępnej denaturacji DNA przez 5 minut w 95°C, mieszanina reakcyjna została poddana 30 cyklom: denaturacja (1 minuta w 94°C), przyłączanie (30 sekund w 61°C) i polimeryzacja (1 minuta w 72°C). Końcowy etap polimeryzacji odbywał się w 72°C przez 6 minut.

Uzyskany produkt o długości 99 bp trawiono enzymem restrykcyjnym Alw I (New England Biolabs).

Trawienie przeprowadzono w objętości 18 µL zawierającej 15 µL produktu, 10x bufor i enzym (0,3 µL). Mieszaninę inkubowano przez 12 godzin w 37°C. Otrzymane produkty trawienia rozdzielano następnie na 4,5% żelu agarozowym (Sigma) barwionym bromkiem etydyny (Gibco BRL) przez 30 minut przy 125 V. W przypadku homozygot A/A uzyskiwano produkt 99 bp, homozygot B/B – produkty 65 bp i 34 bp, oraz heterozygot – produkty 99 bp, 65 bp i 34 bp.

#### IV.2.2.2. Polimorfizm genu paraoksanazy 1 Leu54Met (L/M)

Reakcja łańcuchowa polimerazy została przeprowadzona w końcowej objętości 15 µL mieszaniny reakcyjnej, która zawierała 0,5 µL każdego ze starterów w stężeniu 10 µM, 10x bufor, 0,3 µL dNTP w stężeniu 10 mM (Qiagen), 0,08 µL Taq DNA polimerazy (Qiagen) oraz 1 µL ludzkiego DNA o stężeniu 100 ng/µL. Sekwencje starterów zastosowane w reakcji PCR były następujące: 5'-GAA GAG TGA TGT ATA GCC CCA G-3' i 5'-TTT AAT CCA GAG CTA ATG AAA GCC-3' (Invitrogen). Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu aparatu UNO I firmy Biometra.

Po wstępnej denaturacji DNA przez 4 minuty w 94°C, mieszanina reakcyjna została poddana 34 cyklom: denaturacja (45 sekund w 94°C), przyłączanie (50 sekund w 61°C) i polimeryzacja (45 sekund w 72°C). Końcowy etap polimeryzacji odbywał się w 72°C przez 6 minut.

Uzyskany produkt o długości 170 bp trawiono enzymem restrykcyjnym Hsp 92 II (Promega).

Trawienie przeprowadzono w objętości 18 µL zawierającej 15 µL produktu, 10x bufor K, 100x BSA i enzym (0,3 µL). Mieszaninę inkubowano przez 12 godzin w 37°C. Otrzymane produkty trawienia rozdzielano następnie na 4% żelu agarozowym (Sigma) barwionym bromkiem etydyny (Gibco BRL) przez 30 minut przy 125 V. W przypadku homozygot L/L uzyskiwano produkt 170 bp, homozygot M/M – produkty: 126 bp i 44 bp, oraz heterozygot – produkty: 170 bp, 126 bp i 44 bp.



#### IV.2.2.3. Polimorfizm genu paraoksanazy 2 Cys311Ser (C/S)

Reakcja łańcuchowa polimerazy została przeprowadzona w końcowej objętości 15  $\mu\text{L}$  mieszaniny reakcyjnej, która zawierała 0,5  $\mu\text{L}$  każdego ze starterów w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ , 10x bufor, 0,3  $\mu\text{L}$  dNTP w stężeniu 10 mM (Qiagen), 0,08  $\mu\text{L}$  Taq DNA polimerazy (Qiagen) oraz 1,5  $\mu\text{L}$  ludzkiego DNA o stężeniu 100 ng/ $\mu\text{L}$ . Sekwencje starterów zastosowane w reakcji PCR były następujące: 5'–ACA TGC ATG TAC GGT GGT CTT ATA–3' i 5'–AGC ATT TCA TAG ATT AAT TGT TA–3' (Invitrogen). Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu aparatu UNO I firmy Biometra.

Po wstępnej denaturacji DNA przez 4 minuty w 94°C, mieszanina reakcyjna została poddana 30 cyklom: denaturacja (50 sekund w 94°C), przyłączanie (1 minuta w 50°C), i polimeryzacja (1,5 minuty w 72°C). Końcowy etap polimeryzacji odbywał się w 72°C przez 7 minut.

Uzyskany produkt o długości 262 bp trawiono enzymem restrykcyjnym DdeI (Promega). Trawienie przeprowadzono w objętości 18  $\mu\text{L}$  zawierającej 15  $\mu\text{L}$  produktu, 10x bufor D, 100x BSA i enzym (0,2  $\mu\text{L}$ ). Mieszaninę inkubowano przez 12 godzin w 37°C. Otrzymane produkty trawienia rozdzielano następnie na 4,5% żelu agarozowym (Sigma) barwionym bromkiem etydyny (Gibco BRL) przez 30 minut przy 125 V. W przypadku homozygot C/C uzyskiwano produkty 120bp i 142 bp, homozygot S/S – produkty 120 bp i 67 bp i 75 bp, oraz heterozygot – produkty 120 bp, 142 bp, 75 bp i 67 bp.

#### IV.2.2.4. Polimorfizm genu paraoksanazy 1 –A162G

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym została przeprowadzona przy użyciu aparatu ABI PRISM® 7900HT Fast Real–Time PCR System (Applied Biosystems).

Zamówiony zestaw firmy Applied zawierał TaqMan Universal PCR Master Mix i specyficzną parę sond znakowanych fluorochromami VIC i FAM oraz startery. Reakcja była przeprowadzona w końcowej objętości 25  $\mu\text{L}$ .

Profil termiczny reakcji amplifikacji przedstawiał się następująco: 10 minut w 95°C, 40 cykli przez 15 sekund w 95°C i przez 1 minutę w temperaturze 60°C.

Zamówiony zestaw z firmy Applied Biosystems as Pre–Designed/Validated Assays był zaprojektowany i przygotowany do oznaczenie polimorfizmu genu *PONI* rs705381.

### IV.2.3. Oznaczanie aktywności paraoksonazy 1

Aktywność PON1 w surowicy krwi oceniano metodą spektrofotometryczną względem dwóch syntetycznych substratów: paraoksonu i octanu fenylu. Oznaczenia aktywności względem paraoksonu wykonano dwukrotnie w jednym dniu dla wszystkich próbek. Podobnie oznaczenia aktywności względem octanu fenylu wykonywano też dwukrotnie w jednym dniu. Badanie aktywności PON1 wykonano u osób chorych na SLA oraz osób z grupy kontrolnej, którzy wyrazili zgodę na dodatkowe pobranie krwi.

#### IV.2.3.1. Aktywność paraoksonazowa (substrat – paraokson)

Aktywność PON1 względem paraoksonu określono na podstawie początkowej szybkości hydrolizy paraoksonu do p-nitrofenolu, którego stężenie oznaczane było w oparciu o przyrost absorbancji przy długości fali 412 nm w ciągu 2 minut, w badanej mieszaninie (1,64 mL) zawierającej 2,0 mM paraoksonu (Sigma), 2,0 mM CaCl<sub>2</sub> oraz 40 µL surowicy w 50 mM Tris Base (pH 8,0). Wyniki wyrażano w U/mL (1 U enzymu hydrolizuje 1 nmol paraoksonu w ciągu minuty) [Ayub i wsp., 1999].

#### IV.2.3.2. Aktywność arylosterazowa (substrat – octan fenylu)

Aktywność względem octanu fenylu (aktywność arylosterazowa) oceniano przez pomiar wstępnego stopnia hydrolizy octanu fenylu do fenolu, którego stężenie oznaczane było na podstawie przyrostu absorbancji przy 270 nm. Do 3 mL buforu (50 mM Tris o pH 8,0) zawierającego 2 mM octanu fenylu (Sigma) i 2 mM CaCl<sub>2</sub> dodawano 10 µL surowicy i mierzono absorbancję przez 1 minutę przy długości fali 270 nm. Wyniki wyrażano w U/mL (1 U enzymu hydrolizuje 1 µmol octanu fenylu w ciągu minuty) [Ayub i wsp., 1999].

### IV.3. Analiza statystyczna

Wyniki dotyczące danych ilościowych zostały przedstawione w postaci średniej i odchylenia standardowego lub mediany oraz dolnego i górnego kwartyłu. Do sprawdzenia obecności różnic w rozkładzie wieku między grupami użyto testu nieparametrycznego Wilcoxon. Testem  $\chi^2$  sprawdzano różnice w rozkładzie płci między grupami. Potencjalną niezgodność wykrytych genotypów z równaniem Hardy–Weinberga zbadano za pomocą testu  $\chi^2$ . Dla porównania rozkładu genotypów i alleli w badanych grupach użyto testu  $\chi^2$ , a w przypadkach, gdy liczebność osób z danym genotypem w poszczególnych grupach była niższa od pięciu zgodnie ze standardową praktyką statystyczną zastosowano test Fishera. Podobnie, różnicę w częstości chorób współistniejących i palenia papierosów między badanymi grupami zbadano przy pomocy testu  $\chi^2$  oraz testu dokładnego prawdopodobieństwa Fishera. Dla danych o rozkładzie normalnym zastosowano test t-Studenta oraz wieloczynnikową regresję liniową. Korelacje badano testem rang Spermmana.

Badano związek między polimorfizmami a SLA w modelu recesywnym, addytywnym i dominującym oraz różnicę częstości występowania badanych alleli u chorych i w grupie kontrolnej. Ze względu na testowanie w przypadku badanych polimorfizmów czterech powyższych hipotez, obliczono, że wartość p po uwzględnieniu korekty Bonferroniego powinna być w tych analizach niższa niż 0,012.

Wpływ genotypów ryzyka SLA na ryzyko zachorowania na SLA po uwzględnieniu wieku i płci analizowano za pomocą regresji logistycznej. Za próg istotności statystycznej przyjęto wartość  $p < 0,05$ . Testem Wilcoxon badano różnice w aktywności między grupą badaną a grupą kontrolną. Wpływ polimorfizmów na aktywność badano testem Kruskala–Wallisa. Za próg istotności statystycznej przyjęto 0,05. Całość opracowano przy pomocy oprogramowania do analizy genetycznej PLINK wersja 1.06 oraz SAS wersja 9.1.

### IV.4. Informacje dodatkowe

Badanie zostało sfinansowane ze środków uzyskanych w ramach grantu promotorskiego numer N402 092 32/3216 z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Procedury badawcze przeprowadzono zgodnie z regułami Deklaracji Helsińskiej (zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego nr KBET/66/B/2006 z dnia 27.04.2006).

## V. WYNIKI

### V.1. Badania genetyczne

#### V.1.1. Charakterystyka badanych grup – dane demograficzne

Kryteria włączenia do badania spełniło 261 chorych na SLA. Wiek chorych w momencie wystąpienia pierwszych objawów wahał się w przedziale od 20 do 84 lat (średnia wieku:  $56,1 \pm 12,7$  lat). W grupie chorych na SLA było 125 kobiet (47,9%). U 185 chorych (70,9%) stwierdzono postać kończynową choroby, a u 76 chorych (29,1%) – postać opuszkową.

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 715 osób w wieku od 18 do 94 lat (średnia wieku:  $55,6 \pm 17,1$  lat). W grupie tej było 387 kobiet (54,1%).

Grupa chorych na SLA i grupa kontrolna nie różniły się pod względem rozkładu płci ( $p=0,08$ ) i wieku ( $p=0,58$ ).

Informacje na temat schorzeń współistniejących i palenia papierosów zebrano od części uczestników badania. Informacje dotyczące obecności hipercholesterolemii, cukrzycy, nadciśnienia tętniczego i choroby niedokrwiennej serca, zebrano od 200 chorych (77,0%), a informacje dotyczące nałogu palenia papierosów od 168 chorych (64,4%).

W grupie kontrolnej informacje dotyczące obecności hipercholesterolemii zebrano od 638 osób (89,0%), cukrzycy – od 710 osób (99,3%), a nadciśnienia tętniczego i choroby niedokrwiennej serca – od 708 osób (99,0%). Informacje na temat nałogu palenia papierosów zebrano od 703 osób (98,0%).

Nie stwierdzono różnicy statystycznej między badanymi grupami w odniesieniu do częstości występowania hipercholesterolemii ( $p=0,45$ ), cukrzycy ( $p=0,78$ ) i nadciśnienia tętniczego ( $p=0,99$ ). Nie było także różnic w częstości palenia papierosów aktualnie ( $p=0,38$ ) i kiedykolwiek ( $p=0,58$ ). W grupie chorych znacznie rzadziej ( $p=0,005$ ) występowała choroba niedokrwienność serca w porównaniu do grupy kontrolnej. Ze względu na to, że badane polimorfizmy są czynnikami ryzyka choroby niedokrwiennej serca w niektórych populacjach,

porównano rozkład badanych polimorfizmów u osób z grupy kontrolnej, które deklarowały obecność choroby niedokrwiennej serca z osobami bez choroby niedokrwiennej serca i nie stwierdzono różnic częstości badanych polimorfizmów między tymi dwoma grupami. Z tego powodu wywiad w kierunku choroby niedokrwiennej serca nie został włączony jako niezależny czynnik ryzyka do ostatecznej analizy wpływu badanych polimorfizmów na wystąpienie SLA.

Oznaczenie polimorfizmów Q192R oraz L55M genu *PON1* wykonano u wszystkich chorych na SLA. W przypadku polimorfizmu –A162G genu *PON1* nie udało się określić genotypu u dwóch chorych ze względu na brak DNA. W badaniu polimorfizmu C311S genu *PON2* nie udało się określić genotypu u jednego chorego, ze względu na niespecyficzne produkty reakcji, mimo kilkukrotnego powtarzania oznaczenia.

W grupie kontrolnej u jednej osoby nie uzyskano wyniku badania polimorfizmu Q192R genu *PON1* ze względu na niespecyficzne produkty reakcji, mimo kilkukrotnego powtarzania oznaczenia, u dwóch osób – polimorfizmu L55M genu *PON1* ze względu na brak DNA. W przypadku polimorfizmu –A162G genu *PON1* nie udało się określić genotypu u 21 osób ze względu na brak DNA a w przypadku polimorfizmu C311S genu *PON2* u 6 osób, także ze względu na brak DNA.

Wszystkie badane polimorfizmy nie wykazywały odchyłeń od równowagi Hardy–Weinberga, zarówno w całej analizowanej grupie, jak i oddzielnie w grupie chorych na SLA i grupie kontrolnej dla każdego z polimorfizmów ( $p > 0,05$ ).

Częstość poszczególnych genotypów i alleli w badanych grupach była porównywalna do rozkładu w innych populacjach należących do rasy kaukaskiej [Erlich i wsp., 2006].

### V.1.2. Polimorfizm Q192R genu *PONI*

W przeprowadzonym badaniu wykazano różnicę częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu Q192R genu *PONI* między grupą badaną i grupą kontrolną. Stwierdzono, że polimorfizm Q192R genu *PONI* ma związek z ryzykiem zachorowania na SLA w modelu addytywnym i recesywnym (Tabela 1).

**Tabela 1.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu Q192R genu *PONI* u chorych na SLA i u osób z grupy kontrolnej.

	SLA (n=261)	Grupa kontrolna (n=714)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
QQ	127 (48,7%)	399 (55,9%)	0,05*
QR	104 (39,8%)	267 (37,4%)	0,01**
RR	30 (11,5%)	48 (6,7%)	0,01***
<b>Allele</b>			
Q	358 (68,6%)	1065 (74,6%)	0,01‡
R	164 (31,4%)	363 (25,4%)	

- \* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu R (RR+QR vs QQ) w obu badanych grupach (grupa SLA i grupa kontrolna).
- \*\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu R (QQ+QR vs RR) w obu badanych grupach (grupa SLA i grupa kontrolna).
- \*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (grupa SLA i grupa kontrolna).
- ‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach Q i R w dwóch badanych grupach: SLA i grupie kontrolnej.

Nie wykazano różnicy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu Q192R genu *PONI* między chorymi z postacią opuszkową i chorymi z postacią kończynową SLA (Tabela 2).

**Tabela 2.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu Q192R genu *PONI* u chorych na SLA z postacią opuszkową i postacią kończynową.

	SLA postać opuszkowa (n=76)	SLA postać kończynowa (n=185)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
QQ	39 (51,3%)	88 (47,6%)	0,58*
QR	27 (35,5%)	77 (41,6%)	0,59**
RR	10 (13,2%)	20 (10,8%)	0,88***
<b>Allele</b>			
Q	105 (69,1%)	253 (68,4%)	0,88‡
R	47 (30,9%)	117 (31,6%)	

\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu R (RR+QR vs QQ) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową).

\*\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu R (QQ+QR vs RR) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową).

\*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową).

‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach Q i R w dwóch badanych grupach: chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową.

Podobnie, nie wykazano różnicy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu Q192R genu *PONI* między chorymi z postacią kończynową SLA i grupą kontrolną po zastosowaniu korekty Bonferroniego (Tabela 3).

**Tabela 3.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu Q192R genu *PONI* u chorych na SLA z postacią kończynową i u osób z grupy kontrolnej.

	SLA postać kończynowa (n=185)	Grupa kontrolna (n=714)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
QQ	88 (47,6%)	399 (55,9%)	0,04*
QR	77 (41,6%)	267 (37,4%)	0,06**
RR	20 (10,8%)	48 (6,7%)	0,02***
<b>Allele</b>			
Q	253 (68,4%)	1065 (74,6%)	0,02‡
R	117 (31,6%)	363 (25,4%)	

- \* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu R (RR+QR vs QQ) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna).
- \*\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu R (QQ+QR vs RR) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna).
- \*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (test trendu Cochran–Armitage) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna).
- ‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach Q i R w dwóch badanych grupach: chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna.



Po zastosowaniu korekty Bonferroniego nie wykazano także różnicy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu Q192R genu *PONI* między chorymi na SLA z postacią opuszkową w porównaniu do grupy kontrolnej (Tabela 4).

**Tabela 4.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu Q192R genu *PONI* u chorych na SLA z postacią opuszkową i u osób z grupy kontrolnej.

	SLA postać opuszkowa (n=76)	Grupa kontrolna (n=714)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
QQ	39 (51,3%)	399 (55,9%)	0,45*
QR	27 (35,5%)	267 (37,4%)	0,04**
RR	10 (13,2%)	48 (6,7%)	0,15***
<b>Allele</b>			
Q	105 (69,1%)	1065 (74,6%)	0,14‡
R	47 (30,9%)	363 (25,4%)	

- \* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu R (RR+QR vs QQ) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna).
- \*\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu R (QQ+QR vs RR) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna).
- \*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna).
- ‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach Q i R w dwóch badanych grupach: chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna.

### V.1.3. Polimorfizm L55M genu *PONI*

Badanie nie wykazało różnicy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu L55M genu *PONI* między grupą chorych na SLA i grupą kontrolną (Tabela 5).

**Tabela 5.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu L55M genu *PONI* u chorych na SLA i u osób z grupy kontrolnej.

	SLA (n=261)	Grupa kontrolna (n=713)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
LL	116 (44,4%)	293 (41,1%)	0,35*
LM	115 (44,1%)	345 (48,4%)	
MM	30 (11,5%)	75 (10,5%)	
<b>Allele</b>			
L	347 (66,48%)	931 (65,3%)	0,63‡
M	175 (33,52%)	495 (34,7%)	

- \* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu M (MM+ML vs LL) w obu badanych grupach (grupa SLA i kontrolna).
- \*\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu M (LL+LM vs MM) w obu badanych grupach (grupa SLA i kontrolna).
- \*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (grupa SLA i kontrolna).
- ‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach M i L w dwóch badanych grupach: SLA i grupie kontrolnej.

Badanie nie wykazało także różnicy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu L55M genu *PON1* między chorymi z postacią opuszkową i chorymi z postacią kończynową SLA (Tabela 6).

**Tabela 6.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu L55M genu *PON1* u chorych na SLA z postacią opuszkową i postacią kończynową.

	SLA postać opuszkowa (n=76)	SLA postać kończynowa (n=185)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
LL	29 (38,2%)	87 (47,0%)	0,19*
LM	42 (55,3%)	73 (39,5%)	0,11**
MM	5 (6,6%)	25 (13,5%)	0,83***
<b>Allele</b>			
L	100 (65,8%)	247 (66,8%)	0,83‡
M	52 (34,2%)	123 (33,2%)	

\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu M (MM+ML vs LL) w obu badanych grupach (chorzy na grupa SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową).

\*\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu M (LL+ML vs MM) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową).

\*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową).

‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach L i M w dwóch badanych grupach: chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową.

Nie stwierdzono różnicy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu L55M genu *PON1* między chorymi z postacią kończynową i grupą kontrolną (Tabela 7).

**Tabela 7.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu L55M genu *PON1* u chorych na SLA z postacią kończynową i u osób z grupy kontrolnej.

	SLA postać kończynowa (n=185)	Grupa kontrolna (n=713)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
LL	87 (47,0%)	293 (41,1%)	0,15*
LM	73 (39,5%)	345 (48,4%)	0,25**
MM	25 (13,5%)	75 (10,5%)	0,59***
<b>Allele</b>			
L	247 (66,8%)	931 (65,3%)	0,60‡
M	123 (33,2%)	495 (34,7%)	

\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu M (MM+ML vs LL) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna).

\*\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu M (LL+LM vs MM) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna).

\*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna).

‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach M i L w dwóch badanych grupach: chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna.

Podobnie, nie wykazano różnicy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu L55M genu *PON1* między chorymi na SLA z postacią opuszkową w porównaniu do grupy kontrolnej (Tabela 8).

**Tabela 8.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu L55M genu *PON1* u chorych na SLA z postacią opuszkową i u osób z grupy kontrolnej.

	SLA postać opuszkowa (n=76)	Grupa kontrolna (n=713)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
LL	29 (38,2%)	293 (41,1%)	0,62*
LM	42 (55,3%)	345 (48,4%)	0,28**
MM	5 (6,6%)	75 (10,5%)	0,90***
<b>Allele</b>			
L	100 (65,8%)	931 (65,3%)	0,90‡
M	52 (34,2%)	495 (34,7%)	

\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu M (MM+ML vs LL) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna).

\*\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu M (LL+LM vs MM) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna).

\*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (*Cochran–Armitage trend test*) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna).

‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach M i L w dwóch badanych grupach: chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna.

#### V.1.4. Polimorfizm –A162G genu *PONI*

Badanie nie wykazało różnicy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu –A162G genu *PONI* między grupą chorych na SLA i grupą kontrolną (Tabela 9).

**Tabela 9.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu –A162G genu *PONI* u chorych na SLA i u osób z grupy kontrolnej.

	SLA (n=259 )	Grupa kontrolna (n=694 )	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
GG	143 (55,2%)	394 (56,8%)	0,67*
GA	101 (39,0%)	259 (37,3%)	0,95**
AA	15 (5,8%)	41 (5,9%)	0,74***
<b>Allele</b>			
G	387 (74,7%)	1047 (75,4%)	0,75‡
A	131 (25,3%)	341 (24,6%)	

- \* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu A (AA+GA vs GG) w obu badanych grupach (grupa SLA i grupa kontrolna).
- \*\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu A (GG+GA vs AA) w obu badanych grupach (grupa SLA i grupa kontrolna).
- \*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (test trendu Cochran–Armitage) w obu badanych grupach (grupa SLA i grupa kontrolna).
- ‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach A i G w dwóch badanych grupach: SLA i grupie kontrolnej.

Stwierdzono natomiast różnicę częstości występowania genotypów polimorfizmu –A162G genu *PONI* między chorymi z postacią opuszkową i chorymi z postacią kończynową SLA w modelu dziedziczenia recesywnym i addytywnym. Wykazano także różnicę częstości występowania alleli tego polimorfizmu między badanymi grupami (Tabela 10).

**Tabela 10.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu –A162G genu *PONI* u chorych na SLA z postacią opuszkową i postacią kończynową.

	SLA postać opuszkowa (n=76)	SLA postać kończynowa (n=183)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
GG	49 (64,5%)	94 (51,4%)	0,05*
GA	27 (35,5%)	74 (40,4%)	0,01**
AA	0 (0,0%)	15 (8,2%)	0,01***
<b>Allele</b>			
G	125 (82,2%)	262 (71,6%)	0,01‡
A	27 (17,8%)	104 (28,4%)	

- \* Test Fishera (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu A (AA+GA vs GG) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową).
- \*\* Test Fishera (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu A (GG+GA vs AA) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową).
- \*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (test trendu Cochran–Armitage) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową).
- ‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach A i G w dwóch badanych grupach: chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową.

Nie wykazano różnicy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu –A162G genu *PON1* między chorymi z postacią kończynową SLA i grupą kontrolną (Tabela 11).

**Tabela 11.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu –A162G genu *PON1* u chorych na SLA z postacią kończynową i u osób z grupy kontrolnej.

	SLA postać kończynowa (n=183)	Grupa kontrolna (n=694)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
GG	94 (51,4%)	394 (56,8%)	0,19*
GA	74 (40,4%)	259 (37,3%)	0,26**
AA	15 (8,2%)	41 (5,9%)	0,13***
<b>Allele</b>			
G	262 (71,6%)	1047(75,4%)	0,13‡
A	104 (28,4%)	341(24,6%)	

\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu A (AA+GA vs GG) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna).

\*\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu A (GG+GA vs AA) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna).

\*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (test trendu Cochran–Armitage) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna).

‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach A i G w dwóch badanych grupach: chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna.



Po korekcie Bonferroniego nie wykazano także różnicy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu –A162G genu *PONI* między chorymi na SLA z postacią opuszkową i grupą kontrolną (Tabela 12).

**Tabela 12.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu –A162G genu *PONI* u chorych na SLA z postacią opuszkową i u osób z grupy kontrolnej.

	SLA postać opuszkowa (n=76)	Grupa kontrolna (n=694)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
GG	49 (64,5%)	394 (56,8%)	0,22*
GA	27 (35,5%)	259 (37,3%)	0,03**
AA	0 (0,0%)	41 (5,9%)	0,06***
<b>Allele</b>			
G	125 (82,2%)	1047 (75,4%)	0,07‡
A	27 (17,8%)	341 (24,6%)	

- \* Test Fishera (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu A (AA+GA vs GG) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna).
- \*\* Test Fishera (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu A (GG+GA vs AA) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna).
- \*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (test trendu Cochran–Armitage) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna).
- ‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach A i G w dwóch badanych grupach: chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna.

### V.1.5. Polimorfizm C311S genu *PON2*

W prezentowanym badaniu wykazano różnicę częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu C311S genu *PON2* między grupą chorych na SLA i grupą kontrolną.

Stwierdzono częstsze występowanie allelu C oraz genotypów z allelem C (CC i CS) w grupie chorych na SLA w porównaniu do grupy kontrolnej. Stwierdzono także, że polimorfizm C311S genu *PON2* ma związek z ryzykiem zachorowania na SLA w modelu dominującym i addytywnym (Tabela 13).

**Tabela 13.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu C311S genu *PON2* u chorych na SLA i u osób z grupy kontrolnej.

	SLA (n=260)	Grupa kontrolna (n=709)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
SS	132 (50,8%)	422 (59,5%)	0,01*
SC	104 (40,0%)	239 (33,7%)	0,20**
CC	24 (9,2%)	48 (6,8%)	0,01***
<b>Allele</b>			
S	368 (70,8%)	1083 (76,4%)	0,01‡
C	152 (29,2%)	335 (23,6%)	

- \* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu C (CC+CS vs SS) w obu badanych grupach (grupa SLA i grupa kontrolna).
- \*\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu C (SS+SC vs CC) w obu badanych grupach (grupa SLA i grupa kontrolna).
- \*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (test trendu Cochran–Armitage), który jest modyfikacją testu  $\chi^2$  z jednym stopniem swobody w obu badanych grupach (grupa SLA i grupa kontrolna).
- ‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach C i S w dwóch badanych grupach: SLA i grupie kontrolnej.

Nie wykazano różnicy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu C311S genu *PON2* między chorymi z postacią opuszkową i chorymi z postacią kończynową SLA (Tabela 14).

**Tabela 14.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu C311S genu *PON2* u chorych na SLA z postacią opuszkową i postacią kończynową.

	SLA postać opuszkowa (n=76)	SLA postać kończynowa (n=184)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
CC	40 (52,6%)	92 (50,0%)	0,70*
CT	29 (38,2%)	75 (40,8%)	0,99**
TT	7 (9,2%)	17 (9,2%)	0,77***
<b>Allele</b>			
C	109 (71,7%)	259 (70,4%)	0,76‡
T	43 (28,3%)	109 (29,6%)	

- \* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu C (CC+CS vs SS) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową).
- \*\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu C (SS+SC vs CC) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową).
- \*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (test trendu Cochran–Armitage), który jest modyfikacją testu  $\chi^2$  z jednym stopniem swobody w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową).
- ‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach C i S w dwóch badanych grupach: chorzy na SLA z postacią opuszkową i z postacią kończynową.

Po zastosowaniu korekty Bonferroniego nie wykazano różnicy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu C311S genu *PON2* między chorymi z postacią kończynową SLA i grupą kontrolną (Tabela 15).

**Tabela 15.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu C311S genu *PON2* u chorych na SLA z postacią kończynową i u osób z grupy kontrolnej.

	SLA postać kończynowa (n=184)	Grupa kontrolna (n=709)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
SS	92 (50,0%)	422 (59,5%)	0,02*
SC	75 (40,8%)	239 (33,7%)	0,25**
CC	17 (9,2%)	48 (6,8%)	0,02***
<b>Allele</b>			
S	259 (70,4%)	1083 (76,4%)	0,02‡
C	109 (29,6%)	335 (23,6%)	

- \* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu C (CC+CS vs SS) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna).
- \*\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu C (SS+SC vs CC) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna).
- \*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (test trendu Cochran–Armitage), który jest modyfikacją testu  $\chi^2$  z jednym stopniem swobody w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna).
- ‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach C i S w dwóch badanych grupach: chorzy na SLA z postacią kończynową i grupa kontrolna.

Nie wykazano różnicy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu C311S genu *PON2* między chorymi na SLA z postacią opuszkową i grupą kontrolną (Tabela 16).

**Tabela 16.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu C311S genu *PON2* u chorych na SLA z postacią opuszkową i u osób z grupy kontrolnej.

	SLA postać opuszkowa (n=76)	Grupa kontrolna (n=709)	Istotność statystyczna (p)
<b>Genotypy</b>			
SS	40 (52,6%)	422 (59,5%)	0,25*
SC	29 (38,2%)	239 (33,7%)	0,43**
CC	7 (9,2%)	48 (6,8%)	0,22***
<b>Allele</b>			
S	109 (71,7%)	1083 (76,4%)	0,20‡
C	43 (28,3%)	335 (23,6%)	

\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt dominujący allelu C (CC+CS vs SS) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna).

\*\* Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2), w którym testowano efekt recesywny allelu C (SS+SC vs CC) w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna).

\*\*\* Testowanie modelu addytywnego przy użyciu testu trendu (test trendu Cochran–Armitage), który jest modyfikacją testu  $\chi^2$  z jednym stopniem swobody w obu badanych grupach (chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna).

‡ Test  $\chi^2$  (jeden stopień swobody, tabela 2x2) wykonany na allelach C i S w dwóch badanych grupach: chorzy na SLA z postacią opuszkową i grupa kontrolna.

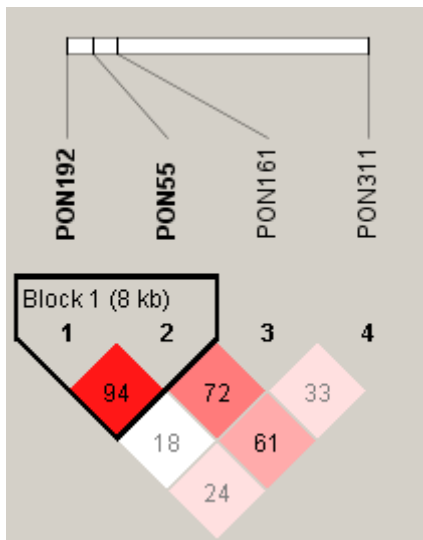
#### V.1.6. Analiza haplotypów

Za pomocą programu Haplowiew 4.1 [Barrett i wsp. 2005] sprawdzono czy cztery badane polimorfizmy znajdują się w nierównowadze sprzężeń. W tym celu obliczono wskaźnik  $r^2$  i  $D'$  (Tabela 17) i na tej podstawie wyznaczono haploblok (ryc. 4). Z wykonanych analiz wynika, że tylko loci polimorfizmu Q192R i L55M genu *PONI* są ze sobą sprzężone i dziedziczą się razem z wysokim prawdopodobieństwem ( $D'=0,94$ ).

**Tabela 17.** Współczynniki nierównowagi sprzężeń  $D'$  i  $r^2$ .

<b>Pary polimorfizmów</b>	<b><math>D'</math></b>	<b><math>r^2</math></b>
Q192R/L55M	0,9466	0,1738
Q192R/-A162G	0,1865	0,0043
Q192R/C311S	0,2486	0,0560
L55M/-A162G	0,7244	0,0905
L55M/C311S	0,6154	0,0671
-A162G/C311S	0,3336	0,1082

**Ryc. 4.** Graficzne przedstawienie LD. W kwadratach są zamieszczone wartości  $D'$  pomnożone przez 100.



Wartość  $p$  dla ogólnego testu asocjacji haplotypów złożonych z polimorfizmu Q192R i L55M genu *PONI* z ryzykiem zachorowania na SLA wyniosła 0,02. W związku z tym przeprowadzono dalszą analizę związku poszczególnych haplotypów z ryzykiem zachorowania.

Wartości  $p$  testów asocjacji dla poszczególnych haplotypów z ryzykiem zachorowania umieszczono w Tabeli 18.

Przeprowadzona analiza wykazała, że haplotyp RL występował częściej w grupie chorych na SLA w porównaniu do grupy kontrolnej, co oznacza, że jest haplotypem ryzyka. Haplotypy QM i QL nie wykazywały znamiennej zależności z chorobą. Jednak wartość  $p$  testu asocjacji dla haplotypu QL (0,06) może wskazywać na jego funkcję ochronną. Badanie na większej liczbie osób mogłoby wykazać ściślejszy związek tego haplotypu z ryzykiem wystąpienia SLA. Według estymacji komputerowej haplotyp RM nie występował w badanych grupach.

**Tabela 18.** Częstość występowania haplotypów dwóch wariantów polimorficznych Q192R i L55M genu *PONI* u chorych na SLA i w grupie kontrolnej.

<b>Haplotypy <i>PONI</i></b>	<b>Grupa chorych</b>	<b>Grupa kontrolna</b>	<b>Istotność statystyczna (p)</b>
QM	33,1%	34,4%	0,59
RL	31,0%	25,0%	0,01
QL	35,8%	40,6%	0,06
RM	0,0%	0,0%	



### V.1.7. Modele logistyczne

Analiza haplotypów wykazała, że częstość występowania haplotypu ryzyka (RL) u chorych na SLA wynosi 31,0% i jest bliska częstości występowania samego allelu R, która wynosi 31,4%. Podobnie, częstość haplotypu ryzyka w grupie kontrolnej (25,0%) jest prawie identyczna jak częstość allelu R w tej grupie (25,4%). Z komputerowej analizy haplotypów wynika również, że haplotyp złożony z allelu RM nie jest obecny w populacji badanej. Z tych powodów uznano, że wykonanie analizy regresji logistycznej w celu sprawdzenia, czy czynniki genetyczne, których znaczenie dla ryzyka choroby stwierdzono w analizie jednoczynnikowej, można przeprowadzić z uwzględnieniem genotypu RR, a wyniki będą się odnosić do haplotypów RL.

Do modelu regresji logistycznej włączono wiek i płeć, oraz genotyp RR genu *PON1* i genotyp z allelem C genu *PON2* (CC i CS), których znaczenie dla ryzyka SLA udokumentowano w analizie jednoczynnikowej i stwierdzono, że genotyp RR genu *PON1* i genotyp z allelem C genu *PON2* są niezależnymi czynnikami ryzyka zachorowania na SLA (Tabela 19).

**Tabela 19.** Model regresji logistycznej uwzględniający genotyp RR polimorfizmu Q192R genu *PON1* oraz genotyp z allelem C (CC i CS) polimorfizmu C311S genu *PON2*, których znaczenie dla zachorowania na SLA określono w analizie jednoczynnikowej.

	Iloraz szans (OR)	Przedział ufności (95% CI)	Istotność statystyczna (p)
Wiek (lata)	1,00	1,00–1,01	0,35
Płeć (płeć żeńska)	0,79	0,59–1,05	0,10
Genotyp RR	1,65	1,01–2,70	0,04
Genotyp z allelem C (CC+CS)	1,35	1,01–1,81	0,04

## V.2. Badania aktywności paraoksonaz

Badanie aktywności PON1 względem paraoksonu przeprowadzono u 63 chorych na SLA oraz 57 osób z grupy kontrolnej, natomiast względem octanu fenylu u 62 chorych i 57 osób z grupy kontrolnej. Wiek chorych w momencie wystąpienia pierwszych objawów wahał się w przedziale od 23 do 84 lat (średnia wieku:  $54,7 \pm 13,2$  lat). W grupie badanej było 29 kobiet (46,0%). U 47 chorych na SLA (74,5%) stwierdzono postać kończynową choroby, a u 16 osób (25,5%) – postać opuszkową.

W grupie kontrolnej wiek wahał się w przedziale od 28 do 70 lat (średnia wieku:  $47,2 \pm 10,2$  lat). W grupie tej było 33 kobiety (58,0%).

Grupa chorych na SLA i grupa kontrolna nie różniły się pod względem rozkładu płci ( $p=0,20$ ). Stwierdzono natomiast, że osoby chore na SLA były starsze ( $p<0,01$ ).

W grupie badanej informacje dotyczące obecności hipercholesterolemii, cukrzycy, nadciśnienia tętniczego i choroby niedokrwiennej serca zebrano u 57 chorych (90,0%), a informacje dotyczące nałogu palenia papierosów u 42 chorych (66,7%).

U jednej osoby z grupy kontrolnej nie ustalono wywiadu na temat chorób współistniejących.

Nie stwierdzono różnicy statystycznej między badanymi grupami w odniesieniu do częstości występowania hipercholesterolemii ( $p=0,17$ ), cukrzycy ( $p=0,37$ ), nadciśnienia tętniczego ( $p=0,11$ ) oraz choroby niedokrwiennej serca ( $p=0,74$ ). Nie było także różnic w częstości palenia papierosów aktualnie ( $p=0,14$ ) i kiedykolwiek ( $p=0,61$ ).

Badanie polimorfizmu C311S genu *PON2* nie pozwoliło na określenie genotypu u jednego chorego, a w przypadku polimorfizmu L55M genu *PONI* u jednej osoby z grupy kontrolnej.

Profil genetyczny (rozkład genotypów i alleli poszczególnych polimorfizmów: Q192R, L55M, –A162G genu *PONI* oraz C311S genu *PON2* chorych na SLA oraz osób z grupy kontrolnej, u których badano aktywność PON1 przedstawiono w tabeli 20.

**Tabela 20.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmów Q192R, L55M i –A162G genu *PON1* oraz C311S genu *PON2* w grupie chorych na SLA i w grupie kontrolnej.

Wariant polimorficzny	Chorzy na SLA		Grupa kontrolna	
Q192R	n=63		n=57	
	QQ	n=29 (46,0%)	QQ	n=30 (52,6 %)
	QR	n=26 (41,3%)	QR	n=23 (40,4%)
	RR	n=8 (12,7%)	RR	n=4 (7,0%)
L55M	n=63		n=56	
	LL	n=29 (46,0%)	LL	n=27 (48,2 %)
	LM	n=26 (41,3%)	LM	n=23 (41,1 %)
	MM	n=8 (12,7%)	MM	n=6 (10,7%)
–A162G	n=63		n=57	
	GG	n=36 (57,1%)	GG	n=37 (65,0%)
	GA	n=23 (36,5%)	GA	n=17 (29,8%)
	AA	n=4 (6,4%)	AA	n=3 (5,2%)
C311S	n=62		n=57	
	SS	n=37 (60,0%)	SS	n=36 (63,2%)
	CS	n=20 (32,0%)	CS	n=14 (24,5%)
	CC	n=5 (8,0%)	CC	n=7 (12,3%)

Oznaczenia aktywności względem paraoksonu oraz octanu fenylu wykonano dwukrotnie dla każdej próbki. Ocena korelacji między wynikami aktywności PON1 względem paraoksonu uzyskanymi podczas pierwszego i drugiego oznaczenia wykazała, że wartość współczynnika R jest bardzo wysoka i wynosi 0,92,  $p < 0,05$ . Podobnie, bardzo wysoką wartość współczynnika korelacji R ( $R=0,86$ ),  $p < 0,05$  uzyskano przy ocenie związku między wynikami aktywności względem octanu fenylu uzyskanymi podczas pierwszego i drugiego oznaczenia. Dla każdej oznaczonej próbki wyliczono średnią wartość aktywności enzymatycznej z tych dwóch pomiarów.

Analiza korelacji czasu przechowywania próbek i wartości średniej aktywności PON1 względem paraoksonu wykazała obecność istotnej zależności między tymi zmiennymi ( $R=(-0,56)$ ;  $p < 0,05$ ). Szczegółowa analiza z uwzględnieniem różnych przedziałów czasu przechowywania wykazała, że taka korelacja utrzymuje się tylko w przypadku, gdy czas przechowywania wynosił rok i dłużej ( $R=(-0,41)$ ;  $p < 0,05$ ). W przypadku próbek przechowywanych poniżej roku nie stwierdzono związku między czasem przechowywania a średnią aktywnością PON1 względem paraoksonu ( $R=(-0,33)$ ;  $p > 0,05$ ). Porównanie średnich wartości aktywności PON1 względem paraoksonu między pacjentami, których próbki

przechowywano do roku i ponad rok wykazało, że osoby z tej drugiej grupy mają znacznie niższą aktywność PON1 względem paraoksonu.

Otrzymane wyniki spowodowały, że porównanie aktywności PON1 względem paraoksonu przeprowadzono tylko u pacjentów i osób z grupy kontrolnej, u których nie obserwowano korelacji czasu przechowywania z aktywnością próbek. Ostatecznie analizie poddano próbki od 23 osób z rozpoznaniem SLA i 57 osób z grupy kontrolnej i stwierdzono brak różnicy aktywności PON1 względem paraoksonu między pacjentami i grupą kontrolną (Tabela 21).

Analiza regresji liniowej u pacjentów, których próbki surowicy przechowywano poniżej roku, wykazała, że wiek, płeć ani czas od zachorowania do pobrania krwi nie miały wpływu na aktywność PON1 względem paraoksonu. Podobnie, u osób z grupy kontrolnej nie stwierdzono wpływu wieku i płci na aktywność PON1 względem paraoksonu.

Analiza korelacji czasu przechowywania próbek i wartości średniej aktywności PON1 względem octanu fenylu nie wykazała istnienia takiej zależności ( $R=0,10$ ;  $p>0,05$ ).

Porównanie średniej aktywności PON1 względem octanu fenylu u pacjentów i w grupie kontrolnej wykazało brak różnicy między tymi grupami (Tabela 22).

Analiza regresji liniowej u pacjentów wykazała, że wiek, płeć ani czas od zachorowania do pobrania krwi nie miały wpływu na aktywność PON1 względem octanu fenylu. Podobnie, u osób z grupy kontrolnej nie stwierdzono wpływu wieku i płci na aktywność PON1 względem octanu fenylu.

**Tabela 21.** Aktywność PON1 względem paraoksonu w grupie chorych oraz grupie kontrolnej (test regresji liniowej).

	<b>SLA Próbki przechowywane do roku (n=23)</b>	<b>SLA Próbki przechowywane ponad rok (n=40)</b>	<b>Grupa kontrolna (n=57)</b>	<b>Istotność statystyczna (p)</b>
<b>Aktywność PON1 względem paraoksonu [U/mL]</b>	120,91±58,77 min=33,03 max=246,38	75,05±76,30 min=3,31 max=404,20	117,16±101,88 min=1,06 max=450,89	0,35

**Tabela 22.** Aktywność PON1 względem octanu fenylu w grupie chorych oraz grupie kontrolnej (test regresji liniowej).

	<b>SLA (n=62)</b>	<b>Grupa kontrolna (n=57)</b>	<b>Istotność statystyczna (p)</b>
<b>Aktywność PON1 względem octanu fenylu [U/mL]</b>	44,93±26,51 min=12,08 max=127,69	52,48±26,25 min=13,78 max=129,91	0,08

Ponieważ aktywność PON1 względem paraoksonu i octanu fenylu nie różniły się pomiędzy osobami chorymi na SLA i osobami z grupy kontrolnej, wpływ poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów PON1 na te dwa rodzaje aktywności zbadano u wszystkich uczestników badania razem.

Stwierdzono, że aktywność PON1 względem paraoksonu była zdeterminowana przez polimorfizm Q192R i L55M genu *PON1*. Osoby z genotypami QQ i MM miały najniższą aktywność, a osoby z genotypami RR i LL – najwyższą. Polimorfizm –A162G genu *PON1* nie miał wpływu na aktywność PON1 (Tabela 23).

**Tabela 23.** Wartości mediany oraz dolnego i górnego kwartyłu aktywności PON1 względem paraoksonu obliczona dla poszczególnych genotypów trzech badanych polimorfizmów genu *PON1*.

<b>Polimorfizm Q192R genu <i>PON1</i></b>	<b>QQ [A] N=40</b>	<b>QR [B] N=33</b>	<b>RR [C] N=7</b>	<b>p*</b>
Aktywność PON1 względem paraoksonu	71,61 [46,60–88,63]	157,17 [112,72–206,69]	229,88 [149,52–332,22]	A–B: 0,00002 A–C: 0,001 B–C: n.s.
<b>Polimorfizm L55M genu <i>PON1</i></b>	<b>LL [A] N=40</b>	<b>LM [B] N=30</b>	<b>MM [C] N=9</b>	
Aktywność PON1 względem paraoksonu	142,40 [74,99–189,03]	82,85 [57,98–141,76]	55,32 [35,01–85,15]	A–B: n.s. A–C: 0,03 B–C: n.s.
<b>Polimorfizm –A162G genu <i>PON1</i></b>	<b>GG [A] N=51</b>	<b>GA [B] N=25</b>	<b>AA [C] N=4</b>	
Aktywność PON1 względem paraoksonu	87,62 [57,98 –154,16]	86,85 [51,27–169,52]	172,45 [91,94–291,44]	A–B: n.s. A–C: n.s. B–C: n.s.

\* test Kruskala–Wallisa

Stwierdzono, że aktywność PON1 względem octanu fenylu była zdeterminowana również przez polimorfizm Q192R i L55M genu *PON1*. Osoby z genotypami QQ i MM miały najniższą aktywność, a osoby z genotypami RR i LL – najwyższą. Polimorfizm –A162G genu *PON1* nie miał wpływu na aktywność PON1 (Tabela 24).

**Tabela 24.** Wartości mediany oraz dolnego i górnego kwartyłu aktywności PON1 względem octanu obliczona dla poszczególnych genotypów trzech badanych polimorfizmów genu PON1.

<b>Polimorfizm Q192R genu <i>PON1</i></b>	<b>QQ [A] N=58</b>	<b>QR [B] N=49</b>	<b>RR [C] N=12</b>	<b>p*</b>
Aktywność PON1 względem octanu fenylu	25,54 [20,26–50,05]	52,30 [41,11–65,30]	70,06 [60,98–87,62]	A–B: 0,00001 A–C: 0,000005 B–C: n.s.
<b>Polimorfizm L55M genu <i>PON1</i></b>	<b>LL [A] N=56</b>	<b>LM [B] N=49</b>	<b>MM [C] N=13</b>	
Aktywność PON1 względem octanu fenylu	56,77 [33,73 – 68,82]	41,40 [24,80–53,52]	23,58 [17,10–42,97]	A–B: 0,01 A–C: 0,0008 B–C: n.s.
<b>Polimorfizm –A162G genu <i>PON1</i></b>	<b>GG [A] N=72</b>	<b>GA [B] N=40</b>	<b>AA [C] N=7</b>	
Aktywność PON1 względem octanu fenylu	43,48 [25,01–59,00]	51,20 [25,62 – 67,22]	46,60 [30,43–89,33]	A–B: n.s. A–C: n.s. B–C: n.s.

\* test Kruskala–Wallisa

## VI. DYSKUSJA

### VI.1. Związek polimorfizmów genu *PON1* i *PON2* z ryzykiem zachorowania na SLA

Zaburzenie fizjologicznej równowagi między produkcją a usuwaniem reaktywnych form tlenu prowadzi do stresu oksydacyjnego. Jego konsekwencją jest uszkodzenie lipidów błon komórkowych, kwasów nukleinowych oraz inaktywacja białek, co może prowadzić do nieodwracalnego uszkodzenia narażonych na stres komórek. Ze względu na duże znaczenie paraoksonaz w ochronie tkanek przed działaniem wolnych rodników tlenowych oraz związków toksycznych, ich rola w schorzeniach takich jak nowotwory, choroby zapalne, choroby układu krążenia oraz choroby zwyrodnieniowe, była przedmiotem wielu badań [Gendźwiłł, 2007, Łuszczewski i wsp., 2007, Rutkowski i wsp., 2007, Kell, 2009]. Jednym z zadań przeprowadzonego badania była ocena znaczenia wybranych polimorfizmów genów paraoksonaz dla ryzyka wystąpienia SLA, która stanowi użyteczny model choroby zwyrodnieniowej układu nerwowego. SLA przebiega szybciej niż inne choroby zwyrodnieniowe, takie jak choroba Parkinsona czy choroba Alzheimera. Z tego powodu można przypuszczać, że w SLA nieprawidłowości w zakresie produkcji wolnych rodników i funkcjonowania enzymów antyoksydacyjnych są znacznie wyraźniejsze niż w chorobach przebiegających wolniej.

Założeniem prezentowanej pracy było sprawdzenie czy ryzyko zachorowania na SLA jest wynikiem genetycznie uwarunkowanej, mniejszej aktywności paraoksonaz względem utlenionych lipidów i związków fosforoorganicznych.

Dotychczas zidentyfikowano ponad 300 polimorfizmów w obrębie genów *PON*. Wybór polimorfizmów genów *PON* do aktualnego badania wynikał z wcześniejszych badań wskazujących na ich znaczenie jako czynników ryzyka różnych chorób, w których etiopatogenezie zasadniczą rolę odgrywa stres oksydacyjny. Związek między polimorfizmem Q192R genu *PON1* oraz C311S genu *PON2* z chorobą niedokrwienną serca wykazali między innymi Sanghera i wsp. [1998]. W badaniu przeprowadzonym przez tych autorów wykazano, że ryzyko wystąpienia choroby niedokrwiennej serca u nosicieli allelu S polimorfizmu C311S genu *PON2* i nosicieli allelu R polimorfizmu Q192R genu *PON1* wzrastało ponad 3 krotnie (OR=3,6, 95% CI: 2,6–4,6; p=0,011). Także badanie przeprowadzone przez Sen–Banerjee, Siles i Campos [2000] wykazało związek polimorfizmu Q192R genu *PON1* z ryzykiem



wystąpienia zawału serca. W grupie chorych znamienne częściej występował allel R polimorfizmu Q192R genu *PON1* ( $p=0,008$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej. Obecność allelu R polimorfizmu Q192R wiązała się z 1,5 razy większym ryzykiem wystąpienia zawału serca (OR=1,51, 95% CI: 1,13–2,03) w porównaniu do sytuacji, gdy występował allel Q w tej pozycji. Podobne badania prowadzono wśród chorych, którzy przebyli udar mózgu. Ranade i wsp. [2005] wykazali, że osoby będące heterozygotami QR polimorfizmu Q192R genu *PON1* miały około 2,5 razy większe ryzyko wystąpienia udaru niedokrwienego mózgu (OR=2,41, 95% CI: 1,42–4,10), a homozygoty RR – około trzy razy większe (OR=2,84, 95% CI: 1,33–6,01) w porównaniu do homozygot QQ. Polimorfizm Q192R genu *PON1* jako jedyny z 14 badanych polimorfizmów genów *PON1*, *PON2* i *PON3* był istotnie związany z ryzykiem wystąpienia udaru niedokrwienego mózgu ( $p=0,002$ ).

Ze względu na udowodniony udział stresu oksydacyjnego w procesie zwyrodnieniowym, związek z genami paraoksonaz badano m.in. w chorobie Alzheimera i w chorobie Parkinsona. Erlich i współpracownicy [2006] wykazali istnienie zależności między polimorfizmem –A162G genu *PON1*, a chorobą Alzheimera. Natomiast metaanaliza badań oceniających związek polimorfizmów genów paraoksonaz z ryzykiem zachorowania na chorobę Parkinsona przeprowadzona przez Zintzaras i Hadjigeorgiu [2004] wykazała, że obecność allelu M polimorfizmu L55M genu *PON1* wiązała się z 1,32 razy większym ryzykiem wystąpienia choroby niż obecność allelu L (OR=1,32, 95% CI: 1,10–1,59). Obecność genotypu z conajmniej jednym allelem M (MM+LM) polimorfizmu L55M genu *PON1* wiązała się z 1,5 razy większym ryzykiem wystąpienia choroby Parkinsona (OR=1,5, 95% CI: 1,16–1,95) w porównaniu do osób z genotypem LL polimorfizmu L55M genu *PON1*.

Najważniejszym wynikiem uzyskanym w prezentowanym badaniu było wykazanie, że genotyp RR polimorfizmu Q192R genu *PON1* oraz genotyp z allelem C (CC+CS) polimorfizmu C311S genu *PON2* są niezależnymi czynnikami ryzyka zachorowania na SLA i zwiększają to ryzyko odpowiednio 1,65 razy i 1,35 razy.

Ponadto stwierdzono, że polimorfizm Q192R genu *PON1* jest w nierównowadze sprzężeń z polimorfizmem L55M genu *PON1*. Analiza asocjacji haplotypów utworzonych z polimorfizmu Q192R i L55M genu *PON1* z ryzykiem zachorowania określiła haplotyp RL jako haplotyp ryzyka. Ponieważ częstość występowania allelu R i haplotypu RL w grupie

chorych i kontrolnej była identyczna, ustalono, że efekt haplotypu RL jest taki sam jak allelu R. Obecne badanie nie wykazało związku samego wariantu polimorficznego L55M genu *PONI* z ryzykiem zachorowania na SLA. Nie stwierdzono także różnicy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu –A162G genu *PONI* między chorymi na SLA i grupą kontrolną.

W 2006 roku, w czasopiśmie *Neurology* przedstawiono wstępne wyniki badania przeprowadzonego przez zespół badawczy Kliniki Neurologii dotyczącego związku niektórych wariantów genów paraoksonaz z ryzykiem zachorowania na SLA. Już wówczas na znacznie mniejszym materiale (185 pacjentów z SLA i 437 osób z grupy kontrolnej) wykazano, że istnieje związek między polimorfizmem Q192R genu *PONI* i C311S genu *PON2*, a ryzykiem SLA [Słowik i wsp., 2006]. Częstsze występowanie allelu R polimorfizmu Q192R w pozycji 192 genu *PONI* wykazali także Wills i wsp. [2008] w populacji amerykańskiej. Badanie to przeprowadzono u 140 chorych na SLA i 153 osobach z grupy kontrolnej. Wykazano, że genotyp RR występował znamienne częściej w grupie chorych na SLA ( $p=0,004$ ). W badaniu przeprowadzonym na populacji australijskiej (143 osoby chore na SLA i 143 osoby zdrowe), mającej korzenie angloceltyckie (rasa kaukaska), stwierdzono, że osoby, które były narażone na wysokie dawki herbicydów i pestycydów miały zwiększone ryzyko zachorowania na SLA, jeżeli były nosicielami allelu R w pozycji 192 genu *PONI* [Morahan i wsp., 2007]. Ta grupa badawcza wykazała także różnicę częstości występowania genotypów polimorfizmów miejsca promotorowego genu *PONI*, tzn. –C108T i –A162G, między chorymi na SLA a grupą kontrolną [Morahan i wsp., 2007]. Saeed i wsp. [2006] przeprowadzili badanie na grupie 1 891 osób rasy kaukaskiej, wywodzących się z populacji północnoamerykańskiej. W grupie badanej było 284 osoby chore na SLA, pozostali uczestnicy to 203 trójki obejmujące parę zdrowych rodziców i chore dziecko, 247 par rodzeństw, z których jedno było chore i jedno zdrowe i 504 niespokrewnione osoby zdrowe. Autorzy wykazali związek między haplotypem złożonym z polimorfizmów genów *PON2* i *PON3* a ryzykiem SLA (haplotyp AACT chronił przed ryzykiem zachorowania,  $p=0,00007$ , natomiast haplotyp AGCC zwiększał ryzyko zachorowania,  $p=0,026$ ). Ponadto, w badaniu przeprowadzonym na grupie złożonej z chorych na SLA oraz ich zdrowych rodziców wykazano związek polimorfizmu rs11981433 genu *PON2* i polimorfizmu rs10487132 genu *PON3* z ryzykiem SLA. Oba polimorfizmy były w silnej nierównowadze sprzężeń. Valdmanis i wsp. [2008] w populacji kanadyjskiej (159 chorych na SLA i 95 osób zdrowych)

i francuskiej (480 chorych i 475 osób zdrowych) oraz populacji kanadyjskiej, francuskiej łącznie razem ze szwedzką (558 chorych i 506 osób zdrowych), wykryli związek między haplotypem utworzonym z polimorfizmów zlokalizowanych w obrębie C–końcowego odcinka genu *PON2* (zawierającego m.in. miejsce polimorficzne 311), a ryzykiem zachorowania na SLA ( $p=0,0000017$ ). W badaniu Cronina i wsp. [2007] nie wykazano związku między polimorfizmem Q192R genu *PON1* ani C311S genu *PON2*, a ryzykiem zachorowania na SLA w populacji irlandzkiej. Stwierdzono natomiast znamienne częstsze występowanie allelu M polimorfizmu L55M genu *PON1* ( $p=0.006$ ) oraz podobnie jak w badaniu Saeed i wsp. [2006] allelu G polimorfizmu rs10487132 genu *PON3* ( $p=0,03$ ) w grupie chorych na SLA w porównaniu do grupy kontrolnej. Badanie przeprowadzono u 221 chorych na SLA i u 202 osób z grupy kontrolnej. Landers i wsp. [2008] przeprowadzili badanie u 597 chorych na SLA i u 692 osób z grupy kontrolnej, wywodzących się z populacji zamieszkującej Stany Zjednoczone. Wszyscy uczestnicy byli rasy kaukaskiej. W badaniu tym stwierdzono, że polimorfizm rs987539 zlokalizowany w intronie 6 genu *PON2* oraz polimorfizm rs2074351, zlokalizowany 90 bp powyżej początku egzonu 2 genu *PON1*, występowały znacznie częściej u chorych na SLA niż w grupie kontrolnej ( $p$  odpowiednio 0,0006 i 0,0007). Ponadto, zidentyfikowano haplotyp złożony z pięciu polimorfizmów, między innymi polimorfizmu –A162G genu *PON1*, który wykazywał silny związek z ryzykiem zachorowania ( $p=0,00002$ ).

Jedyną jak dotąd negatywną badanie oceniającą związek wariantów polimorficznych w genach *PON* z ryzykiem zachorowania na SLA przeprowadziła Kasperaviciute i wsp. [2007]. Badanie przeprowadzono u 822 chorych na SLA i 872 osób zdrowych narodowości brytyjskiej. Wśród ponad 1200 wariantów polimorficznych w 134 genach, w tym 43 wariantów w genach *PON*, wybranych przez autorów jako potencjalne czynniki ryzyka SLA nie wykazano związku badanych polimorfizmów w genach *PON*, a ryzykiem zachorowania. Wśród tych polimorfizmów były 3 z 4 analizowanych w prezentowanej pracy (Q192R, L55M genu *PON1* i C311S genu *PON2*).

Metaanaliza wszystkich badań oceniających związek polimorfizmów genów *PON* z ryzykiem zachorowania na SLA nie potwierdziła związku żadnego z wariantów z ryzykiem zachorowania na SLA. Metaanaliza objęła 4037 chorych na SLA i 4609 osób z grupy kontrolnej, którzy uczestniczyli w jedenastu dotychczas wykonanych badaniach. Bez uwzględnienia korekty biorącej pod uwagę testowanie wielu hipotez (korekta Bonferroniego)

okazało się, że polimorfizm Q192R genu *PONI* jest czynnikiem ryzyka zachorowania na SLA (OR=1,25, 95% CI: 1,07–1,45, p=0,004), niestety uwzględnienie tej korekty spowodowało, że wartość p poniżej której wynik uznany byłby za istotny powinna wynosić 0,001. Wyniki tej analizy skłoniły jej autorów do stwierdzenia, że polimorfizmy genów *PON* nie mają związku z ryzykiem zachorowania na SLA [Wills i wsp., 2009]. Na łamach czasopisma *Neurology* w komentarzu redakcyjnym, który stanowił odpowiedź na tą publikację, pojawiły się argumenty przeciwko tak restrykcyjnej z punktu widzenia statystyki interpretacji wyników [Greenberg, Stewart i Rowland, 2009]. Po pierwsze, zastosowanie przez autorów tej metaanalizy tak znacznego obniżenia wartości p ze względu na wielokrotne testowanie, mogło doprowadzić do zatuszowania istniejącego, choć niewielkiego wpływu badanego polimorfizmu na ryzyko choroby. Nie można wykluczyć, że ten związek istnieje, ale brak uwzględnienia także różnorodności fenotypowej spradycznej postaci SLA w różnych obszarach geograficznych mogło tego związku nie wykazać. Kolejnym argumentem wskazującym na możliwą słabość tej metaanalizy jest fakt, że na jej ostateczny wynik może mieć wpływ różnica frekwencji alleli poszczególnych polimorfizmów między populacjami [Greenberg, Stewart i Rowland, 2009].

Należy także zwrócić uwagę, że żadne z sześciu badań przeszukiwania całego genomu ludzkiego u chorych na SLA nie wykazało większej częstości polimorfizmów w genach *PON* w stosunku do grupy kontrolnej [Schymick i wsp., 2007, Dunckley i wsp., 2007, van Es i wsp., 2007, van Es i wsp., 2008, Cronin i wsp., 2008, Chio i wsp., 2009]. Badania te były przeprowadzone na stosunkowo niewielkich grupach. Schymick i wsp. [2007] przeprowadzili badanie częstości występowania 555 352 polimorfizmów u 276 chorych na SLA i u 271 osób z grupy kontrolnej. Dunckley i wsp. [2007] początkowo zbadali częstość występowania 766 955 polimorfizmów w grupie 386 chorych na SLA i u 542 osób z grupy kontrolnej, a następnie przetestowali znaczenie wykrytych w tym badaniu polimorfizmów ryzyka w dwu grupach replikacyjnych (766 chorych i 750 osób z grupy kontrolnej oraz 135 chorych i 275-osobowej grupie kontrolnej). Z kolei van Es i wsp. [2007] w pierwszym etapie przebadali częstość występowania 311 946 polimorfizmów u 461 chorych i u 450 osób z grupy kontrolnej wywodzących się z populacji holenderskiej. Następnie zidentyfikowane polimorfizmy ryzyka (500) przetestowali w grupie replikacyjnej, w skład której wchodziło 272 chorych na SLA i 336 osób zdrowych wywodzących się z populacji holenderskiej oraz 291 chorych i 267 osób zdrowych z populacji belgijskiej, a w trzecim etapie przeanalizowali znaczenie polimorfizmów ryzyka (polimorfizmy dla których wartość p była poniżej 0,1) u

313 chorych i 303 osób z grupy kontrolnej wywodzących się z populacji szwedzkiej. W kolejnej pracy van Es i wsp. [2008] przetestowali znaczenie zidentyfikowanych wcześniej polimorfizmów w liczniejszych grupach replikacyjnych tzn. u 272 chorych i 336 osobach zdrowych wywodzących się z populacji holenderskiej, 467 chorych i 437 osobach zdrowych z populacji szwedzkiej oraz u 291 chorych i 420 osobach zdrowych z populacji belgijskiej. Cronin i wsp. [2008] w grupie 222 chorych i 217 osób zdrowych z grupy kontrolnej wywodzącej się z populacji irlandzkiej zbadali częstość występowania 540 466 polimorfizmów, a zidentyfikowane polimorfizmy ryzyka przetestowali w grupie replikacyjnej złożonej z 958 chorych i 932 osób z grupy kontrolnej (grupa replikacyjna stanowiła osoby wywodzące się z populacji amerykańskiej i holenderskiej wcześniej wykorzystanej w pracy Schymick i wsp. [2007] i van Es i wsp. [2007]). Następnie autorzy dobrali kolejną grupę replikacyjną wywodzącą się z populacji polskiej, w skład której wchodziło 218 chorych na SLA i 356 osób zdrowych [Cronin i wsp., 2009]. Chio i wsp. [2009] początkowo zbadali częstość występowania 545 066 polimorfizmów w grupie 553 osób chorych i 2 338 osób zdrowych z grupy kontrolnej, następnie przetestowali zidentyfikowane polimorfizmy ryzyka w trzech niezależnych grupach obejmujących w sumie 2 160 osób chorych i 3 008 osób z grupy kontrolnej, a w trzecim etapie przeanalizowali znaczenie polimorfizmów ryzyka u pacjentów i osób z grupy kontrolnej razem. Niestety żadne z badań przeszukiwania genomu ludzkiego w SLA nie wykazało istnienia polimorfizmów ryzyka przy wymaganej w tego typu badaniach wartości  $p$  poniżej 0,00000001 [Mullen i wsp., 2009]. Można więc z dużym prawdopodobieństwem uznać, że uzyskane wyniki mogą być przypadkowe. Mimo tego, w oczekiwaniu na ich metaanalizę poniżej przedstawiono szczegółowo wyniki uzyskanych badań przeprowadzonych tą metodą.

Badanie wykonane przez Schymick i wsp. [2007] wykazało związek 34 polimorfizmów z SLA przy wartości istotności statystycznej poniżej 0,0001, ale najniższa wartość  $p$  jaką uzyskano wyniosła 0,000001. Zidentyfikowane w tym badaniu regiony, które mogłyby wskazywać na związek z chorobą obejmowały w dużej mierze geny związane z regulacją i metabolizmem cytoszkieletu aktynowego oraz transportem aksonalnym. Polimorfizm (rs4363506), który wykazywał najsilniejszy związek z chorobą był zlokalizowany w sąsiedztwie genu *DOCK1* ( $p=0,000001$ ), który odgrywa rolę we wzroście neuronów. Spośród zidentyfikowanych 10 loci genowych związanych z SLA ( $p<0,05$ ) przez Dunckley i wsp. [2007] najsilniejszy związek z chorobą wykazywał rejon zawierający niescharakteryzowany do tej pory gen *FLJ10986* ( $p=0,0003$ ). Białko będące produktem tego genu zostało

zidentyfikowane przez autorów badania w rdzeniach kręgowych oraz płynie mózgowo-rdzeniowym osób chorych oraz z grupy kontrolnej. Pozostałe zidentyfikowane w tym badaniu geny w większości były związane z funkcją cytoszkieletu. Najsilniejszy związek między zidentyfikowanym polimorfizmem a SLA ( $p=0,0007$ ) w badaniu van Es i wsp. [2007] stwierdzono dla polimorfizmu rs2306677 genu *ITPR2* (ang. *inositol 1,4,5-triphosphate receptor 2 gene*). Gen ten odgrywa rolę w neurotransmisji związanej z glutaminianem oraz w regulacji wewnątrzneuronalnej homeostazy jonów wapnia. Białko będące jego produktem jest kanałem wapniowym zlokalizowanym w siateczce endoplazmatycznej i odpowiada za kontrolę wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w neuronach. Pobudzenie receptorów glutaminianowych powoduje uwolnienie trójfosforanu inozytolu i jego przyłączenie się do białka ITPR2. Zmienione właściwości ITPR2 mogą prowadzić do zaburzenia wewnątrzkomórkowej równowagi wapniowej i aktywować proces apoptozy. Jego poziom ekspresji w krwi obwodowej był znacząco wyższy w grupie 126 chorych na SLA w porównaniu z grupą 126 osób z grupy kontrolnej ( $p=0,00016$ ).

Kolejne badanie przeprowadzone przez tych autorów [van Es i wsp., 2008], wykazało związek innego polimorfizmu (rs 10260404) z chorobą ( $p=0,00000005$ , po korekcie Bonferroniego  $p=0,017$ ). Polimorfizm ten jest zlokalizowany na chromosomie 7 w rejonie genu *DPP6* (*DPPX*), który koduje białko dipeptydylopeptydazę 6. Gen ten ulega ekspresji w mózgu, a enzym, który jest jego produktem jest zaangażowany w powstawanie neuropeptydów z ich prekursorów, ponadto wiąże specyficzne neuronalne kanały potasowe woltażowozależne i wpływa na ich właściwości. Badanie przeszukiwania całego genomu ludzkiego w homogennej populacji irlandzkiej przez Cronina i wsp. [2008] doprowadziło do zidentyfikowania 35 polimorfizmów związanych z SLA (najniższa wartość  $p$  wynosiła 0,00001), jednak żaden z nich nie wykazywał istotnego związku z chorobą po korekcie Bonferroniego. Analiza końcowa, do której włączono grupy replikacyjne wcześniej wykorzystane w badaniu Schymick i wsp. [2007] i van Es i wsp. [2007] wykazała związek z chorobą genu *DPP6* ( $p=0,000002$ ). Należy podkreślić, że kolejne badanie replikacyjne w populacji polskiej wykonane przez tych autorów [Cronin i wsp., 2009] wykazało brak związku tego wariantu polimorficznego z ryzykiem zachorowania na SLA. Największe do tej pory badanie przeszukiwania całego genomu ludzkiego (wykonane na największej grupie chorych i osób zdrowych) przeprowadził Chio i wsp. [2009]. W badaniu tym żaden z zidentyfikowanych polimorfizmów nie wykazał znamienności statystycznej po korekcie Bonferroniego. Dwa polimorfizmy wykazujące najsilniejszy związek z chorobą, który jednak

nie został potwierdzony w grupach replikacyjnych, zidentyfikowano na chromosomie 7 (7p13.3) w rejonie sąsiadującym z genami *SUNCI*, *HUS1* i *C7orf57*.

Wyniki dwóch powyższych badań wskazują na związek z chorobą genów zlokalizowanych na chromosomie 7, czyli tam gdzie zlokalizowane są geny *PON*. Można przypuszczać, że te wskazane geny w badaniach przeszukiwania całego genomu ludzkiego mogą być w nierównowadze sprzężeń z innymi genami, np. *PON*.

Należy podkreślić, że wyniki dotychczas wykonanych badań przeszukiwania całego genomu ludzkiego w SLA nie pokrywają się ze sobą. Może to być wynikiem małych liczebności grup uczestniczących w poszczególnych badaniach. Takie liczby uczestników w poszczególnych badaniach pozwalają jedynie na wykrycie polimorfizmów ryzyka o wysokiej wartości ryzyka względnego, co udokumentowano w przypadku polimorfizmu genu *APOE* (ang., *apolipoprotein E*) w chorobie Alzheimera. Uważa się, że polimorfizmy ryzyka chorób, których częstość wzrasta z wiekiem, czego przykładem może być SLA, charakteryzuje niska wartość ryzyka względnego, a efekt ryzyka takich polimorfizmów sumuje się [Mullen i wsp., 2009]. Dodatkowo istotnym elementem, który należy wziąć pod uwagę szacując liczbę uczestników w tego typu badaniach jest częstość poszczególnych alleli w populacji. Tak więc, związek polimorfizmów z ryzykiem zachorowania na SLA w przeszukiwania całego genomu ludzkiego można udokumentować tylko na bardzo dużej liczbie uczestników. Szacowana liczba osób dla takiego badania wynosi od 10 000 do 20 000 osób [Mullen i wsp., 2009]. Pewnym rozwiązaniem będzie na pewno wykonanie w przyszłości metaanalizy wszystkich badań przeszukiwania całego genomu ludzkiego u chorych na SLA i w grupie kontrolnej, ponieważ tylko metaanaliza na tym etapie może dać szansę znalezienia polimorfizmów ryzyka o niskich wartościach ryzyka względnego. Interpretację takiej metaanalizy może utrudniać fakt, że przeszukiwania całego genomu ludzkiego w SLA były wykonywane na różnych platformach bioinformatycznych (Illumina, Affymetrix) przy różnej liczbie polimorfizmów znacznikowych.

Najtrudniejszą sprawą w interpretacji wyników badań na temat znaczenia polimorfizmów genów *PON* dla ryzyka SLA jest fakt, że w prawie każdej populacji czynnikiem ryzyka jest inny wariant genetyczny.

Wyjaśnieniem trudności oceny znaczenia odmiennych wariantów polimorficznych genów *PON* dla ryzyka rozwoju SLA w różnych populacjach może być znacznie większa, niż dotychczas przypuszczano, zmienność fenotypowa tej choroby [Chio i wsp., 2009].

Jedną z przyczyn zaistniałej sytuacji może być też to, że badane populacje różnią się stylem życia, miejscem zamieszkania i przez to narażone są na inny profil szkodliwych substancji podlegających hydrolizie przez paraoksonazy, w stosunku do których obecność allelu R może odgrywać inną, nawet przeciwną rolę (protektor/czynnik ryzyka) [Billecke i wsp., 2000].

Może być też tak, że paraoksonazy są przykładem genetycznych czynników ryzyka, które cechuje niewielki lub umiarkowany wpływ na ryzyko choroby i ten rodzaj efektu może być wykryty tylko przy bardzo dużych liczbach uczestników badania [Chio i wsp., 2009].



### VI.1.1. Związek polimorfizmów genu *PONI* i *PON2* z ryzykiem zachorowania na SLA w zależności od pierwszych objawów choroby

Częstość występowania postaci kończynowej SLA szacuje się na 75% wszystkich przypadków SLA, natomiast postaci opuszkowej na 25% [Wijesekera i Leigh, 2009]. W materiale własnym osoby chore na SLA z postacią kończynową stanowiły 70,9%, pozostałe 29,1% to chorzy na SLA z postacią opuszkową. Uważa się, że te dwie postaci choroby charakteryzują się taką samą etiopatogenezą, ale odmiennością w zakresie profilu niektórych czynników ryzyka oraz obrazu klinicznego [Wijesekera i Leigh, 2009].

Postać opuszkowa występuje częściej u osób starszych i u kobiet i charakteryzuje ją też znacznie krótsze przeżycie [Wijesekera i Leigh, 2009, Adamek i Tomik, 2005]. Stwierdzono także, że te dwie postaci mają odmienną częstość alleli polimorfizmu *apoE*. W grupie chorych z postacią opuszkową Moulard i wsp. [1996] oraz Al-Chalabi i wsp. [1996] stwierdzili znamienne częstsze występowanie przynajmniej jednego allelu epsilon4 w porównaniu do chorych z postacią kończynową oraz w porównaniu do grupy kontrolnej. W badaniu Chio i wsp. [2005] stwierdzono częstsze zachorowanie na SLA wśród zawodowych piłkarzy niż w populacji ogólnej oraz częstsze występowanie jako pierwszych objawów opuszkowych, co sugeruje odmienne znaczenie nadmiernego wysiłku fizycznego jako czynnika ryzyka u pacjentów z postacią opuszkową i kończynową choroby. Odmienną częstość alleli różnych polimorfizmów między tymi postaciami choroby wykazano także w badaniach przeszukiwania całego genomu ludzkiego [Dunckley i wsp., 2007]. Postać opuszkową charakteryzowało częstsze występowanie polimorfizmów następujących genów: *AMPH*, *BU173572*, *PARP8*, *PCSK5* [Dunckley i wsp., 2007]. Niestety ta ostatnia zależność wymaga potwierdzenia na znacznie większych grupach pacjentów.

W prezentowanym badaniu stwierdzono, że spośród badanych polimorfizmów tylko polimorfizm –A162G genu *PONI* charakteryzował się odmiennym znaczeniem dla ryzyka wystąpienia postaci opuszkowej i kończynowej choroby. Stwierdzono, że u osób z postacią opuszkową rzadziej występował allel A oraz genotyp AA polimorfizmu –A162G genu *PONI* niż u osób z postacią kończynową. Porównanie częstości występowania alleli i genotypów tego polimorfizmu między poszczególnymi postaciami choroby i grupą kontrolną wykazał różnicę tylko między postacią opuszkową i grupą kontrolną. Wartość p wynosiła 0,03, niestety uwzględnienie korekty Bonferoniego, spowodowało, że ta zależność nie była już

istotna statystycznie. Związek między tym polimorfizmem a ryzykiem SLA był już wcześniej stwierdzony w populacji australijskiej przez Morahan i wsp. [2007]. Wykazano, że allel A był czynnikiem ochronnym dla rozwoju choroby.

Wiadomo, że region zawierający to miejsce polimorficzne stanowi obszar przyłączania się czynnika transkrypcyjnego NF-1 (ang. *nuclear factor-1*), obecność allelu A warunkuje powstanie miejsca wiążącego NF-1, obecność allelu G zakłóca wiązanie NF-1 [Brophy i wsp., 2001 (a)] co wpływa na poziom transkrypcji tego genu, a więc decyduje o ilości czynnego enzymu PON1.

Do tej pory badano znaczenie tego polimorfizmu także w chorobie Alzheimera, jednak obecność allelu A w pozycji -162 genu *PONI* wiązała się ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na chorobę Alzheimera w grupie chorych wywodzących się z populacji amerykańskiej (USA), kanadyjskiej, niemieckiej i greckiej (badanie MIRAGE) [Erllich i wsp., 2006].

Uzyskane w prezentowanej pracy wyniki mogą sugerować potrzebę dalszych badań porównujących rozkład polimorfizmu -A162G genu *PONI* u chorych na postać opuszkową choroby i w grupie kontrolnej.

### VI.1.2. Związek polimorfizmów genu *PON1* i *PON2* z ryzykiem zachorowania na SLA – podsumowanie

Wśród zalet prezentowanego badania należy przedstawić to, że zostało przeprowadzone w jednej, homogenicznej populacji mieszkańców południowej części Polski. Dobór grupy kontrolnej spoza członków rodzin chorych na SLA pozwolił na uniknięcie „efektu zdrowego pracownika” (ang. *Healthy worker effect, healthy user bias*) oraz ryzyka, że do grupy kontrolnej zostały zakwalifikowane osoby, które w przyszłości mogą rozwinąć SLA.

Jak we wszystkich pracach dotyczących genetycznych czynników ryzyka należy brać pod uwagę błąd systematyczny doboru próby (ang. *selection bias*) [Gajewski, Jaeschke i Brożek, 2008] związanej z faktem, iż do badania włączono tylko tych chorych na SLA, którzy zgłosili się do Kliniki Neurologii w Krakowie, co może być trudne dla chorych w najbardziej zaawansowanym stadium choroby, czy z bardzo szybkim przebiegiem choroby, a nie można wykluczyć, że ta grupa chorych różni się zestawem genotypów i haplotypów od pozostałych chorych. Dodatkowo, do słabych punktów tej pracy należy fakt, że tło rodzinne choroby wykluczano na podstawie wywiadu.

Niniejsza praca nie objęła także chorych, którzy nie wyrazili świadomej zgody na udział w badaniu. Należy zwrócić również uwagę, że badanie miało stosunkowo niewysoką moc wynikającą z takich a nie innych liczebności badanych grup. Należy jednak podkreślić, że materiał genetyczny Kliniki Neurologii należy do największych na świecie, a jego wartość kliniczną podkreśla uczestnictwo zespołu zajmującego się tą chorobą w wielu międzynarodowych projektach badawczych.

## VI.2. Aktywność PON1

Zaplanowane badanie miało na celu sprawdzenie czy aktywność PON1 względem paraoksonu i octanu fenylu różni się między grupą chorych na SLA i grupą kontrolną. Aktywność PON1 w surowicy krwi oznaczana jest jak dotąd głównie w stosunku do dwóch egzogennych substratów: paraoksonu (aktywność fosfotriesterazowa) i jednego z estrów aromatycznych octanu fenylu (aktywność arylesterazowa). Odzwierciedla to jedynie zdolność do hydrolizy toksycznych związków chemicznych, natomiast nie testuje właściwości antyoksydacyjnych tego enzymu.

W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono różnicy aktywności PON1 względem paraoksonu i octanu fenylu między grupą chorych i grupą kontrolną.

Dotychczas ukazały się wyniki tylko jednego badania [Wills i wsp., 2008] oceniającego stężenie oraz aktywność PON1 (względem paraoksonu, diazoksonu i octanu fenylu) u chorych na SLA i w grupie kontrolnej. Badanie to przeprowadzono u 140 chorych na SLA oraz u 153 osób zdrowych. Średnia aktywność PON1 względem paraoksonu u chorych na SLA wynosiła  $792,5 \pm 574,1$  U/L, natomiast w grupie kontrolnej  $701,9 \pm 469,7$  U/L. Średnia aktywność PON1 względem octanu fenylu u chorych na SLA wynosiła  $150,3 \pm 38,9$ , a w grupie kontrolnej  $142,1 \pm 35,5$  U/L. Podobnie jak w prezentowanym badaniu, także i tu nie stwierdzono różnicy aktywności PON1 oraz jej stężenia między chorymi na SLA i grupą kontrolną.

Badanie aktywności PON1 w chorobach zwyrodnieniowych prowadzono także w chorobie Alzheimera. W badaniu przeprowadzonym przez Dantoine i wsp. [2002] oceniano aktywność PON1 względem paraoksonu u 180 osób zdrowych, 60 osób z chorobą Alzheimera, 49 osób z otępieniem naczyniopochodnym oraz u 45 osób z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi. Otrzymane wartości aktywności PON1 względem paraoksonu były następujące: w grupie chorych z chorobą Alzheimera średnia aktywność wynosiła  $0,41 \pm 0,2$  U/mL, w grupie chorych z otępieniem naczyniopochodnym  $0,25 \pm 0,1$  U/mL, u osób z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi  $0,34 \pm 0,2$  U/mL, a w grupie kontrolnej  $0,41 \pm 0,2$  U/mL. Autorzy wykazali znamiennej różnicę aktywności PON1 między osobami z otępieniem naczyniopochodnym a grupą kontrolną. W grupie chorych z otępieniem naczyniopochodnym aktywność PON1

względem paraoksonu była znamienne niższa w porównaniu do osób zdrowych oraz do osób z otępieniem Alzheimera. Nie stwierdzono istotnej różnicy aktywności PON1 względem paraoksonu między chorymi z chorobą Alzheimera i osobami z grupy kontrolnej. Autorzy tego badania nie wykonywali badań genetycznych, nie wiadomo więc jaka była częstość poszczególnych genotypów polimorfizmu Q192R genu PON1.

Paragh i wsp. [2002] przeprowadzili badanie aktywności PON1 względem paraoksonu oraz octanu fenylu u 30 chorych z chorobą Alzheimera, 40 chorych z otępieniem naczyniopochodnym i 40 osób zdrowych. Nie stwierdzono różnicy aktywności PON1 względem octanu fenylu między badanymi grupami (średnia aktywność u osób z chorobą Alzheimera wynosiła  $123 \pm 34$  U/l, u chorych z otępieniem naczyniopochodnym  $128 \pm 40$ , a w grupie kontrolnej  $130 \pm 35$  U/l). Natomiast wykazano, że aktywność PON1 względem paraoksonu była niższa u chorych z chorobą Alzheimera ( $272 \pm 100$  U/l) oraz u chorych z otępieniem naczyniopochodnym ( $343 \pm 89$  U/l) w porównaniu do grupy kontrolnej ( $422 \pm 120$  U/l). Także i w tym badaniu autorzy nie przeprowadzili badania częstości występowania polimorfizmu Q192R genu PON1. W marcu 2009 roku ukazały się wyniki badania przeprowadzonego wśród chorych z otępieniem, wywodzących się z populacji polskiej [Wehr i wsp., 2009]. Autorzy badali aktywność PON1 względem octanu fenylu u 51 osób z chorobą Alzheimera, 28 osób z otępieniem naczyniopochodnym, 41 osób z otępieniem mieszanym, 45 osób z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi oraz u 61 osób zdrowych, stanowiących grupę kontrolną. Aktywność PON1 względem octanu fenylu była znamienne niższa u chorych z chorobą Alzheimera ( $143,3 \pm 37,54$  umol/min/ml) oraz u chorych z otępieniem mieszanym ( $138,1 \pm 38,83$  umol/min/ml) w porównaniu do grupy kontrolnej ( $162,0 \pm 41,25$  umol/min/ml). Autorzy pracy podkreślają, że aktywność PON1 względem octanu fenylu była istotnie niższa w otępieniach, które są wynikiem procesu neurodegeneracyjnego. W badaniu tym dodatkowo oceniono częstość występowania genotypów polimorfizmu miejsca promotorowego -C108T genu *PON1*, nie badano częstości występowania innych polimorfizmów tego genu. Podsumowując, w dwóch z trzech powyżej przedstawionych badaniach stwierdzono niższą aktywność PON1 u chorych na chorobę Alzheimera w porównaniu do grupy kontrolnej. W badaniu przeprowadzonym przez Paragh i wsp. stwierdzono różnicę między tymi grupami w aktywności względem paraoksonu, natomiast w badaniu Wehr i wsp. względem octanu fenylu. Możliwość wykazania tego związku w chorobie Alzheimera, a nie w SLA, może

wiązać się z długością trwania procesu zwyrodnieniowego. Przeżycia w chorobie Alzheimera są średnio 2-3 razy dłuższe niż w SLA.

Liczne badania aktywności PON1 na dużych grupach chorych przeprowadzono wśród osób z chorobami układu krążenia. Mackness i wsp. [2001] badali aktywność PON1 względem paraoksonu u 417 osób z chorobą niedokrwienną serca oraz u 282 zdrowych osób stanowiących grupę kontrolną, ponadto oznaczyli stężenie białka PON1 i zbadali częstość występowania genotypów polimorfizmu L55M i Q192R genu PON1 w badanych grupach. Autorzy wykazali, że zarówno aktywność jak i stężenie PON1 było znamienne niższe w grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną. Średnia aktywność PON1 względem paraoksonu w grupie chorych wynosiła 122,8 (3,3–802,8) a w grupie kontrolnej 214,6 (26,3–620,8) nmol/min x mL.

We wszystkich przedstawionych pracach, podobnie jak w prezentowanej pracy, wyniki aktywności PON1 cechowały się dużą zmiennością wewnątrzgrupową [Mackness i wsp., 2001, Dantoine i wsp., 2002, Paragh i wsp., 2002, Wills i wsp., 2008, Wehr i wsp., 2009]. Według Costa i wsp. [2005] w badanej populacji zmienność poziomu aktywności PON1 zarówno wobec paraoksonu jak i octanu fenylu może być nawet 40-krotna.

Wyniki prezentowanego badania oraz przytoczone z pracy Wills i wsp. [2008] nie potwierdziły zakładanej wstępnej hipotezy sugerującej istotnie mniejszą aktywność PON1 względem paraoksonu i octanu fenylu w grupie chorych na SLA. Potwierdzenie takiej zależności ułatwiłoby wytłumaczenie, w jaki sposób badane polimorfizmy genu PON1 determinują ryzyko zachorowania na SLA. Należy podkreślić, że według badań z ostatnich lat to laktony, a nie paraokson i octan fenylu, uważane są za naturalne substraty dla paraoksonaz. W związku z tym uzyskane wyniki mogą wskazywać, że znaczenie paraoksonaz i ich polimorfizmów w SLA wiąże się głównie z ich działaniem antyoksydacyjnym, wynikającym z aktywności laktonazowej. Wskazane wydają się więc, dalsze badania aktywności PON1 względem naturalnego substratu, czyli laktonu lub tiolaktonu.

Jedną z innych możliwych przyczyn tego negatywnego wyniku jest fakt, że badane polimorfizmy genu PON1 mają niezbyt duży wpływ na aktywność PON1. Według Carlsona i wsp. [2006] wpływ polimorfizmów PON1 na jej aktywność stanowi o około ¼ jej zmienności. Coraz więcej doniesień wskazuje, że pozostała zmienność aktywności PON1

zależy od czynników środowiskowych, takich jak wiek, płeć, choroby współistniejące, stosowane leki i używki czy rodzaj pożywienia [Deakin i James, 2004].

W prezentowanym badaniu nie wykazano też związku aktywności PON1 z czasem trwania choroby. W badaniu przeprowadzonym przez Wills i wsp. [2008] nie badano takiej hipotezy, natomiast przeprowadzono analizę związku aktywności PON1 względem paraoksonu, diazoksonu i octanu fenylu z długością przeżycia, badanie nie wykazało istnienia takiej zależności. W przytoczonych powyżej badaniach aktywności PON1 u chorych z różnymi typami otępienia oraz z chorobą niedokrwienną serca także nie przeprowadzono badania zależności między poziomem aktywności PON1 a czasem trwania choroby [Mackness i wsp., 2001, Dantoine i wsp., 2002, Paragh i wsp., 2002, Wehr i wsp., 2009].

Ponieważ nie wykazano różnic aktywności PON1 względem paraoksonu i octanu fenylu u chorych i w grupie kontrolnej, ani nie stwierdzono wpływu tych aktywności na czas trwania choroby analizę związku badanych polimorfizmów genu *PON1* na aktywność PON1 względem tych dwu substratów wykonano u chorych i w grupie kontrolnej łącznie razem. Stwierdzono, że aktywność PON1 względem obu substratów jest determinowana zarówno polimorfizmem L55M jak i Q192R, nie stwierdzono takiej zależności z polimorfizmem –A162G genu *PON1*. Osoby z genotypami QQ i MM mają najniższą aktywność PON1 względem paraoksonu i octanu fenylu, a osoby z genotypami RR i LL – najwyższą.

Wyniki prezentowanego badania są zgodne z dotychczasowymi doniesieniami, dokumentującymi wpływ polimorfizmów miejsca kodującego genu *PON1* na poziom jej aktywności, a szczególnie polimorfizmu Q192R genu *PON1* na aktywność paraoksonazową PON1.

W badaniu przeprowadzonym u zdrowych ochotników wywodzących się z populacji meksykańskiej [Rojas–Garcia i wsp., 2005] stwierdzono, że aktywność PON1 względem octanu fenylu i paraoksonu jest determinowana przez polimorfizmy –C108T, L55M i Q192R genu *PON1*. Wieloczynnikowa analiza logistyczna wykazała, że główny wpływ czynników genetycznych na aktywność PON1 względem paraoksonu był zależny od polimorfizmu Q192R genu *PON1*. Podobnie jak w prezentowanym badaniu nie wykazano związku między aktywnością PON1 względem paraoksonu i octanu fenylu a polimorfizmem –G162A genu *PON1* [Rojas–Garcia i wsp., 2005]. Także Mackness i wsp. [2001] wykazali, że aktywność

PON1 względem paraoksonu jest najniższa u osób z genotypami MM/ QQ i najwyższa w przypadku genotypów LL/ RR.

Carlson i wsp. [2006] w badaniu przeprowadzonym u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca wykazali, że polimorfizmy L55M, Q192R, –C108T oraz –A162G genu *PON1* są odpowiedzialne za 26% zmienności w aktywności PON1 względem octanu fenylu, a pozostałe kilkanaście zbadanych polimorfizmów odpowiadało tylko za dodatkowe 4% zmienności aktywności tego enzymu. W badaniu opublikowanym przez Wills i wsp. [2008] analiza dziewięciu zbadanych przez tą autorkę polimorfizmów genów paraoksonaz (w tym polimorfizmów zbadanych w prezentowanym badaniu) wykazała, że tylko polimorfizm rs705382 genu *PON1* ma wpływ na aktywność PON1 względem octanu fenylu oraz na poziom stężenia białka PON1, natomiast polimorfizm Q192R na aktywność PON1 względem paraoksonu. Wykazano, że homozygoty CC polimorfizmu rs705382 charakteryzuje znacznie wyższa aktywność arylesterazowa oraz stężenie białka PON1 ( $p < 0,0001$ ) niż heterozygoty i nosiciele genotypu GG. Homozygoty RR polimorfizmu Q192R cechowało najwyższe stężenie i aktywność względem paraoksonu ( $P < 0,0001$ ) w porównaniu do heterozygot i homozygot QQ. Polimorfizmy L55M oraz –A162G genu *PON1* w tym badaniu nie wykazywały wpływu na poziom aktywności PON1. Wehr i wsp. 2009 wykazali zależność między poziomem aktywności PON1 względem octanu fenylu a polimorfizmem –C108T genu *PON1*. Najwyższą aktywność PON1 stwierdzono w przypadku homozygot CC, najniższą u homozygot TT.

Związek polimorfizmów Q192R i L55M genu *PON1* z aktywnością względem paraoksonu i octanu fenylu może tłumaczyć odmienną budowę cząsteczki PON1 oraz jej właściwości enzymatycznych w zależności od wariantu polimorficznego.

Wiadomo, że aminokwas kodowany w miejscu polimorficznym Q192R genu *PON1*, ze względu na bliskie przestrzenne sąsiedztwo z centrum aktywnym tego enzymu wpływa na jego specyficzność substratową. Ponadto, aminokwas ten stanowi część elementu kotwiczącego PON1 w cząsteczce HDL, a dopiero zamocowanie PON1 w tej cząsteczce warunkuje stabilność tego enzymu [Harel i wsp., 2004, Deakin i James, 2004, Gaidukov i wsp., 2006]. Natomiast wpływ polimorfizmu L55M genu *PON1* na jej aktywność, najczęściej tłumaczony jest faktem, że izoenzym 55L cechuje się większą stabilnością cząsteczki białka. Istnieją także doniesienia, że wpływ ten jest wynikiem nierównowagi sprzężeń występującej



między tym polimorfizmem a polimorfizmem miejsca promotorowego –C108T genu *PON1*, który cechuje się silnym wpływem na poziom aktywności PON1 [Brophy i wsp., 2001 (a), Harel i wsp., 2004].

W kwietniu tego roku ukazała się praca Martinelli i wsp. [2009], którzy po raz pierwszy badali aktywność PON1 względem naturalnych substratów – laktonów. Badanie to zostało przeprowadzone u 100 osób z chorobą niedokrwienną serca, którzy przeżyli zawał mięśnia sercowego, u 100 osób z chorobą niedokrwienną serca, którzy nie przeżyli zawału serca oraz u 100 osób bez choroby niedokrwiennej serca. TBBL (ang. *5-thiobutyl butyrolactone*) odzwierciedlał aktywność laktonazową PON1, natomiast DEPCyMCaza (ang. *7-O-diethylphosphoryl-3-cyano-4-methyl-7-hydroxycoumarin*) była wskaźnikiem stężenia białka PON1. Autorzy wykazali, że choroba niedokrwienna serca wiąże się z niższą aktywnością DEPCyMCazy. Natomiast nie stwierdzili różnicy aktywności TBBLazy między grupą chorych, a osobami zdrowymi.

#### VI.2.1. Aktywność PON1 – podsumowanie

W prezentowanym badaniu oznaczenie aktywności PON1 wykonano u stosunkowo niewielkiej liczby pacjentów. Przyczyną zaistniałej sytuacji była mała liczba chorych, u których wykonane oznaczenia uznano za wiarygodne. Wiarygodne oznaczenia to te, które wykonywano z krwi pobranej na czczo oraz przechowywane w temperaturze –20°C poniżej roku.

Z literatury wynika, że badanie aktywności PON1 należy przeprowadzić w surowicy otrzymanej z krwi osób będących na czczo, ponieważ spożycie posiłku powoduje zmianę poziomu aktywności PON1, a rodzaj pokarmu może tę aktywność obniżać lub podwyższać [Sutherland i wsp., 1999, Hedrick i wsp., 2000, Wallace i wsp., 2001]. Większość badań, w których oznaczano aktywność PON1 była przeprowadzana na próbkach krwi pochodzących od osób będących na czczo [Abbott i wsp., 1995, Dantoine i wsp., 1998, Durrington i wsp., 1998, Hasselwander i wsp., 1998, Sutherland i wsp., 1999, van der Gaag i wsp., 1999, James, Leviev i Righetti, 2000, Balogh i wsp., 2001, Mackness i wsp., 2001, Dantoine i wsp., 2002, Paragh i wsp., 2002, Tsimihodimos i wsp., 2002, Deakin i wsp., 2003, Paragh i wsp. [2003] Wehr i wsp., 2009]. W przypadku tego badania osoby chore na SLA były rekrutowane w Poradni Przyklinicznej Kliniki Neurologii, która jest poradnią regionalną i z powodu

odległego miejsca zamieszkania często osoby, które zgłaszały się na wizytę, były już po posiłku.

Pojedyncze badania dokumentują, że aktywność względem paraoksonu determinuje czas przechowywania próbek [Brackley i wsp., 1983]. W badaniu przeprowadzonym przez Mackness i wsp. [2001] czas przechowywania próbek od pobrania do czasu wykonania oznaczenia nie przekraczał 2 miesięcy. Własna analiza wykazała, że czas przechowywania próbek poniżej roku pozwala na wiarygodną ocenę aktywności PON1 względem paraoksonu. Z tych dwu powodów badania aktywności PON1 względem paraoksonu przeprowadzono u 23 chorych. Obok małej liczebności badanej grupy należy również zaznaczyć, że w analizie jednoczynnikowej stwierdzono różnicę w rozkładzie wieku między chorymi a grupą kontrolną, jednak w analizie regresji liniowej nie stwierdzono wpływu wieku na różnicę aktywności PON1 między grupami.

Do zalet badania można zaliczyć fakt, że udało się uniknąć wpływu innych czynników na poziom aktywności PON1. Nie stwierdzono różnicy między częstością występowania chorób współistniejących, podobnie w częstości palenia papierosów aktualnie i kiedykolwiek między chorymi na SLA a grupą kontrolną. Jak już wspomniano we wstępie, w hipercholesterolemii, cukrzycy, nadciśnieniu tętniczym, chorobie niedokrwiennej serca i przewlekłych chorobach nerek i wątroby wykazano, że dochodzi do spadku poziomu aktywności PON1. Podobnie palenie papierosów moduluje poziom aktywności PON1.

## VII. WNIOSKI

- Genotyp RR polimorfizmu Q192R genu *PON1* oraz genotyp z allelem C (CC+CS) polimorfizmu C311S genu *PON2* są niezależnymi czynnikami ryzyka zachorowania na SLA i zwiększają to ryzyko odpowiednio 1,65 razy i 1,35 razy.
- Aktywność PON1 względem paraoksonu i octanu fenylu nie różniła się między chorymi na SLA i grupą kontrolną.
- Aktywność PON1 względem paraoksonu zależy od czasu przechowywania próbek od momentu pobrania krwi do czasu wykonania oznaczenia.
- Aktywność PON1 względem paraoksonu i octanu fenylu nie zależy od czasu trwania choroby.
- Aktywność PON1 jest modyfikowana przez polimorfizmy Q192R i L55M genu *PON1*.

## VIII. STRESZCZENIE

Paraoksonazy (PON) to białka kodowane przez trzy geny paraoksonaz (*PON1*, *PON2*, *PON3*), które zlokalizowane są obok siebie na ramieniu długim chromosomu 7 (7q21.3–22.1). Główną rolą paraoksonaz jest ochrona przed stresem oksydacyjnym. *PON1* dodatkowo hydrolizuje związki fosforoorganiczne. *PON1* oraz *PON3* są produkowane w wątrobie, a następnie wydzielane do krwi, gdzie wiążą się z cząsteczkami HDL. *PON2* ulega ekspresji niemal w każdej tkance ludzkiej, nie jest wydzielana do krwi, swoje działanie antyoksydacyjne wywiera wewnątrzkomórkowo. Aktywność osoczowa *PON1* względem paraoksonu i octanu fenylu, oceniająca zdolność do hydrolizy toksycznych związków chemicznych jest modyfikowana przez różne czynniki środowiskowe i toksyczne oraz polimorfizmy genu *PON1*. Na przykład, obecność alleli R i L polimorfizmów odpowiednio Q192R i L55M genu *PON1* wiąże się, ze zmniejszoną zdolnością *PON1* do ochrony LDL przed oksydacją, z najniższą aktywnością hydrolityczną w stosunku do diazoksonu, somanu i sarinu i najwyższą aktywnością w hydrolizowaniu paraoksonu w porównaniu do nosicieli alleli Q i M tych polimorfizmów. Także polimorfizm miejsca promotorowego genu *PON1* –A162G poprzez wpływ na poziom ekspresji białka *PON1* wpływa na poziom tego enzymu. Z kolei obecność allelu C polimorfizmu C311S genu *PON2* powoduje zmniejszenie zdolności białka *PON2* do ochrony LDL przed oksydacją w porównaniu z allelem S.

SLA jest rzadką chorobą zwyrodnieniową układu nerwowego, którą charakteryzują objawy uszkodzenia górnego i dolnego neuronu ruchowego. Choroba ta ma przebieg postępujący, stopniowo ogranicza sprawność chorego i w ciągu 2–4 lat prowadzi do śmierci. SLA w większości przypadków występuje sporadycznie (90%). Wśród czynników ryzyka SLA wymienia się wiek, płeć, dodatni wywiad rodzinny, a także narażenie na nadmierny stres oksydacyjny oraz szkodliwe substancje chemiczne, w tym związki fosforoorganiczne. Genetycznie uwarunkowana obniżona zdolność paraoksonaz do hydrolizy szkodliwych czynników środowiskowych oraz osłabienie właściwości antyoksydacyjnych paraoksonaz może być związana z ryzykiem wystąpienia SLA. Zaprojektowano badanie, którego celem było określenie wpływu wybranych polimorfizmów genu *PON1* i *PON2* oraz aktywności enzymatycznej *PON1* na ryzyko wystąpienia sporadycznej postaci SLA. Cel naukowy projektu zrealizowano w następujący sposób: 1) porównano częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów genu *PON1* (Q192R rs662, L55M rs854560, -A162G rs705381) w grupie chorych na sporadyczną postać SLA i w grupie kontrolnej; 2) porównano

częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu C311S (rs6954345) genu *PON2* w grupie chorych na sporadyczną postać SLA i w grupie kontrolnej; 3) porównano częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów genu *PON1* (Q192R rs662, L55M rs854560, -A162G rs705381) i *PON2* (C311S rs6954345) u chorych z kończynowym i opuszkowym początkiem choroby; 4) oceniono aktywność enzymatyczną PON1 w surowicy krwi u chorych na sporadyczną postać SLA i w grupie kontrolnej; 5) oceniono związek między zbadanymi polimorfizmami genu *PON1* (Q192R rs662, L55M rs854560, -A162G rs705381) a aktywnością enzymatyczną PON1 w surowicy krwi u chorych na sporadyczną postać SLA i w grupie kontrolnej.

Badanie genetyczne wykonano u 261 chorych na SLA (diagnozowanych według kryteriów WFN El Escorial 1998) oraz 715 osób zdrowych, które stanowiły grupę kontrolną. Badanie aktywności PON1 względem paraoksonu przeprowadzono u 63 chorych na SLA i 57 osób z grupy kontrolnej, a badanie aktywności PON1 względem octanu fenylu wykonano u 62 chorych na SLA i 57 osób z grupy kontrolnej. Badania genetyczne wykonywano przy pomocy reakcji PCR i trawienia odpowiednim enzymem restrykcyjnym (polimorfizm Q192R, L55M genu *PON1* oraz C311S genu *PON2*) oraz metodą real time-PCR (polimorfizm -A162G genu *PON1*). Aktywność enzymatyczną PON1 względem paraoksonu oraz octanu fenylu zbadano metodami spektrofotometrycznymi.

Badanie wykazało, że genotyp RR polimorfizmu Q192R genu *PON1* oraz genotyp z allelem C (CC+CS) polimorfizmu C311S genu *PON2* są niezależnymi czynnikami ryzyka zachorowania na SLA i zwiększają to ryzyko odpowiednio 1,65 razy i 1,35 razy.

Nie stwierdzono różnicy aktywności PON1 względem paraoksonu i octanu fenylu między chorymi na SLA i grupą kontrolną. Wykazano natomiast, że aktywność PON1 względem paraoksonu zależy od czasu przechowywania próbek od momentu pobrania krwi do czasu wykonania oznaczenia. Ponadto, wykazano, że aktywność PON1 nie zależy od czasu trwania choroby. Stwierdzono także, że aktywność PON1 względem obu substratów jest determinowana zarówno przez polimorfizm L55M jak i Q192R. Osoby z genotypami QQ i MM miały najniższą aktywność PON1 względem paraoksonu i octanu fenylu, a osoby z genotypami RR i LL – najwyższą.

Badanie wykazało, że dwa spośród czterech badanych polimorfizmów genów *PON* mają związek z ryzykiem zachorowania na SLA oraz, że aktywność PON1 względem egzogennych substratów, paraoksonu i octanu fenylu, nie ma związku z ryzykiem choroby. Badanie potwierdziło także, że polimorfizm Q192 R i L55M genu *PON1* determinują aktywność PON1 względem paraoksonu i octanu fenylu.

## IX. SUMMARY

Paraoxonases (PON) are proteins which are coded by the three paraoxonase genes (*PON1*, *PON2*, *PON3*) aligned next to each other on the long arm of the chromosome 7 (7q21.3–22.1).

The main role of paraoxonases is protection against oxidative stress. Furthermore, PON1 can hydrolyze toxic organophosphates. PON1 and PON3 are synthesized in the liver and are secreted into the blood, where they are associated with the high-density lipoprotein (HDL).

PON2 is expressed widely in almost all human tissues, is not presented in blood, it exerts its antioxidative properties intracellularly. The PON1 paraoxonase and arylesterase activities, which represent their ability to hydrolyze organophosphate toxins, are modified by different environmental and toxic factors as well as by the *PON1* gene polymorphisms. For example, the presence of the R and L alleles of the Q192R and L55M *PON1* gene polymorphisms, respectively, are correlated with a decreased PON1 activity to protect LDL from oxidation, and with the lowest activity to hydrolyze diazoxon, soman, sarin and the highest to hydrolyze paraoxon compared with individuals with the Q and M alleles of these polymorphisms. Also, the polymorphism of the *PON1* regulatory region the –A162G, affects activity of PON1, by modulating the expression of the levels of the PON1 protein. The presence of the C allele of the C311S polymorphism of the *PON2* gene is correlated with a decreased PON2 activity to protect LDL from oxidation compared with the S allele carriers. SLA is a rare neurodegenerative disease of nervous system, characterized by the symptoms of the lower and upper motor neuron dysfunction. ALS is a progressive disease which gradually restricted the patients efficiency and leads to death after 2 to 4 years. Most of all cases of ALS are sporadic (90%). The following factors increase the risk of sporadic ALS: age, gender, family history, as well as exposure to excessive oxidative stress and harmful toxic substances including organophosphates. The genetically reduced PONs ability to hydrolyze the environmental toxins and the decrease of their antioxidant properties may affect the risk of ALS. We planned the study, which aimed to evaluate the influence of the selected polymorphisms of the *PON1* and *PON2* genes and PON1 enzymatic activity on the risk of sporadic ALS. The aim was executed by: 1) the comparison of the frequencies of the genotypes and alleles of the selected *PON1* gene polymorphisms (Q192R rs662, L55M rs854560, –A162G rs705381) between the ALS cases and controls; 2) the comparison of the frequencies of genotypes and alleles of the

C311S *PON2* gene polymorphism (rs6954345) between the ALS cases and controls; 3) the comparison of the frequencies of the genotypes and alleles of the *PON1* gene polymorphisms (Q192R rs662, L55M rs854560, –A162G rs705381) and *PON2* gene polymorphism C311S (rs6954345) between the bulbar and limb onset of ALS; 4) evaluation of the blood PON1 activity in sporadic ALS cases and controls; 5) evaluation of the relationship between the studied polymorphisms of the *PON1* gene (Q192R rs662, L55M rs854560, –A162G rs705381) and the PON1 activities in sporadic ALS cases and controls. The genotyping was investigated in 261 patients with ALS (diagnosed according to WFN El Escorial criteria 1998) and in 715 healthy controls. The PON1 activity due to paraoxon was investigated in 63 patients with ALS and 57 persons from the control group, the PON1 activity due to phenyl acetate was investigated in 62 patients with ALS and 57 persons from the control group. Genotyping of the Q192R and L55M polymorphisms of the *PON1* gene and the C311S polymorphism of the *PON2* gene were performed by the PCR and restrictive enzymes digestions. The genotyping of the –A162G polymorphism of the *PON1* gene was performed by the Real time-PCR method. The PON1 activity due to paraoxon and phenyl acetate was studied spectrophotometrically. The study revealed that the RR genotype of the Q192R polymorphism of the *PON1* gene and the genotype with the allele C (CC+CS) of the C311S polymorphism of the *PON2* gene were independent risk factors of ALS, and increased the risk 1,65 and 1,35 fold, respectively. The study did not show any difference in PON1 activities due to paraoxon and phenyl acetate between the ALS cases and controls. However it was found, that the PON1 activities due to paraoxon and phenyl acetate were related to the time of samples storage. Furthermore, it was showed that the PON1 activities were not due to disease duration. It was also shown that the PON1 activities due to both substrates were determined by the L55M and Q192R polymorphisms. The individuals with the QQ and MM genotypes presented with the lowest PON1 activities due to paraoxon and phenyl acetate, while the individuals with RR and LL genotypes – the highest.

The study revealed that the two out of four studied polymorphisms of the *PONs* genes were related to the risk of ALS, and that the PON1 activities due to exogenous substrates, paraoxon and phenyl acetate, were not related to the disease risk. The study confirmed, that the Q192R and L55M polymorphisms of the *PON1* gene affected the PON1 activities due to paraoxon and phenyl acetate.



## X. PIŚMIENNICTWO

1. Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1812–8.
2. Adamek D, Tomik B. *Stwardnienie Boczne Zanikowe. Wyd. I. ZOZ Ośrodek UMEA Shinoda – Kuracejo, Kraków 2005. ISBN 83-915811-5-2.*
3. Adams TB, Greer DB, Doull J, Munro IC, Newberne P, Portoghesi PS, Smith RL, Wagner BM, Weil CS, Woods LA, Ford RA. The FEMA GRAS assessment of lactones used as a flavour ingredients. The Flavor and Extract Manufacturers' Association. Generally recognized as safe. *Food Chem Toxicol* 1998;36:249-78.
4. Aguirre N, Beal MF, Matson WR, Bogdanov MB. Increased oxidative damage to DNA in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Res* 2005;39:383–8.
5. Al-Chalabi A, Enayat ZE, Bakker MC, Sham PC, Ball DM, Shaw CE, Lloyd CM, Powell JF, Leigh PN. Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with bulbar-onset motor neuron disease. *Lancet* 1996;347:159-60.
6. Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 2001;57:1282-9.
7. Andersen PM, Borasio GD, Dengler R, Hardiman O, Kollewe K, Leigh PN, Pradat PF, Silani V, Tomik B; EFNS Task Force on Diagnosis and Management of Amyotrophic Lateral Sclerosis. EFNS task force on management of amyotrophic lateral sclerosis: guidelines for diagnosing and clinical care of patients and relatives. *Eur J Neurol* 2005;12:921-38.
8. Armon C. An evidence–based medicine approach to the evaluation of the role of exogenous risk factors in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology* 2003;22:217–28.
9. Armon C, Kurland LT, Daube JR, O'Brien PC. Epidemiologic correlates of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1991;41:1077–84.
10. Ascherio A, Weisskopf MG, O'reilly EJ, Jacobs EJ, McCullough ML, Calle EE, Cudkowicz M, Thun MJ. Vitamin E intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2005;57:104–10.
11. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. Paraoxonase active site required for protection against LDL

- oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1617–24. (b)
12. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 2000;101:2510–7.
  13. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Paromo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998;101:1581–90. (a)
  14. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:330–5.
  15. Balogh Z, Seres I, Harangi M, Kovács P, Kakuk G, Paragh G. Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates? *Diabetes Metab* 2001;27:604–10.
  16. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263–5.
  17. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* 1994;330:585–91.
  18. Bharucha NE, Schoenberg BS, Raven RH, Pickle LW, Byar DP, Mason TJ. Geographic distribution of motor neuron disease and correlation with possible etiologic factors. *Neurology* 1983;33:911–5.
  19. Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, La Du BN. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos* 2000;28:1335–42.
  20. Bogdanov M, Brown RH, Matson W, Smart R, Hayden D, O'Donnell H, Flint Beal M, Cudkowicz M. Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic Biol Med* 2000;29:652–8.
  21. Bonnefont-Rousselot D, Lacomblez L, Jaudon M, Lepage S, Salachas F, Bensimon G, Bizard C, Doppler V, Delattre J, Meininger V. Blood oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2000;178:57–62.
  22. Brackley M, Carro-Ciampi G, Stewart DJ, Lowden JA, Ray AK, Kalow W. Stability of the paraoxonase phenotyping ratio in collections of human sera with differing storage times. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1983;41:65–78.

23. Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J. Redakcja naukowa wydania polskiego: Prusiński A. Neurologia w praktyce klinicznej. T. III, s. 2424. Wyd. I polskie. Wydawnictwo CZELEJ, Lublin, 2006. ISBN: 978-83-89309-79-2.
24. Brooks BR. Risk factors in the early diagnosis of ALS: North American epidemiological studies. ALS CARE Study Group. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 2000;1 Suppl 1:S19–26.
25. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL; World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 2000;1:293-9.
26. Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. Pharmacogenetics 2001;11:77–84. (a)
27. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory–region polymorphisms on paraoxonase–gene (PON1) expression. Am J Hum Genet 2001;68:1428–36. (b)
28. Bruijn LI, Miller TM, Cleveland DW. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. Annu Rev Neurosci 2004;27:723–49.
29. Cañete-Soler R, Silberg DG, Gershon MD, Schlaepfer WW. Mutation in neurofilament transgene implicates RNA processing in the pathogenesis of neurodegenerative disease. J Neurosci 1999;19:1273-83.
30. Carlson CS, Heagerty PJ, Hatsukami TS, Richter RJ, Ranchalis J, Lewis J, Bacus TJ, McKinstry LA, Schellenberg GD, Rieder M, Nickerson D, Furlong CE, Chait A, Jarvik GP. TagSNP analyses of the PON gene cluster: effects on PON1 activity, LDL oxidative susceptibility, and vascular disease. J Lipid Res 2006;47:1014-24.
31. Chancellor AM, Slattery JM, Fraser H, Warlow CP. Risk factors for motor neuron disease: a case–control study based on patients from the Scottish Motor Neuron Disease Register. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1993;56:1200–6.
32. Chen H, Richard M, Sandler DP, Umbach DM, Kamel F. Head injury and amyotrophic lateral sclerosis. Am J Epidemiol 2007;166:810–6.
33. Chiò A. Risk factors in the early diagnosis of ALS: European epidemiological studies. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 2000;1 Suppl 1:S13-8.

34. Chiò A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* 2005;128:472–6.
35. Chiò A, Schymick JC, Restagno G, Scholz SW, Lombardo F, Lai SL, Mora G, Fung HC, Britton A, Arepalli S, Gibbs JR, Nalls M, Berger S, Kwee LC, Oddone EZ, Ding J, Crews C, Rafferty I, Washecka N, Hernandez D, Ferrucci L, Bandinelli S, Guralnik J, Macciardi F, Torri F, Lupoli S, Chanock SJ, Thomas G, Hunter DJ, Gieger C, Wichmann HE, Calvo A, Mutani R, Battistini S, Giannini F, Caponnetto C, Mancardi GL, La Bella V, Valentino F, Monsurrò MR, Tedeschi G, Marinou K, Sabatelli M, Conte A, Mandrioli J, Sola P, Salvi F, Bartolomei I, Siciliano G, Carlesi C, Orrell RW, Talbot K, Simmons Z, Connor J, Piro EP, Dunkley T, Stephan DA, Kasperaviciute D, Fisher EM, Jabonka S, Sendtner M, Beck M, Bruijn L, Rothstein J, Schmidt S, Singleton A, Hardy J, Traynor BJ. A two-stage genome-wide association study of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 2009;18:1524–32.
36. Cid C, Alvarez–Cermeño JC, Regidor I, Salinas M, Alcazar A. Low concentrations of glutamate induce apoptosis in cultured neurons: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2003;206:91–5.
37. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol* 2005;69:541–50.
38. Couratier P, Sindou P, Esclaire F, Louvel E, Hugon J. Neuroprotective effects of riluzole in ALS CSF toxicity. *Neuroreport* 1994;5:1012–4.
39. Cox PA, Banack SA, Murch SJ. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:13380–3.
40. Cronin S, Berger S, Ding J, Schymick JC, Washecka N, Hernandez DG, Greenway MJ, Bradley DG, Traynor BJ, Hardiman O. A genome-wide association study of sporadic ALS in a homogenous Irish population. *Hum Mol Genet* 2008;17:768–74.
41. Cronin S, Greenway MJ, Prehn JH, Hardiman O. Paraoxonase promoter and intronic variants modify risk of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:984–6.
42. Cronin S, Tomik B, Bradley DG, Slowik A, Hardiman O. Screening for replication of genome-wide SNP associations in sporadic ALS. *Eur J Hum Genet* 2009;17:213–8.

43. Dantoine TF, Debord J, Charmes JP, Merle L, Marquet P, Lachatre G, Leroux–Robert C. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2082–8.
44. Dantoine TF, Debord J, Merle L, Lacroix-Ramiandrisoa H, Bourzeix L, Charmes JP. Paraoxonase 1 activity: a new vascular marker of dementia? *Ann N Y Acad Sci* 2002;977:96-101.
45. Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element–binding protein–2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2083–9.
46. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase–1. *Clin Sci (Lond)* 2004;107:435–47.
47. Debono MW, Le Guern J, Canton T, Doble A, Pradier L. Inhibition by riluzole of electrophysiological responses mediated by rat kainate and NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* 1993;235:283-9.
48. Devos D, Moreau C, Lassalle P, Perez T, De Seze J, Brunaud-Danel V, Destée A, Tonnel AB, Just N. Low levels of the vascular endothelial growth factor in CSF from early ALS patients. *Neurology* 2004;62:2127-9.
49. Draganov DI. Human PON3, effects beyond the HDL: clues from human PON3 transgenic mice. *Circ Res* 2007;100:1104–5.
50. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;369:78–88.
51. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein–associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000;275:33435–42.
52. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res* 2005;46:1239–47.
53. Dunckley T, Huentelman MJ, Craig DW, Pearson JV, Szelinger S, Joshipura K, Halperin RF, Stamper C, Jensen KR, Letizia D, Hesterlee SE, Pestronk A, Levine T, Bertorini T, Graves MC, Mozaffar T, Jackson CE, Bosch P, McVey A, Dick A, Barohn R, Lomen–Hoerth C, Rosenfeld J, O'connor DT, Zhang K, Crook R, Ryberg H, Hutton M, Katz J, Simpson EP, Mitsumoto H, Bowser R, Miller RG, Appel SH, Stephan DA.

- Whole-genome analysis of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 2007;357:775–88.
54. Durrington PN, Mackness MI, Bhatnagar D, Julier K, Prais H, Arrol S, Morgan J, Wood GN. Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesteryl ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis* 1998;138:217–25.
  55. Elliott JL. Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;95:172-8.
  56. Erlich PM, Lunetta KL, Cupples LA, Huyck M, Green RC, Baldwin CT, Farrer LA; MIRAGE Study Group. Polymorphisms in the PON gene cluster are associated with Alzheimer disease. *Hum Mol Genet* 2006;15:77–85.
  57. Estevez AG, Stutzmann JM, Barbeito L. Protective effect of riluzole on excitatory amino acid-mediated neurotoxicity in motoneuron-enriched cultures. *Eur J Pharmacol* 1995;280:47-53.
  58. Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 1998;139:307–15.
  59. Ferré N, Camps J, Prats E, Vilella E, Paul A, Figuera L, Joven J. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clin Chem* 2002;48:261–8.
  60. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med* 2009;8:1.
  61. Flirski M, Sobów T. W poszukiwaniu wiarygodnych biochemicznych markerów sporadycznej choroby Alzheimera. *Aktualn Neurol* 2003;3:121-3.
  62. Forte TM, Subbanagounder G, Berliner JA, Blanche PJ, Clermont AO, Jia Z, Oda MN, Krauss RM, Bielicki JK. Altered activities of anti-atherogenic enzymes LCAT, paraoxonase, and platelet-activating factor acetylhydrolase in atherosclerosis-susceptible mice. *J Lipid Res* 2002;43:477–85.
  63. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis* 2002;161:307–16.

64. Gaidukov L, Rosenblat M, Aviram M, Tawfik DS. The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. *J Lipid Res* 2006;47:2492-502.
65. Gajewski P, Jaeschke R, Brożek J. Podstawy EBM czyli podstawy medycyny opartej na danych naukowych dla lekarzy i studentów medycyny. Wyd. I. Medycyna Praktyczna, Kraków 2008. ISBN 978-83-7430-167-1.
66. Gallo V, Bueno-De-Mesquita HB, Vermeulen R, Andersen PM, Kyrozis A, Linseisen J, Kaaks R, Allen NE, Roddam AW, Boshuizen HC, Peeters PH, Palli D, Mattiello A, Sieri S, Tumino R, Jiménez-Martín JM, Díaz MJ, Suarez LR, Trichopoulou A, Agudo A, Arriola L, Barricante-Gurrea A, Bingham S, Khaw KT, Manjer J, Lindkvist B, Overvad K, Bach FW, Tjønneland A, Olsen A, Bergmann MM, Boeing H, Clavel-Chapelon F, Lund E, Hallmans G, Middleton L, Vineis P, Riboli E. Smoking and risk for amyotrophic lateral sclerosis: analysis of the EPIC cohort. *Ann Neurol* 2009;65:378-85.
67. Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanché H, Passa P, Froguel P, Ruiz J. 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. *J Clin Invest* 1997;99:62–6.
68. Gendźwił A. Reaktywne formy tlenu i hiporeaktywność naczyń we wstrząsie septycznym. Część I – Reaktywne formy tlenu i hiporeaktywność naczyń. *Pol Merkur Lekarski* 2007;23:280-3.
69. Gouédard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 2003;63:945-56.
70. Gracy RW, Talent JM, Kong Y, Conrad CC. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutat Res* 1999;428:17-22.
71. Graham AJ, Macdonald AM, Hawkes CH. British motor neuron disease twin study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62:562–9.
72. Greenberg DA, Stewart WC, Rowland LP. Paraoxonase genes and susceptibility to ALS. *Neurology* 2009;73:11-2.
73. Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, Doble A, Taylor CP, Andrus PK, Hall ED. Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1996;39:147-57.
74. Haley RW. Excess incidence of ALS in young Gulf War veterans. *Neurology* 2003;61:750–6.

75. Haley RW, Billecke S, La Du BN. Association of low PON1 type Q (type A) arylesterase activity with neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;157:227–33.
76. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:412–9.
77. Hasselwander O, McMaster D, Fogarty DG, Maxwell AP, Nicholls DP, Young IS. Serum paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure. *Clin Chem* 1998;44:179–81.
78. He BP, Wen W, Strong MJ. Activated microglia (BV-2) facilitation of TNF- $\alpha$ -mediated motor neuron death in vitro. *J Neuroimmunol* 2002;128:31–8.
79. Hebert T, Drapeau P, Pradier L, Dunn RJ. Block of the rat brain IIA sodium channel alpha subunit by the neuroprotective drug riluzole. *Mol Pharmacol* 1994;45:1055-60.
80. Hedrick CC, Hassan K, Hough GP, Yoo JH, Simzar S, Quinto CR, Kim SM, Dooley A, Langi S, Hama SY, Navab M, Witztum JL, Fogelman AM. Short-term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by an immune mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1946–52.
81. Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW, Hanley AJ, Harris SB, Tsui LC, Zinman B. Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3373–7.
82. Hegele RA, Harris SB, Connelly PW, Hanley AJ, Tsui LC, Zinman B, Scherer SW. Genetic variation in paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Canadian Oji-Cree. *Clin Genet* 1998;54:394–9.
83. Horner RD, Kamins KG, Feussner JR, Grambow SC, Hoff-Lindquist J, Harati Y, Mitsumoto H, Pascuzzi R, Spencer PS, Tim R, Howard D, Smith TC, Ryan MA, Coffman CJ, Kasarskis EJ. Occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War veterans. *Neurology* 2003;61:742–9.
84. Hubert JP, Delumeau JC, Glowinski J, Prémont J, Doble A. Antagonism by riluzole of entry of calcium evoked by NMDA and veratridine in rat cultured granule cells: evidence for a dual mechanism of action. *Br J Pharmacol* 1994;113:261-7.



85. Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 2000;275:3957–62.
86. James RW, Leviev I, Righetti A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000;101:2252–7.
87. Jarvik GP, Tsai NT, McKinsty LA, Wani R, Brophy VH, Richter RJ, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Hatsukami TS, Furlong CE. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1329–33.
88. Kamel F, Umbach DM, Hu H, Munsat TL, Shefner JM, Taylor JA, Sandler DP. Lead exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 2005;2:195–201.
89. Kasperaviciute D, Weale ME, Shianna KV, Banks GT, Simpson CL, Hansen VK, Turner MR, Shaw CE, Al-Chalabi A, Pall HS, Goodall EF, Morrison KE, Orrell RW, Beck M, Jablonka S, Sendtner M, Brockington A, Ince PG, Hartley J, Nixon H, Shaw PJ, Schiavo G, Wood NW, Goldstein DB, Fisher EM. Large-scale pathways-based association study in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2007;130:2292–301.
90. Kell DB. Iron behaving badly: inappropriate Iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med Genomics* 2009;2:2.
91. Khersonsky O, Tawfik DS. The histidine 115–histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J Biol Chem* 2006;281:7649–56.
92. Kowalczyk E, Kopff A, Kopff M, Błaszczyk J, Fijałkowski P, Kowalski J. Metabolizm tlenu azotu. *Wiad Lek* 2006;59:889-893.
93. Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. Lancet* 1996;347:1425-31.
94. Lambrechts D, Storkebaum E, Carmeliet P. VEGF: necessary to prevent motoneuron degeneration, sufficient to treat ALS? *Trends Mol Med* 2004;10:275–82.
95. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen

- PM, Carmeliet P. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 2003;34:383-94.
96. Landers JE, Shi L, Cho TJ, Glass JD, Shaw CE, Leigh PN, Diekstra F, Polak M, Rodriguez-Leyva I, Niemann S, Traynor BJ, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Al-Chalabi A, Wills AM, Brown RH Jr. A common haplotype within the PON1 promoter region is associated with sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 2008;9:306-14.
97. Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med* 2003;81:766-79.
98. Li WF, Pan MH, Chung MC, Ho CK, Chuang HY. Lead exposure is associated with decreased serum paraoxonase 1 (PON1) activity and genotypes. *Environ Health Perspect* 2006;114:1233-6.
99. Łuszczewski A, Matyska-Piekarska E, Trefler J, Wawer I, Łacki J, Śliwińska-Stańczyk P. Reaktywne formy tlenu – znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu. *Reumatologia* 2007;45:284-9.
100. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1451-7.
101. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Low paraoxonase in Persian Gulf War Veterans self-reporting Gulf War Syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:729-33.
102. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991;286:152-4.
103. Martin D, Thompson MA, Nadler JV. The neuroprotective agent riluzole inhibits release of glutamate and aspartate from slices of hippocampal area CA1. *Eur J Pharmacol* 1993;250:473-6.
104. Martin JB. Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med* 1999;340:1970-80.
105. Martinelli N, Girelli D, Olivieri O, Guarini P, Bassi A, Trabetti E, Friso S, Pizzolo F, Bozzini C, Tenuti I, Annarumma L, Schiavon R, Franco Pignatti P, Corrocher R. Novel serum paraoxonase activity assays are associated with coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:432-40.
106. Martinelli N, Girelli D, Olivieri O, Stranieri C, Trabetti E, Pizzolo F, Friso S, Tenuti I, Cheng S, Grow MA, Pignatti PF, Corrocher R. Interaction between smoking and PON2

- Ser311Cys polymorphism as a determinant of the risk of myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 2004;34:14-20.
107. Mattson MP. Gene–diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann Intern Med* 2003;139:441–4.
  108. Mazur A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J Biol Chem* 1946;164:271-89.
  109. McGuire V, Longstreth WT Jr, Nelson LM, Koepsell TD, Checkoway H, Morgan MS, van Belle G. Occupational exposures and amyotrophic lateral sclerosis. A population–based case–control study. *Am J Epidemiol* 1997;145:1076–88.
  110. Miller RG, Bouchard JP, Duquette P, Eisen A, Gelinas D, Harati Y, Munsat TL, Powe L, Rothstein J, Salzman P, Sufit RL. Clinical trials of riluzole in patients with ALS. ALS/Riluzole Study Group-II. *Neurology* 1996;47:S86-90.
  111. Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* 2002;(2):CD001447.
  112. Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ, Tsui LC, Prochazka M. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene* 1998;213:149–57.
  113. Morahan JM, Yu B, Trent RJ, Pamphlett R. A gene–environment study of the paraoxonase 1 gene and pesticides in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology* 2007;28:532–40.
  114. Moulard B, Sefiani A, Laamri A, Malafosse A, Camu W. Apolipoprotein E genotyping in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: evidence for a major influence on the clinical presentation and prognosis. *J Neurol Sci* 1996;139 Suppl:34-7.
  115. Mullen SA, Crompton DE, Carney PW, Helbig I, Berkovic SF. A neurologist's guide to genome–wide association studies. *Neurology* 2009;72:558–65.
  116. Nelson LM, Matkin C, Longstreth WT Jr, McGuire V. Population–based case–control study of amyotrophic lateral sclerosis in western Washington State. II. Diet. *Am J Epidemiol* 2000;151:164–73. (b)
  117. Nelson LM, McGuire V, Longstreth WT Jr, Matkin C. Population–based case–control study of amyotrophic lateral sclerosis in western Washington State. I. Cigarette smoking and alcohol consumption. *Am J Epidemiol* 2000;151:156–63. (a)
  118. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V, Hama S, Shih DM, Navab M, Fogelman AM, Lusic AJ, Young S, Reddy ST. Paraoxonase–2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice

- despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem* 2006;281:29491–500.
119. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001;276:44444-9.
  120. Nishio E, Watanabe Y. Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:289–93.
  121. Paragh G, Balla P, Katona E, Seres I, Egerházi A, Degrell I. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2002;252:63-7.
  122. Paragh G, Seres I, Harangi M, Balogh Z, Illyés L, Boda J, Szilvássy Z, Kovács P. The effect of micronised fenofibrate on paraoxonase activity in patients with coronary heart disease. *Diabetes Metab* 2003;29:613–8.
  123. Pedersen WA, Cashman NR, Mattson MP. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal impairs glutamate and glucose transport and choline acetyltransferase activity in NSC-19 motor neuron cells. *Exp Neurol* 1999;155:1–10.
  124. Pedersen WA, Fu W, Keller JN, Markesbery WR, Appel S, Smith RG, Kasarskis E, Mattson MP. Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann Neurol* 1998;44:819–24.
  125. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996;33:498–507.
  126. Ranade K, Kirchgessner TG, Iakoubova OA, Devlin JJ, DelMonte T, Vishnupad P, Hui L, Tsuchihashi Z, Sacks FM, Sabatine MS, Braunwald E, White TJ, Shaw PM, Dracopoli NC. Evaluation of the paraoxonases as candidate genes for stroke: Gln192Arg polymorphism in the paraoxonase 1 gene is associated with increased risk of stroke. *Stroke* 2005;36:2346–50.
  127. Rao SD, Banack SA, Cox PA, Weiss JH. BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Exp Neurol* 2006;201:244–52.
  128. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusic AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme

- with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:542-7.
129. Reed D, Labarthe D, Chen KM, Stallones R. A cohort study of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam and Rota. *Am J Epidemiol* 1987;125:92-100.
  130. Reed DM, Torres JM, Brody JA. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam, 1945-1972. II. Familial and genetic studies. *Am J Epidemiol* 1975;101:302-10.
  131. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 2001;354:1-7.
  132. Rojas-García AE, Solís-Heredia MJ, Piña-Guzmán B, Vega L, López-Carrillo L, Quintanilla-Vega B. Genetic polymorphisms and activity of PON1 in a Mexican population. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;205:282-9.
  133. Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:468-74.
  134. Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, Vaya J, Oren R, Tawfik DS, Aviram M. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. *J Biol Chem* 2006;281:7657-65.
  135. Rothstein JD, Kuncl RW. Neuroprotective strategies in a model of chronic glutamate-mediated motor neuron toxicity. *J Neurochem* 1995;65:643-51.
  136. Rousseau AS, Margaritis I, Arnaud J, Faure H, Roussel AM. Physical activity alters antioxidant status in exercising elderly subjects. *J Nutr Biochem* 2006;17:463-70.
  137. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:461-7.
  138. Rumley AG, Woodward M, Rumley A, Rumley J, Lowe GD. Plasma lipid peroxides: relationships to cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. *QJM* 2004;97:809-16.
  139. Rutkowski R, Pancewicz SA, Rutkowski K, Rutkowska J. Znaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w patomechanizmie procesu zapalnego. *Pol Merkur Lekarski* 2007;23:131-6.

140. Saeed M, Siddique N, Hung WY, Usacheva E, Liu E, Sufit RL, Heller SL, Haines JL, Pericak-Vance M, Siddique T. Paraoxonase cluster polymorphisms are associated with sporadic ALS. *Neurology* 2006;67:771–6.
141. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 1998;62:36–44.
142. Sanghera DK, Manzi S, Minster RL, Shaw P, Kao A, Bontempo F, Kamboh MI. Genetic variation in the paraoxonase-3 (PON3) gene is associated with serum PON1 activity. *Ann Hum Genet* 2008;72:72–81.
143. Schymick JC, Scholz SW, Fung HC, Britton A, Arepalli S, Gibbs JR, Lombardo F, Matarin M, Kasperaviciute D, Hernandez DG, Crews C, Bruijn L, Rothstein J, Mora G, Restagno G, Chiò A, Singleton A, Hardy J, Traynor BJ. Genome-wide genotyping in amyotrophic lateral sclerosis and neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data. *Lancet Neurol* 2007;6:322–8.
144. Sen-Banerjee S, Siles X, Campos H. Tobacco smoking modifies association between Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene and risk of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2120–6.
145. Sentí M, Tomás M, Vila J, Marrugat J, Elosua R, Sala J, Masiá R. Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase1 gene: the REGICOR study. *Atherosclerosis* 2001;156:443–9.
146. Shi J, Zhang S, Tang M, Liu X, Li T, Han H, Wang Y, Guo Y, Zhao J, Li H, Ma C. Possible association between Cys311Ser polymorphism of paraoxonase 2 gene and late-onset Alzheimer's disease in Chinese. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;120:201–4.
147. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Berliner JA, Witztum JL, Lusis AJ. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000;275:17527–35.
148. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Wang SS, Bourquard N, Fogelman AM, Lusis AJ, Reddy ST. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ Res* 2007;100:1200–7.
149. Słowik A, Tomik B, Wolkow PP, Partyka D, Turaj W, Malecki MT, Pera J, Dziedzic T, Szczudlik A, Figlewicz DA. Paraoxonase gene polymorphisms and sporadic ALS. *Neurology* 2006;67:766–70.

150. Strong MJ. The basic aspects of therapeutics in amyotrophic lateral sclerosis. *Pharmacol Ther* 2003;98:379–414.
151. Strong MJ, Kesavapany S, Pant HC. The pathobiology of amyotrophic lateral sclerosis: a proteinopathy? *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:649–64.
152. Su SY, Chen JH, Huang JF, Wang XL, Zhao JG, Shen Y, Qiang BQ, Gu DF. Paraoxonase gene cluster variations associated with coronary heart disease in Chinese Han women. *Chin Med J (Engl)* 2005;118:1167–74.
153. Sutedja NA, Veldink JH, Fischer K, Kromhout H, Wokke JH, Huisman MH, Heederik DJ, Van den Berg LH. Lifetime occupation, education, smoking, and risk of ALS. *Neurology* 2007;69:1508–14.
154. Sutherland WH, Walker RJ, de Jong SA, van Rij AM, Phillips V, Walker HL. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1340–7.
155. Tavori H, Khatib S, Aviram M, Vaya J. Characterization of the PON1 active site using modeling simulation, in relation to PON1 lactonase activity. *Bioorg Med Chem* 2008;16:7504–9.
156. Tokarz A, Jelińska M, Ozga A. Izoprostany – nowe biomarkery lipidowej peroksydacji *in vivo*. *Biul. Wydz. Farm. AMW* 2004,2.
157. Tomás M, Sentí M, García-Faria F, Vila J, Torrents A, Covas M, Marrugat J. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2113–9.
158. Tsimihodimos V, Karabina SA, Tambaki AP, Bairaktari E, Goudevenos JA, Chapman MJ, Elisaf M, Tselepis AD. Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and type IIB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:306–11.
159. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Lusis AJ, Shih DM. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 2002;106:484–90.
160. Valdmanis PN, Kabashi E, Dyck A, Hince P, Lee J, Dion P, D'Amour M, Souchon F, Bouchard JP, Salachas F, Meininger V, Andersen PM, Camu W, Dupré N, Rouleau GA. Association of paraoxonase gene cluster polymorphisms with ALS in France, Quebec, and Sweden. *Neurology* 2008;71:514–20.
161. Van der Gaag MS, van Tol A, Scheek LM, James RW, Urgert R, Schaafsma G, Hendriks HF. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase

- activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis* 1999;147:405–10.
162. Van Es MA, Van Vught PW, Blauw HM, Franke L, Saris CG, Andersen PM, Van Den Bosch L, de Jong SW, van 't Slot R, Birve A, Lemmens R, de Jong V, Baas F, Schelhaas HJ, Slegers K, Van Broeckhoven C, Wokke JH, Wijmenga C, Robberecht W, Veldink JH, Ophoff RA, van den Berg LH. ITPR2 as a susceptibility gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a genome-wide association study. *Lancet Neurol* 2007;6:869–77.
  163. Van Es MA, van Vught PW, Blauw HM, Franke L, Saris CG, Van den Bosch L, de Jong SW, de Jong V, Baas F, van't Slot R, Lemmens R, Schelhaas HJ, Birve A, Slegers K, Van Broeckhoven C, Schymick JC, Traynor BJ, Wokke JH, Wijmenga C, Robberecht W, Andersen PM, Veldink JH, Ophoff RA, van den Berg LH. Genetic variation in DPP6 is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2008;40:29–31.
  164. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995;96:2758–67.
  165. Vijayvergiya C, Beal MF, Buck J, Manfredi G. Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci* 2005;25:2463–70.
  166. Wallace AJ, Sutherland WH, Mann JI, Williams SM. The effect of meals rich in thermally stressed olive and safflower oils on postprandial serum paraoxonase activity in patients with diabetes. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:951–8.
  167. Wehr H, Bednarska-Makaruk M, Graban A, Lipczyńska-Łojkowska W, Rodo M, Bochyńska A, Ryglewicz D. Paraoxonase activity and dementia. *J Neurol Sci* 2009 Mar 4.
  168. Weisskopf MG, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Cudkovicz M, Ascherio A. Prospective study of cigarette smoking and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Epidemiol* 2004;160:26–33.
  169. Weisskopf MG, McCullough ML, Morozova N, Calle EE, Thun MJ, Ascherio A. Prospective study of occupation and amyotrophic lateral sclerosis mortality. *Am J Epidemiol* 2005;162:1146–52.
  170. Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4:3.



171. Williamson TL, Cleveland DW. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* 1999;2:50-6.
172. Wills AM, Cronin S, Slowik A, Kasperaviciute D, Van Es MA, Morahan JM, Valdmanis PN, Meininger V, Melki J, Shaw CE, Rouleau GA, Fisher EM, Shaw PJ, Morrison KE, Pamphlett R, Van den Berg LH, Figlewicz DA, Andersen PM, Al-Chalabi A, Hardiman O, Purcell S, Landers JE, Brown RH Jr. A large-scale international meta-analysis of paraoxonase gene polymorphisms in sporadic ALS. *Neurology* 2009;73:16-24.
173. Wills AM, Landers JE, Zhang H, Richter RJ, Caraganis AJ, Cudkowicz ME, Furlong CE, Brown RH Jr. Paraoxonase 1 (PON1) organophosphate hydrolysis is not reduced in ALS. *Neurology* 2008;70:929-34.
174. Zarkovic K. 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med* 2003;24:293-303.
175. Zintzaras E, Hadjigeorgiou GM. Association of paraoxonase 1 gene polymorphisms with risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2004;49:474-81.