



**UNIWERSYTET MEDYCZNY**  
**IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU**

Katedra i Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych

Łukasz Lewandowski

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Wybrane polimorfizmy genów kodujących insulinę oraz izoenzymy  
dysmutazy ponadtlenkowej, w populacji osób otyłych i/lub chorujących  
na cukrzycę typu drugiego**

**Selected polymorphisms of genes coding insulin and isozymes  
of superoxide dismutase, in people suffering from obesity  
and/or type 2 diabetes**

Promotor rozprawy: prof. dr hab. Halina Milnerowicz

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Marta Kepinska, prof. UMW

Wrocław 2020

**Niniejsza praca doktorska powstała w wyniku realizacji projektu pn. „Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu jako Regionalny Ośrodek Doskonałości w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu” realizowanego w ramach środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Programie „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” w latach 2019 – 2022, nr projektu 016/RID/2018/19, kwota 11 998 121,30 zł**

# 1. Streszczenie

Zdolność antyoksydacyjna organizmu jest utrzymywana dzięki homeostazie stężenia i/lub aktywności antyoksydantów nisko- i wysokocząsteczkowych. Jednym z nich jest dysmutaza ponadtlenkowa – jeden z głównych enzymatycznych antyoksydantów. Enzym ten katalizuje reakcję dysproporcjonacji dwóch cząsteczek anionorodnika ponadtlenkowego, generując cząsteczkę tlenu oraz nadtlenu wodoru. Dysmutaza ponadtlenkowa występuje pod postacią trzech izoenzymów, kodowanych przez różne geny: cytozolowej SOD1 (gen *SOD1*), mitochondrialnej SOD2 (gen *SOD2*) oraz zewnątrzkomórkowej SOD3 (gen *SOD3*). Izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej, oprócz wspomnianej nomenklatury, różnią się także swoistością narządową oraz budową centrum aktywnego: SOD1 i SOD3 są izoenzymami miedziowo-cynkowymi, natomiast SOD2 – izoenzymem manganowym. Utrzymanie właściwej aktywności antyoksydacyjnej tych izoenzymów, w stanie „zdrowia” i choroby, jest kluczowe dla zachowania homeostazy pomiędzy zdolnością antyoksydacyjną, a ilością powstających reaktywnych form tlenu.

Badania literaturowe dotyczące dysmutazy ponadtlenkowej wskazują na związek wybranych polimorfizmów genów *SOD1*, *SOD2*, *SOD3* ze zmiennością aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, choć nieliczne z tych powiązań zostały wyjaśnione. Badania naukowe wykazują także związek wybranych polimorfizmów genów: *INS* (kodującego preproinsulinę), *INSR* (kodującego receptor insuliny), *IRS1*, *IRS2* (kodujących substraty receptora insuliny), z mechanizmem rozwoju insulinooporności oraz podatnością na zachorowanie na cukrzycę typu drugiego.

Celem pracy było zbadanie związku wybranych sześciu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu: rs3842729 (*INS*), rs2234694 (*SOD1*), rs5746105 (*SOD2*), rs4880 (*SOD2*), rs927450 (*SOD2*), rs8192287 (*SOD3*), ze zmiennością stężenia insuliny lub stężenia/aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, w płynie pozakomórkowym (surowica lub osocze). Badana populacja składała się z: 50 osób z grupy porównawczej, 44 osób otyłych, niechorujących na cukrzycę oraz 23 osób chorujących na cukrzycę typu drugiego. Oprócz całkowitej aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, zmierzono jej składowe: aktywność miedziowo-cynkowych dysmutaz ponadtlenkowych (SOD1 i SOD3) oraz aktywność manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD2). Oprócz przedstawiania bezwzględnych wartości tych aktywności, odnoszono je także do stężenia poszczególnych izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1, SOD2, SOD3). Różnice w wartościach tych parametrów zostały odniesione do: stężenia metali: miedzi, cynku oraz kadmu, wybranych parametrów związanych z gospodarką lipidową i węglowodanową, stanem

zapalnym oraz insulinoopornością, wartością całkowitej zdolności antyoksydacyjnej oraz stężeniem MDA – markera peroksydacji lipidów. W analizie zmienności stężenia insuliny oraz stężenia/aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, oprócz chorowania na otyłość i/lub cukrzycę typu drugiego, uwzględniono dwa inne czynniki mogące wpływać na wartości tych parametrów: płeć oraz narażenie na dym tytoniowy (oceniane w oparciu o stężenie kotyniny – metabolitu nikotyny). Zaobserwowane różnice w wartościach badanych parametrów, ze względu na wspomniane czynniki, stanowiły podstawę do dyskusji nad właściwą częścią tej pracy – zbadaniem związku zmienności genotypowej wspomnianych, na początku tego akapitu, polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, genów: *INS*, *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, ze zmiennością stężenia insuliny oraz stężenia/aktywności dysmutazy ponadtlenkowej.

Wyniki otrzymane w niniejszej pracy ukazują złożoność podjętego zagadnienia. Praca ukazuje, że, mimo przyjętej nomenklatury, zgodnie z którą to *SOD3* jest izoenzymem pozakomórkowym, pozostałe izoenzymy: *SOD1* oraz *SOD2*, także występują w osoczu. Stężenie cytozolowego *SOD1*, było kilkukrotnie wyższe u osób chorujących na cukrzycę typu drugiego (w odniesieniu do osób niediabetycznych), co może być związane z długotrwałym procesem przedostawania się *SOD1* z cytozolu do osocza, na skutek wolnorodnikowego uszkodzania błon komórkowych, związanego z insulinoopornością i przewlekłym stanem zapalnym. Tak duży wzrost stężenia *SOD1* u osób diabetycznych, nie był związany z proporcjonalnym zwiększeniem aktywności miedziowo-cynkowych dysmutaz ponadtlenkowych, co może wynikać z procesu glikacji tego enzymu.

Osoby z grupy porównawczej, narażone na dym tytoniowy, wykazywały mniejszy udział miedziowo-cynkowych dysmutaz ponadtlenkowych w całkowitej puli aktywności tego enzymu. Zmiany te wynikały zarówno z inhibicji wspomnianej frakcji przez kadm (stężenie zwiększone u osób narażonych na dym tytoniowy), jak i ze zwiększenia aktywności manganowej dysmutazy ponadtlenkowej – w celu zapobieżenia uszkodzeniom wolnorodnikowym.

W pracy wykazano dodatnie korelacje między wartościami całkowitej zdolności antyoksydacyjnej, stężeniem *SOD1*, wartościami wskaźników BMI oraz HOMA-IR, stężeniem insuliny, glukozy, białka C-reaktywnego oraz MDA. Otrzymane wyniki, wraz z omówionymi wcześniej obserwacjami dotyczącymi osób diabetycznych, sugerują, że zarówno wartości TAC, jak i stężenie *SOD1*, są częścią mechanizmu adaptacyjnego, dostosowującego zdolność oksydacyjną organizmu do intensywności stresu oksydacyjnego, spowodowanego hiperglikemią, stanem zapalnym oraz insulinoopornością. Ponadto, zaobserwowano także większe stężenie produktu peroksydacji lipidów – MDA, u kobiet otyłych, niechorujących na cukrzycę, w odniesieniu do grupy porównawczej. U mężczyzn,

nie zaobserwowano wyraźnych różnic w stężeniu MDA pomiędzy grupą otyłą, a grupą porównawczą, co może świadczyć o lepszej zdolności adaptacyjnej mężczyzn do stresu oksydacyjnego. Zjawisko to może wynikać z występowania, u mężczyzn, w odniesieniu do kobiet, większego stężenia SOD1 oraz aktywności miedziowo-cynkowych dysmutaz ponadtlenkowych (w osoczu), większego stężenia cynku (w surowicy) - występującego w centrum aktywnym SOD1 oraz SOD3, mniejszego stężenia miedzi (w surowicy) - biorącej udział w reinicjacji reakcji Fentona, oraz mniejszego stężenia kadmu (we krwi pełnej) – inhibitora miedziowo-cynkowych dysmutaz ponadtlenkowych. O ile zmienność międzyplciowa stężenia SOD1 była niezależna od chorowania na otyłość lub cukrzycę typu drugiego, różnice między mężczyznami, a kobietami, dotyczące wartości pozostałych ze wspomnianych parametrów – nie zawsze były wyraźne, co świadczy o złożoności podjętego tematu.

Istotnych informacji dostarczyła analiza wartości parametrów gospodarki węglowodanowej, w kontekście polimorfizmu rs3842729 genu kodującego preproinsulinę (*INS*). U osób diabetycznych, o genotypie G/G, zaobserwowano większe wartości: stężenia glukozy oraz wskaźnika HOMA-IR. Model regresji logistycznej wykazał związek genotypu G/G z około 2,8-krotnie większą szansą występowania cukrzycy typu drugiego. Obserwacje te wskazują na możliwy związek zmienności genotypowej polimorfizmu rs3842729 z predyspozycją do wystąpienia cukrzycy oraz pogłębieniem stanu insulinooporności u osób chorujących na tę chorobę.

Co ciekawe, związek z szansą wystąpienia stanu otyłości lub cukrzycy typu drugiego wykazano także w kontekście jednego z trzech badanych polimorfizmów genu *SOD2*, kodującego manganową dysmutazę ponadtlenkową. Modele regresji logistycznej wskazały na prawdopodobny związek genotypu C/T polimorfizmu rs4880 z około 4-krotnie większą szansą na występowanie otyłości oraz około 5-krotnie mniejszą szansą na występowanie cukrzycy typu drugiego, w odniesieniu do genotypu C/C. W grupie porównawczej, zmienność genotypową polimorfizmu rs4880 powiązano także z różnicami w aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, co wytłumaczono substytucją Val16Ala w sekwencji aminokwasowej *SOD2*, związanej z procesem migracji tego białka do macierzy mitochondrialnej. Osoby o genotypie T/T, wykazywały najniższe wartości całkowitej aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, co było związane z występowaniem najniższych wartości aktywności obydwu frakcji tego enzymu: miedziowo-cynkowej (*SOD1* i *SOD3*) oraz manganowej (*SOD2*).

Zaobserwowane, w grupie diabetycznej, różnice w aktywności dysmutazy ponadtlenkowej powiązano ze zmiennością genotypową polimorfizmów niezwiązanych z szansą występowania otyłości lub cukrzycy typu drugiego: rs2234694 (*SOD1*), rs5746105

(*SOD2*). Obserwacje są zaskakujące, gdyż oba polimorfizmy występują w sekwencjach intronowych, więc nie mają bezpośredniego związku ze zmiennością w sekwencji aminokwasowej *SOD1* i *SOD2*. Osoby diabetyczne, o genotypie A/C rs2234694 wykazywały większy udział miedziowo-cynkowych dysmutaz ponadtlenkowych (*SOD1* i *SOD3*) w całkowitej puli aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, co wytłumaczono zaobserwowaną u tych osób, ponad 1,5-krotnie większą medianą stężenia *SOD1* oraz, ponad 1,3-krotnie większą – medianą stężenia *SOD3*. Osoby z grupy porównawczej, o genotypie A/C, wykazywały większe stężenie *SOD3*, natomiast osoby z grupy otyłej niediabetycznej, o genotypie A/C – mniejsze stężenie *SOD1*, w odniesieniu do osób o genotypie A/A. Osoby diabetyczne, o genotypie T/T rs5746105 wykazywały mniejsze stężenie *SOD2*.

Mimo otrzymanych wyników, świadczących o możliwym związku polimorfizmów genów: *SOD1*, *SOD2*, ze zmiennością stężenia i/lub aktywności izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej, należy pamiętać o możliwym wpływie na te wartości innych czynników, nie wziętych pod uwagę w niniejszej pracy.

## 2. Abstract

Antioxidative capacity is maintained due to homeostasis in concentration/activity of low- and high-molecular weight antioxidants, such as superoxide dismutase - one of the main enzymatic antioxidants. This enzyme catalyzes the disproportionation reaction of two superoxide anion radical molecules, generating oxygen and hydrogen peroxide molecules. Superoxide dismutase occurs in the form of three isozymes, encoded by different genes: cytosolic SOD1 (*SOD1* gene), mitochondrial SOD2 (*SOD2* gene) and extracellular SOD3 (*SOD3* gene). Superoxide dismutase isozymes, in addition to the differences in nomenclature, mentioned above, also differ in organ specificity and structure of the active centre: SOD1 and SOD3 are copper-zinc isozymes, while SOD2 – is a manganese isozyme. Proper activity of these isozymes, in the state of "health" and disease, is crucial for maintaining the homeostasis between antioxidative capacity and the generated amount of reactive oxygen species. Literature indicates variability in values of the total SOD activity, in people suffering from obesity and/or diabetes, compared to people from control groups, which is associated with differences in susceptibility towards free radical damage, including damage to the pancreatic islands, leading to disorders in insulin secretion.

Literature on superoxide dismutase indicates a possible association between several selected polymorphisms of the *SOD1*, *SOD2*, *SOD3* genes and the variability of superoxide dismutase activity, although only few of these associations have been thoroughly explained. Scientific studies also show a relationship between selected gene polymorphisms: *INS* (coding for preproinsulin), *INSR* (coding for insulin receptor), *IRS1*, *IRS2* (coding for insulin receptor substrates), with the mechanism of insulin resistance development and susceptibility to type 2 diabetes.

The aim of the study was to investigate the relationship of six selected single nucleotide polymorphisms: rs3842729 (*INS*), rs2234694 (*SOD1*), rs5746105, rs4880, rs927450 (*SOD2*), rs8192287 (*SOD3*), with the variability of insulin concentration or concentration/activity of superoxide dismutase in extracellular fluid (serum or plasma). The study population consisted of: 50 people from the comparative group, 44 obese, non-diabetic and 23 people with type 2 diabetes. In addition to the values of total superoxide dismutase activity, its fractions: copper zinc superoxide dismutase activity (SOD1 and SOD3) and manganese superoxide dismutase activity (SOD2), were also measured. In addition to showing the absolute values of these activities, these values were also referred to the concentration of individual isozymes of superoxide dismutase (SOD1, SOD2, SOD3). The differences in the values of these parameters were related to: concentration of metals:

copper, zinc and cadmium, selected parameters related to: lipid and carbohydrate metabolism, inflammation and insulin resistance, values of total antioxidant capacity and the concentration of MDA - a marker of lipid peroxidation. In the process of analysis of the variability of values of insulin concentration and superoxide dismutase concentration/activity, in addition to obesity and/or type 2 diabetes, two other factors that may affect the values of these parameters were taken into account: gender and exposure to tobacco smoke (based on the concentration of cotinine, a nicotine metabolite). The observed differences in the values of the studied parameters, associated with the aforementioned factors, formed the basis for discussion on the main topic of this work - the relationship between genotypic variability of the single nucleotide polymorphisms mentioned at the beginning of this paragraph, in genes: *INS*, *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, and the variability in insulin concentration and superoxide dismutase concentration/activity.

The results obtained in this work show the complexity of the issue. This work shows that, despite the commonly-adopted nomenclature, according to which only the SOD3 is an extracellular isoenzyme, the remaining isozymes: SOD1 and SOD2, also occur in plasma. The concentration of "cytosolic" SOD1 was several times higher in patients with type 2 diabetes (in relation to non-diabetic groups), which may be associated with the ongoing process of SOD1 liberation from the cytosol, to the plasma, due to free radical damage in cell membranes, which may be connected with: insulin resistance and chronic inflammation. Despite the large increase in SOD1 concentration in diabetic individuals, no relative increase in the activity of copper-zinc superoxide dismutases was observed, what may be due to glycation of this enzyme.

Individuals of the comparative group, exposed to cigarette smoke, showed a lower contribution of copper-zinc superoxide dismutases to the total superoxide dismutase activity pool. The cause of this occurrence were: inhibition of the mentioned enzyme fraction by cadmium (increased concentration was observed in individuals exposed to cigarette smoke), and increase in manganese superoxide dismutase activity – to prevent from oxidative damage.

In this work, positive correlations between the values of total antioxidative capacity, SOD1 concentration, BMI and HOMA-IR indices, insulin, glucose, C-reactive protein and MDA concentration were observed. The obtained results, along with the aforementioned observations regarding the diabetic individuals, suggest, that either TAC or SOD1 concentration are a part of an adaptive mechanism, which adjusts the antioxidative capacity of the organism – to the intensity of oxidative stress, caused by hyperglycemia, inflammation and insulin resistance. Moreover, an increase in MDA (lipid peroxidation product) concentration was observed in obese, non-diabetic women, in reference to the comparative



group. In men, no such difference in MDA concentration were found between the obese, non-diabetic and the comparative group, what may account for better adaptive capability of men – towards oxidative stress. This phenomenon observed in men may stem from: higher values of SOD1 concentration, higher copper-zinc superoxide dismutases' activity (in plasma), higher concentration of zinc (in serum) – found in the active site of SOD1 and SOD3, lower concentration of copper – taking part in the reinitiation of Fenton reaction, and lower concentration of cadmium (in blood) – an inhibitor of copper-zinc superoxide dismutases. While the inter-sex variability in SOD1 concentration was independent of obesity or type 2 diabetes, the differences between men and women regarding the values of the remaining parameters were not always noticeably different, which indicates the complexity of the subject.

The analysis of carbohydrate metabolism parameters in the context of polymorphism rs3842729 of the gene encoding preproinsulin (*INS*) provided important information. In diabetic people with the G/G genotype, higher values of glucose concentration and HOMA-IR index were observed. Logistic regression model showed an association between the G/G genotype and approximately 2.8-fold higher chance of developing type 2 diabetes, indicating a possible relationship between the genotypic variability of rs3842729 polymorphism and the: susceptibility to diabetes, and an increase in insulin resistance, in patients suffering from this disease.

Interestingly, an association with the chance developing obesity or type 2 diabetes was also shown in case of one of the three studied polymorphisms of the *SOD2* gene encoding manganese superoxide dismutase. Logistic regression models indicated an association of the C/T genotype of the rs4880 polymorphism with an approximately 4-fold higher chance of developing obesity and an approximately 5-fold lower chance of developing type 2 diabetes, compared to the C/C genotype. In the comparative group, the genotype variability of the rs4880 polymorphism was also associated with alterations in superoxide dismutase activity, which was explained by the Val16Ala substitution in the *SOD2* amino acid sequence, associated with the migration of this protein into the mitochondrial matrix. Individuals of T/T genotype, were characterized by the lowest values of total superoxide dismutase activity, which was due to the occurrence of the lowest values of the activity of both fractions of superoxide dismutase: copper zinc (SOD1 and SOD3) and manganese (SOD2).

The differences in superoxide dismutase activity, observed in the diabetic group, were also associated with the genotypic variability of polymorphisms not related to the chance of obesity or type 2 diabetes: rs2234694 (*SOD1*), rs5746105 (*SOD2*). These observations are surprising, since both polymorphisms occur in intron sequences, thus, should not have

any direct relationship with the variability in the amino acid sequence of SOD1 and SOD2. Diabetic individuals of A/C rs2234694 genotype showed greater values of the contribution of copper-zinc superoxide dismutase (SOD1 and SOD3) to the total superoxide dismutase activity pool, which was explained by the over 1.5-fold higher median value of SOD1 concentration and over 1.3-fold higher median value of SOD3 concentration. Individuals from the comparative group, of A/C genotype, were characterized by higher SOD3 concentration, whereas individuals from the obese, non-diabetic group, of A/C genotype, were characterized by lower SOD1 concentration, compared to individuals of A/A genotype. People of T/T rs5746105 genotype were characterized by lower SOD2 concentration.

Despite the fact that the obtained results may indicate a relationship between the polymorphisms of the: *SOD1*, *SOD2* genes, and the variability of concentration/activity of superoxide dismutase isozymes, one should remember about the possible impact of other factors (which were not taken into consideration in this study) on the values of these parameters. In order to fully answer the questions posed in this work, it is necessary to carry out research on a larger number of people, in the future.