

Univerza v Ljubljani
Medicinska fakulteta



RAZISKOVALNA NALOGA

Vpliv genetske variabilnosti na parametre vnetja med zdravljenjem hiperholesterolemije z zaviralci PCSK9

Tematsko področje: Medicina

Avtor: Nik Podkrajšek,
dijak 4.c

Mentorica: prof. Daniela Vlačič
Somentor: izr. prof. dr. Miran Šebešič

Ljubljana, 2022
Gimnazija Bežigrad

Kazalo vsebine

Kazalo slik	- 4 -
Kazalo tabel	- 4 -
Kazalo prilog	- 5 -
Kazalo ena b	- 5 -
Seznam kratic	- 6 -
1. Povzetek	- 7 -
2. Abstract	- 8 -
3. Uvod	- 9 -
3.1. Pregled objav	- 9 -
3.1.1. Ateroskleroza	- 9 -
3.1.2. Lipoproteini in ateroskleroza	- 10 -
3.1.3. Ateroskleroza in vnetje	- 11 -
3.1.4. Genetski dejavniki, ki vplivajo na razvoj in napredovanje ateroskleroze	- 12 -
3.1.5. Zdravljenje hiperholesterolemij	- 13 -
3.2. Namen dela, cilji in hipoteze	- 14 -
4. Eksperimentalni del	- 15 -
4.1. Skupina preiskovancev	- 15 -
4.2. Molekularno genetske metode	- 16 -
4.2.1. Merjenje koncentracije in istote DNA	- 16 -
4.2.2. Redenje vzorcev DNA	- 17 -
4.2.3. Reakcija s polimerazo v realnem času	- 18 -
4.3. Statistična analiza	- 23 -
5. Rezultati	- 24 -
5.1. Klinični in laboratorijski rezultati	- 24 -
5.2. Molekularno genetski rezultati	- 25 -
5.2.1. Razporeditev alelov in genotipov	- 25 -
5.3. Rezultati statistične analize	- 27 -
5.3.1. Hardy-Weinbergovo ravnotežje	- 27 -
5.3.2. Vpliv zdravljenja z zaviralci PCSK9 na vrednosti vnetnih parametrov in lipidov	- 27 -
6. Razprava	- 32 -
7. Zaključek	- 35 -
8. Zahvala	- 35 -
9. Literatura	- 36 -
10. Priloge	- 39 -

Kazalo slik

Slika 1: Struktura Lp(a) z označeni deli: LDL (lipoproteini nizke goste), apolipoprotein B100 (ApoB100) in apolipoprotein (a) (apo(a)); povzeto in prirejeno po (8).	- 11 -
Slika 2: Shema eksperimentalnega dela	- 15 -
Slika 3: Merjenje čistote DNA na napravi NanoDrop One (Kobis) (avtorica fotografije I. Sotlar).	- 17 -
Slika 4: Postopek verižne reakcije s polimerazo (PCR); prirejeno po (38).....	- 18 -
Slika 5: Genotipizacija s TaqMan sondami; povzeto in prirejeno po (38).....	- 19 -
Slika 6: Pipetiranje predhodno pripravljene reakcijske zmesi na reagenčni nosilec v komori za pipetiranje (avtorica fotografije I. Sotlar).....	- 21 -
Slika 7: Centrifugiranje reagenčnega nosilca (avtorica fotografije I. Sotlar).....	- 22 -
Slika 8: Delo na napravi QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System. Prikazano je vstavljanje reagenčnega nosilca v aparat (avtorica I. Sotlar).	- 22 -
Slika 9: Razporeditev genotipov pri celotni skupini preiskovancev za polimorfizme a) rs1800795 gena IL6, b) rs1800629 gena TNFA, c) rs1800947 gena CRP in d) rs2010963 gena VEGFA. Pogled iz QuantStudio™ Real-Time PCR Software v2.6.	- 26 -
Slika 10: Povezava genotipov polimorfizmov a) rs1800947 gena CRP, b) rs1800629 gena TNFA in c) rs1800795 gena IL6 s koncentracijami vnetnih dejavnikov pred in po zdravljenju z zaviralci PCSK9.	- 30 -

Kazalo tabel

Tabela 1: Kompleti sond in začetnih oligonukleotidov za določanje polimorfizmov rs1800795, rs1800629, rs1800947, rs2010963 proizvajalca Thermo Fisher Scientific	- 20 -
Tabela 2: Koncentracija reakcijske zmesi.	- 21 -
Tabela 3: Postopek pomnoževanja z TaqMan sondami.	- 23 -
Tabela 4: Značilnosti celotne skupine preiskovancev ob vključitvi v raziskavo (N = 69). - 24 -	- 24 -
Tabela 5: Genotipi in izražanje Hardy-Weinbergovega ravnotežja (pHW: vrednost p Hardy-Weinbergovega ravnotežja).....	- 27 -
Tabela 6: Primerjava izmerjenih parametrov v celotni skupini preiskovancev in sicer pred zdravljenju z zaviralci PCSK9 in 6 mesecev po začetku zdravljenja.....	- 28 -
Tabela 7: Povezave med genotipi analiziranih polimorfizmov in vrednosti vnetnih parametrov preiskovancev ob vstopu v raziskavo.	- 29 -
Tabela 8: Povezave med genotipi analiziranih polimorfizmov in vrednosti vnetnih parametrov preiskovancev po šestih mesecih zdravljenja z zaviralci PCSK9.	- 29 -
Tabela 9: Povezave med genotipi analiziranih polimorfizmov VEGFA rs2010963 in spremembo v koncentraciji vnetnih parametrov pri preiskovancih po šestih mesecih zdravljenja z zaviralci PCSK9.....	- 31 -

Kazalo prilog

Priloga 1: Povzetek sprejet za predstavitev v obliki plakata na mednarodni konferenci Evropskega združenja za humano genetiko na Dunaju.....	- 39 -
Priloga 2: Naslovnica rokopisa, ki opisuje rezultate te naloge, in je bil oddan v presojo za objavo v reviji Journal of Cardiovascular Development and Disease.....	- 40 -

Kazalo ena b

Ena ba 1: Izra un volumna vzorca DNA v μL za red enje DNA na koncentracijo $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$...-	18 -
--	------

Seznam kratic

°C	stopinja Celzija
A	adenin
apo(a)	apolipoprotein (a)
apoA1	apolipoprotein A1
apoB100	apolipoprotein B100
bp	bazni par
C	citozin
CRP	C-reaktivni protein
dH ₂ O	destilirana voda
DNA/DNK	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
G	gvanin
HDL	lipoproteini visoke gostote (angl. high density lipoprotein)
hsCRP	C-reaktivni protein visoke občutljivosti (angl. High sensitive C-reactive protein)
HW	Hardy-Weinbergovo ravnotežje
IL6	interlevkin 6
kg/m ²	kilogram/kvadratni meter
LDL	lipoproteini nizke gostote (angl. low density lipoprotein)
lp(a)	apolipoprotein mali a
mg/L	miligram/liter
min	minuta
mL	mililiter
mm Hg	milimeter živega srebra
mmol/L	milimol/liter
ng/L	nanogram/liter
ng/μL	nanogram/mikroliter
nm	nanometer
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PCSK9	proprotein subtilisin/keksin konvertaza tipa 9
pHW	p vrednost Hardy-Weinbergovega ravnotežja
PMA	pogostost manj zastopanega alela
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo
TNF-	dejavnik tumorske nekroze
UV	ultravijoli no
VEGF	žilni endotelijski rastni dejavnik (angl. vascular endothelial growth factor)
μL	mikroliter

1. Povzetek

Ateroskleroza je kroni na vnetna bolezen žilnih sten, ki vodi v razvoj srno-žilnih bolezni. Dejavniki tveganja za njen razvoj je tudi povišana koncentracija aterogenih lipoproteinov, ki se lahko znižuje z novejšimi zdravili, kot so zaviralci proprotein konvertaze subtilisin/keksin tipa 9 (PCSK9). Obseg vnetja pri aterosklerozi odražajo vnetni dejavniki, kot so interleukin 6 (IL6), dejavnik tumorske nekroze (TNF- α) in C-reaktivni protein (CRP).

Genetski dejavniki, ki vplivajo na vnetje pri aterosklerozi preiskovancev, ki so zdravljeni z zaviralci PCSK9, še niso podrobno raziskani. Zato smo se v nalogi osredotočili na preučevanje genetskega vpliva na parametre vnetja med zdravljenjem z zaviralci PCSK9 pri preiskovancih, ki so že imeli miokardni infarkt. S kvantitativnim PCR smo v vzorcih DNA določili ali polimorfizme rs1800795 gena *IL6*, rs1800629 gena *TNFA*, rs1800947 gena *CRP* in rs2010963 gena *VEGFA*. Nato smo statistično ovrednotili njihovo povezavo z vnetnim stanjem, ki je bilo ocenjeno s koncentracijami dejavnikov vnetja hsCRP, IL6 in TNF- α pred začetkom zdravljenja in po šestih mesecih zdravljenja.

Potrdili smo, da so zaviralci PCSK9 znižali vrednost celokupnega holesterola in LDL, kar je bilo pričakovano, niso pa vplivali na vrednosti vnetnih dejavnikov hsCRP, IL6 in TNF- α . Izmed analiziranih polimorfizmov smo potrdili le vpliv polimorfizma rs1800795 gena *IL6* na spremembo vnetnega dejavnika IL6 v opazovanem časovnem obdobju. Razlog za to je lahko nekoliko majhna skupina preiskovancev, ki v primeru redkih polimorfizmov ne odraža dejanske razporeditve genotipov. Zato bi bilo smiselno raziskavo razširiti še na druge genetske dejavnike.

Ključne besede: ateroskleroza, hiperholesterolemija, kvantitativna verižna reakcija s polimerazo, hsCRP, IL6, TNF- α , VEGF

2. Abstract

Atherosclerosis is a chronic inflammatory vascular disease leading to the development of cardiovascular diseases. Among others, elevated cholesterol levels are a risk factor for its development and can be treated with newer drugs such as proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibitors. The extent of inflammation in atherosclerosis is reflected by inflammatory factors such as interleukin 6 (IL6), tumor necrosis factor (TNF- α), and C-reactive protein (CRP).

Genetic factors influencing inflammation in atherosclerosis of subjects treated with PCSK9 inhibitors have not been fully elucidated. Therefore, in this study, we focused on the genetic factors that may influence inflammatory parameters during treatment with PCSK9 inhibitors in subjects who had a previous myocardial infarction. In these subjects, polymorphisms rs1800795 of the *IL6* gene, rs1800629 of the *TNFA* gene, rs1800947 of the *CRP* gene and rs2010963 of the *VEGFA* gene were determined by quantitative PCR in DNA samples. We statistically evaluated their association with the inflammation, which was assessed by the concentrations of inflammatory factors hsCRP, IL6, and TNF- α before the treatment and after six months.

We confirmed that as expected PCSK9 inhibitors lowered total cholesterol and LDL levels, but did not affect the inflammatory parameters hsCRP, IL6, and TNF- α . Among the analysed polymorphisms only association of *IL6* gene polymorphism on the change of IL6 levels was confirmed in the observed period. This may be due to a relatively small group of subjects, which in the case of rare polymorphisms did not reflect the actual distribution of the genotypes. In the future analysis of additional genetic factors might prove useful.

Key words: atherosclerosis, hypercholesterolaemia, quantitative polymerase chain reaction, hsCRP, IL6, TNF- α , VEGF

3. Uvod

Zvišane vrednosti aterogenih lipoproteinov torej hiperholesterolemija je izjemno pogosto prisotna pri odraslih in je pomemben dejavnik tveganja za razvoj ateroskleroze. Na zvišane koncentracije lipoproteinov v krvi vplivajo genetski dejavniki in tudi okoljski dejavniki, kot je prehrana in športna aktivnost. V moji družini imajo hiperholesterolemijo oče, pa tudi ded in stric po očetovi strani. Zato se sprašujem, kakšna je možnost, da bova imela hiperholesterolemijo in z njo povezane klinične zaplete tudi jaz in moja sestra, ko bova odrasla, in ali to lahko preprečiva. Ker me je ta tematika pritegnila, sem želel na tem področju delati tudi raziskovalno nalogo. Zato sem za somentorstvo pri nalogi zaprosil izr. prof. dr. Mirana Šebeštjena, ki je zaposlen na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani in na Medicinski fakulteti v Ljubljani, in se s tem področjem ukvarja strokovno in raziskovalno. Raziskovalno nalogo sem pripravil v šolskem letu 2021/2022, kot del večje raziskave na področju ateroskleroze, ki jo vodi izr. prof. dr. Miran Šebeštjen. V predhodnih raziskavah so bili že izolirani vzorci DNA ter določene vrednosti aterogenih lipoproteinov in vnetnih dejavnikov. V moji raziskovalni nalogi pa sem samostojno izvedel molekularno genetske analize izbranih polimorfizmov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR), in sicer v Laboratoriju za translacijsko medicinsko biokemijo na Medicinski fakulteti, ter s pomočjo sodelavke v laboratoriju tudi statistično analizo pridobljenih podatkov.

3.1. Pregled objav

3.1.1. Ateroskleroza

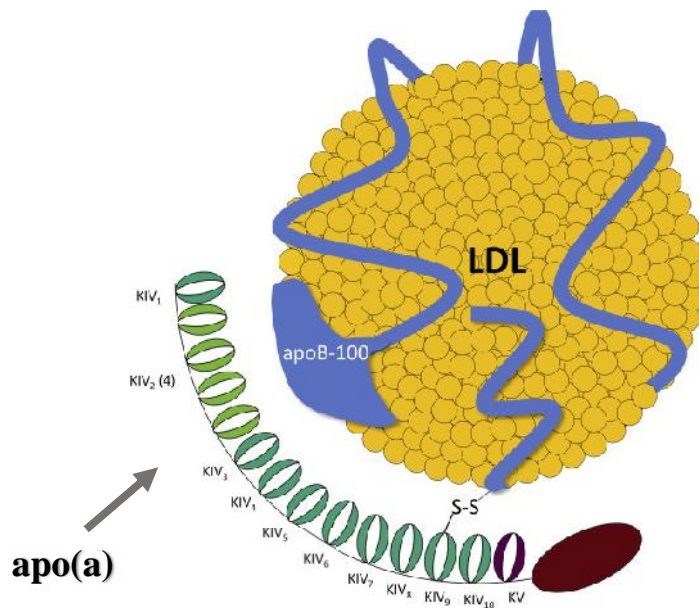
Ateroskleroza je kronična vnetna bolezen žilnih sten in vodi v razvoj srčno-žilnih bolezni, ki so v razvitem svetu eden najpomembnejših vzrokov obolevnosti in umrljivosti pri odraslih. Pri tem pride do kopičenja lipidov in vezivnega tkiva v notranjih plasteh žilne stene (1). Proces razvoja ateroskleroze se začne z okvaro notranjih plasti žilne stene, ki ga imenujemo endotelij, zaradi mehanskih, kemičnih in presnovnih vzrokov, ki mu sledi vnetni odgovor. Zaradi postopnega kopičenja aterogenih lipoproteinov, predvsem holesterola nizke gostote (LDL), gladkih mišičnih celic in veziva pride do zmanjšanja notranjega premera (lumna) arterij. Bolezen napreduje po asi, saj v začetni fazi posameznik nima resnejših težav, dokler ni žilni lumen zmanjšan za vsaj 70%. To je še posebno kritično v žilah srca, kjer krvni strdek lahko povzroči srčni infarkt, in v možganih, kjer vodi v možgansko kap (2).

Na razvoj in hitrost napredovanja ateroskleroze vplivajo različni dejavniki tveganja kot so visok krvni tlak, zvišana vrednost predvsem holesterola LDL, sladkorna bolezen, kajenje, debelost, starost, fizična neaktivnost, pretirano uživanje alkohola ter genetska nagnjenost (1). Ker je zvišana vrednost serumskega holesterola eden izmed najpomembnejših dejavnikov tveganja za aterosklerozo, je klinično izredno pomembno določiti vrednosti lipoproteinov v krvi. S pomočjo vseh teh dejavnikov se lahko na podlagi različnih tabel oceni tveganje posameznika za usodne ali neusodne srčno-žilne zaplete (3).

3.1.2. Lipoproteini in ateroskleroza

Holesterol LDL prenaša holesterol do tkiv. Ob previsokih koncentracijah holesterola LDL, še posebno, je zaradi drugih dejavnikov tveganja povišan tudi oksidativni stres, ki LDL delce oksidativno spremeni, se holesterol za ne nalagati v stene arterij v obliki aterosklerotičnih plakov. Zato so zvišane vrednosti holesterola LDL, kar imenujemo stanje hiperholesterolemije, pomemben dejavnik tveganja za razvoj ateroskleroze (4). Prav nasprotno pa lipoproteini visoke gostote (angl. high density lipoprotein; HDL) odnašajo presežni holesterol iz žilne stene nazaj v jetra in zato delujejo varovalno pred razvojem ateroskleroze. Pomemben apolipoprotein, ki sestavlja HDL, je apolipoprotein A1 (ApoA1). V zadnjih nekaj letih raziskave kažejo, da je najpomembnejši dejavnik za razvoj ateroskleroze holesterol LDL in njegova vrednost naj bi bila zato nižja. Zato ne moremo natančno določiti zaželene vrednosti, ampak je ta le arbitrarno postavljena za določeno populacijo. Posameznikom, ki nimajo povišanega tveganja za aterosklerozo in bolezni srca in ožilja, naj bi imeli vrednosti celokupnega holesterola pod 5,2 mmol/L, holesterola LDL pod 3,4 mmol/L, in holesterola HDL pri ženskah nad 1,3 mmol/L in pri moških nad 1,0 mmol/L (5).

Lipoprotein(a) (Lp(a)) predstavlja neodvisni dejavnik tveganja za nastanek srčno-žilnih bolezni (6). Po sestavi je podoben holesterolu LDL, vendar ima na apolipoprotein B100 (apoB100) kovalentno vezan še apolipoprotein (a) (apo(a)), kot je prikazano na Sliki 1. Lp(a) ima tako vse aterogene lastnosti kot LDL holesterol, vključno z dovzetnostjo za oksidacijo, potem ko vstopi v žilno, kar vodi v nastanek zelo imunogenega oksidirane holesterola LDL (7). Prehajanje Lp(a) preko endotelija v žilno steno pa ni odvisno le od koncentracije, kot pri holesterolu LDL, ampak tudi od prisotnosti drugih dejavnikov tveganja in s tem propustnosti endotelija (8). Vendar pa je Lp(a) v enaki koncentraciji kot LDL veliko bolj aterogen, saj vsebuje tudi apo(a). Apo(a) deluje protrombogeno zaradi svoje podobnosti s plazminogenom, in s tem tekmuje za njegova vezavna mesta v procesu strjevanja krvi (hemostaze) (9). Njegovo protrombogeno in antifibrinolitično delovanje poveča možnost nastanka krvnega strdka ob razpoku aterosklerotične lezije, ki je največkrat vzrok akutnega srčno-žilnega dogodka (2). Tretji mehanizem preko katerega Lp(a) deluje proaterogeno, pa je pospeševanje vnetnega odgovora zaradi vsebnosti oksidiranih fosfolipidov (OxPL)(10). Lp(a) pospeši nastanek vnetnih dejavnikov, kot sta interleukin 6 (IL6) in dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF α), kar destabilizira aterosklerotične plake na žilni steni in zato vpliva na hitrejše napredovanje ateroskleroze in na pojavnost akutnih srčno-žilnih dogodkov. Vrednosti Lp(a), ki predstavljajo povišano tveganje za napredovanje ateroskleroze, so višje od 300 mg/L (11). Hkrati imajo posamezniki s povišanimi koncentracijami Lp(a), ki so že imeli miokardni infarkt, večje tveganje, da se ta ponovi (12). Zavedati pa se moramo, da ima večina bolnikov, ogroženih zaradi kardiovaskularnih bolezni, normalne vrednosti Lp(a), tako da je bolnikov s povečano koncentracijo holesterola LDL bistveno več kot pa bolnikov s povečano koncentracijo Lp(a).



Slika 1: Struktura Lp(a) z označenimi deli: LDL (lipoproteini nizke goste), apolipoprotein B100 (ApoB100) in apolipoprotein (a) (apo(a)); povzeto in prirejeno po (8).

3.1.3. Ateroskleroza in vnetje

Vnetje je zelo pomembno pri nastanku in tudi pri napredovanju ateroskleroze, zato velja, da je ateroskleroza kroni na vnetna bolezen (13). Prepoznavanje bioloških označevalcev vnetja v krvi je tako klini- no pomembno pri prepoznavanju bolezni in pri napovedovanju njenega poteka (14). Med najpomembnejše dejavnike, ki sodelujejo pri napredovanju vnetja, sodita vnetna dejavnika IL6 in TNF- (15). Znano je, da so koncentracije obeh proteinov zvišane tudi ob nizkostopenjskem vnetju žilne stene, ki je značilno za aterosklerozo. Zvišane vrednosti IL6 v krvi so povezane z 2 do 3-krat večjim tveganjem za srčno-žilne dogodke.

C-reaktivni protein (CRP) je reaktant akutne faze vnetja in pokazatelj sistemskega vnetnega odgovora ter sedaj velja za enega najpomembnejših pokazateljev tveganja za srčno-žilne bolezni (16). CRP bi lahko vplival tudi na ranljivost aterosklerotične leše preko različnih mehanizmov, tudi preko spremenjenega privzema holesterola LDL v makrofage. Merjenje koncentracije CRP lahko neodvisno predvidi tveganje za srčni infarkt, periferno arterijsko bolezen, možgansko kap ali nenadno srčno smrt pri navidezno zdravih ljudeh, tudi ko so vrednosti holesterola LDL nizke (16). Normalne vrednosti pri preiskovancih, ki nimajo prisotne bakterijskega ali virusnega vnetja, so do 5 mg/L (5). Pogosto se CRP v laboratoriju določa z bolj občutljivo metodo, ki omogoča natančno določanje vrednosti CRP pod 5 mg/L pri stanjih, za katere je značilno nizko stopenjsko vnetje, kar velja tudi za aterosklerozo. Takrat govorimo o visoki občutljivi CRP (angl. high-sensitivity CRP; hsCRP). Pri tem je tveganje za razvoj kardiovaskularnih zapletov nizko, če je vrednost hsCRP manj kot 1 mg/L, srednje, če je vrednost hsCRP med 1 in 3 mg/L, ter visoko, če je vrednost hsCRP nad 3 mg/L (17). Najverjetneje je določitev vrednosti CRP najbolj smiselna pri osebah, ki imajo srednje tveganje za srčno-žilne dogodke, pri tem je mejna vrednost približno 2 mg/l (18, 19). V raziskavah pri bolnikih po akutnem srčno-žilnem dogodku se je

izkazalo, da je zmanjšanje tveganja za ponovni sre no-žilni dogodek najve je pri bolnikih z ve jimi izhodiš nimi vrednostmi CRP ne glede na vrednosti holesterola LDL (20).

Doslej še ne podrobno raziskan vnetni dejavnik je žilni endotelijski rastni faktor (angl. vascular endothelial growth factor; VEGF). Nastaja v endotelijskih celicah (21) in je eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na angiogenezo. Vnetje in nastajanje novih žil v ateroskleriti ni lehi je povezano s pove ano koncentracijo VEGF, kar je le odgovor na prej prisotne dejavnike tveganja (22). Nastajanje novih žil v sredici ateroskleroti ne lehe pomeni njeno ve jo nestabilnost in s tem ve jo nagnjenost k razpoku in nastanku tromboti ne zapore in posledi nega akutnega sr no-žilnega dogodka. Zato ne presene a, da je njegova koncentracija zvišana pri preiskovancih po prebolelem miokardnem infarktu (23).

3.1.4. Genetski dejavniki, ki vplivajo na razvoj in napredovanje ateroskleroze

Genetski dejavniki predstavljajo spremembe v zaporedju nukleotidov na nivoju deoksiribonukleinske kisline (angl. deoxyribonucleic acids, DNA). Podedujemo jih od staršev in vodijo v spremembo proteina, ki ga kodira gen, v katerem se nahajajo, ali v spremembo izražanja dolo enega gena. Na razvoj in napredovanje ateroskleroze pomembno vplivajo številni genetski dejavniki. Še posebno to velja za prirojene hiperholesterolemije, kjer je zaradi genetskih sprememb v genih, povezanih z metabolizmom lipoproteinov, tveganje za aterosklerozo izjemno visoko (24). Tveganje za aterosklerozo pa zvišajo tudi genetske spremembe v genih, ki so vpleteni v oksidativni stres, vnetje in obnovo žilne stene.

Variabilnost gena *CRP* pomembno vpliva na nivo proteina CRP (25). Najpogosteje raziskovan polimorfizem gena *CRP* je rs1800947 (NC_000001.10:g.159683438C>G, znan kot G1059C). Pri tem pride do zamenjave v citozina (C) v gvanin (G) ki pa ne vpliva na spremembo aminokisline (NP_000558.2:p.Leu184=). Redkejši alel G je prisoten pri 6,5 % splošne evropske populacije (26) in je povezan z nižjimi vrednostmi CRP, torej deluje zaš itno pred boleznimi srca in ožilja (27).

Tudi spremembe v genih, ki kodirajo dejavnike, ki spodbujajo vnetje, vplivajo na nastanek teh dejavnikov in s tem na tveganje za aterosklerozo in bolezn srca in ožilja. Pogosto raziskovan je polimorfizem gena *TNFA* rs1800629 (NG_007462.1:g.4682G>A, znan kot -308G>A). Pri tem se zamenja G z adeninom (A) v promotorskem podro ju gena, kar vodi v ve je izražanje gena in s tem ve jo sintezo proteina TNF- (28). Redkejši alel A je prisoten pri 16,5 % evropske splošne populacije (26) in je povezan z ve jim tveganjem za razvoj bolezn srca in ožilja (29). Polimorfizem gena *IL6* rs1800795 (NG_011640.1:g.4880C>G, znan kot -174G>C) se nahaja v promotorskem podro ju gena *IL6* in vpliva na njegovo izražanje in s tem na višjo koncentracijo proteina IL6 (30). Pri tem je redkejši alel G prisoten pri 55,6 % evropske splošne populacije (26). Polimorfizem je povezan z zvišanim tveganjem za smrt zaradi bolezn srca in ožilja (31). Polimorfizem gena *VEGFA* rs2010963 (NG_008732.1:g.5398C>G, znan -634G>C) se nahaja v promotorskem podro ju gena *VEGFA* in vpliva na njegovo izražanje, kar vodi v nižjo koncentracijo proteina *VEGF*. Alel G je prisoten pri 70,9 % evropske splošne populacije (26) in je povezan z ve jim tveganjem za bolezn srca in ožilja (22).

3.1.5. Zdravljenje hiperholesterolemij

Statini sodijo med najpomembnejša zdravila, ki se uporabljajo za zdravljenje hiperholesterolemij. So pa tudi izjemno učinkovita zdravila za preprečevanje razvoja in posledic srčno-žilnih bolezni. Zdravljenje s statini namreč lahko zmanjša obolevnost in umrljivost zaradi srčno-žilnih bolezni ne glede na izhodiščno vrednost holesterola LDL pri posamezniku. Pri najbolj ogroženih bolnikih je absolutno zmanjšanje obolevnosti in umrljivosti zaradi srčno-žilnih bolezni od 20 do 50% (32). Zdravljenje s statini ne vpliva na koncentracijo Lp(a), oziroma pride celo do rahlega povečanja, ki pa ni klinično pomembno (33). Koncentracija Lp(a) je odvisna od genetskih dejavnikov (34), življenjski stil in prehrana nanjo ne vplivata. Na drugi strani pa zaviralci proprotein konvertaze subtilisin/keksin tipa 9 (angl. proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; PCSK9), ki pripadajo novejši generaciji zdravil za zdravljenje hiperholesterolemij, znižajo vrednosti holesterola LDL za dodatnih 40-60%, pa tudi vrednosti Lp(a) za 20 do 40% (35). Zato se uporabljajo za zdravljenje bolnikov s hiperholesterolemijo, ki so najbolj ogroženi, in tistih, pri katerih je zdravljenje s statini premalo učinkovito.

PCSK9 vpliva na privzem holesterola iz LDL delcev v tkiva, saj omogoča razgradnjo LDL receptorja v jetrnih celicah. Zaviralci PCSK9 tako omogočajo večjo regeneracijo LDL receptorjev in s tem povečajo privzem holesterola v jetrne celice in zmanjšanje koncentracije holesterola LDL v krvi. Ker je to novejšo zdravilo, natančen mehanizem, po katerem zaviralci PCSK9 zmanjšajo koncentracijo Lp(a), ni natančno poznan. Tudi raziskava, ki bi proučevala vpliv zaviralcev PCSK9 na vnetne parametre, je zelo malo. Edina takšna raziskava je proučevala vpliv monoklonskega protitelesa proti PCSK9 pri bolnikih po akutnem srčno-žilnem dogodku, ki so bili že zdravljeni z najvišjim odmerkom statina, ki so ga prenašali. Izkazalo se je, da je zdravljenje s protitelesom pomembno zmanjšalo tako koncentracijo holesterola LDL kot tudi Lp(a), ni pa imelo vpliva na vrednosti hsCRP, IL6 in TNF- α (36).

3.2. Namen dela, cilji in hipoteze

Ateroskleroza s svojimi kliničnimi posledicami je pogojena z vplivom številnih dejavnikov tveganja. Med najpomembnejšimi je povečana koncentracija holesterola LDL. Z zdravljenjem, predvsem statini, se pri bolnikih po prebolelem miokardnem infarktu močno zniža koncentracija holesterola LDL in s tem tudi obolevnost in umrljivost. Kljub temu pa je še vedno veliko bolnikov, ki ne dosegajo ciljnih vrednosti holesterola LDL. Do nedavno ni bilo na voljo zdravil, ki bi vplivala na koncentracijo Lp(a), ki je neodvisni dejavnik tveganja za bolezni srca in ožilne dogodke ne glede na koncentracijo holesterola LDL. Z razvojem zaviralcev PCSK9 pa so na voljo zdravila, ki vplivajo tako na koncentracijo holesterola LDL kot tudi Lp(a). Obstaja veliko dokazov, da holesterol LDL in Lp(a) preko vnetja vplivata na napredovanje ateroskleroze. Študij, ki bi preučevali vpliv zaviralcev PCSK9 na parametre vnetja je zelo malo, sploh pa ni znanih raziskav, ki bi preučevali vpliv genetskih dejavnikov na parametre vnetja. Zato smo se v tej raziskovalni nalogi osredotočili na preučevanje genetskih dejavnikov, ki vplivajo na parametre vnetja med zdravljenjem z zaviralci PCSK9 pri preiskovancih po prebolelem miokardnem infarktu in z močno zvišanimi vrednostmi Lp(a).

V nalogi smo tako želeli pri skrbno izbranih preiskovancih določiti porazdelitve genotipov izbranih polimorfizmov genov *CRP*, *TNFA*, *IL6* in *VEGFA*, ter opredeliti njihov pomen pri vplivu na prej omenjene parametre ob zdravljenju z zaviralci PCSK9.

Zastavili smo si naslednje specifične cilje:

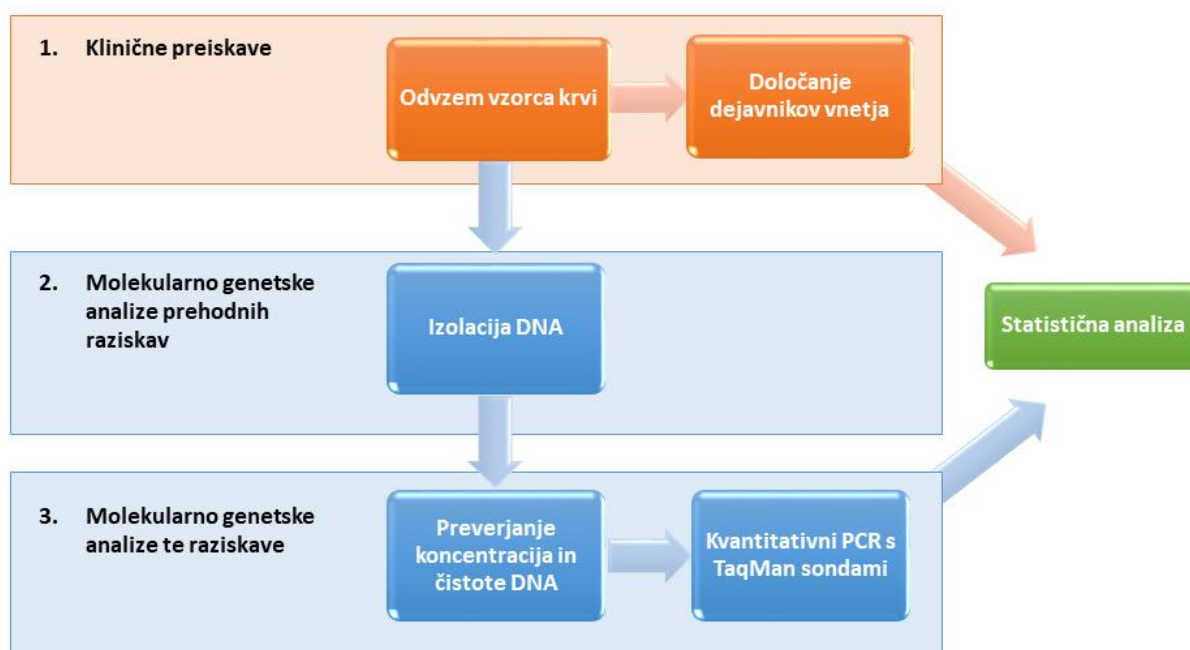
- S kvantitativnim PCR v vzorcih DNA določiti prisotnost polimorfizmov rs1800795 gena *IL6*, rs1800629 gena *TNFA*, rs1800947 gena *CRP* in rs2010963 gena *VEGFA*.
- Statistično ovrednotiti vpliv šestmesečnega zdravljenja z zaviralci PCSK9 na vrednosti vnetnih dejavnikov hsCRP, IL6 in TNF- α ter vrednosti lipidov pri preiskovancih.
- Statistično ovrednotiti vpliv genotipov posameznega polimorfizma na parametre vnetja pred začetkom zdravljenja in po šestih mesecih zdravljenja z zaviralci PCSK9.

Pri tem smo želeli preveriti naslednjo hipotezo:

Prisotnost sprememb v genih IL6, TNFA in CRP, ki kodirajo dejavnike vnetja IL-6, TNF- α in CRP, in v genu VEGFA, vpliva na dinamiko spreminjanja parametrov vnetja ob zdravljenju z zaviralci PCSK9.

4. Eksperimentalni del

Eksperimentalni del raziskovalne naloge je potekal kot del širše raziskave (37), ki jo vodi izr. prof. dr. Miran Šebeštjen. Tako so bili klinični del raziskave, ki je vseboval izbor preiskovancev, odvzem vzorcev krvi in analiza dejavnikov vnetja, ter izolacija DNA že predhodno opravljene (Slika 2). Eksperimentalno delo za to raziskovalno nalogo, ki je vsebovalo molekularno genetske analize in statistično analizo, sem izvedel v Laboratoriju za translacijsko medicinsko biokemijo, in sicer julija in avgusta 2021. V molekularno genetske metode, ki sem jih uporabljal, me je uvedla Inge Sotlar, mag. biokem., strokovna sodelavka v laboratoriju, ki je tudi nadzirala moje samostojno izvajanje eksperimentov. V statistične metode me je uvedla asist. Tina Levstek, mag. lab. biomed., mlada raziskovalka v tem laboratoriju, pri tem sva statistično analizo rezultatov izvedla skupaj. Potek raziskave je prikazan na Sliki 2.



Slika 2: Shema eksperimentalnega dela

4.1. Skupina preiskovancev

V raziskavo smo vključili preiskovance stare med 18 in 65 let, ki so imeli miokardni infarkt pred 50 letom starosti. Preiskovanci so imeli pred vključitvijo v raziskavo vsaj 6 mesecev po miokardnem infarktu stabilno zdravstveno stanje. Vključitveni kriterij za raziskavo je bil tudi, da so imeli preiskovanci vrednost Lp(a) večjo od 1000 mg/L ne glede na njihovo vrednost LDL holesterola, ali pa vrednost Lp(a) večjo od 600 mg/L in vrednost LDL holesterola večjo od 2,6 mmol/L. V raziskavo smo vključili samo preiskovance, ki so imeli nespremenjen in zdravljenja vsaj 8 tednov pred vključitvijo v preiskavo. Vsi preiskovanci so bili ustrezno obveščeni o raziskavi in so k sodelovanju privolili prostovoljno s podpisom obveščene pristanka. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (referenčna številka KME 0120-357/2018/8) in je bila izvedena v skladu s Helsinško deklaracijo.

4.2. Molekularno genetske metode

4.2.1. Merjenje koncentracije in čistote DNA

Princip metode

V vzorcih DNA, ki so bili izolirani v sklopu predhodnih raziskav, so zaradi postopka lahko prisotne nečistote. Zato smo vsakemu vzorcu DNA določili koncentracijo in onesnaženost s proteini. To smo izvedli z napravo NanoDrop One, proizvajalca KOBIS. Čistoto DNA smo določili ali z merjenjem absorbanco UV svetlobe pri dveh različnih valovnih dolžinah, 260 nm ter 280 nm. Pri valovni dolžini 260 nm baze v molekuli DNA najbolj absorbirajo UV svetlobo, zato je količina DNA v raztopini premo sorazmerna z absorbanco pri 260 nm. Proteini pa najbolje absorbirajo UV svetlobo pri 280 nm. Zato smo določili ali tudi razmerje absorbanco svetlobe obeh valovnih dolžin (A_{260}/A_{280}). Vzorci, ki so imeli razmerje A_{260}/A_{280} med 1,8 in 2,0, so bili primerni za nadaljnje analize, saj niso bili preveč onesnaženi s proteini. Pri vzorcih, ki pa so imeli razmerje A_{260}/A_{280} manjše od 1,8 je potrebno postopek izolacije DNA ponoviti, saj je v vzorcu prisotna prevelika količina proteinov, kar lahko moti nadaljnje molekularno genetske analize.

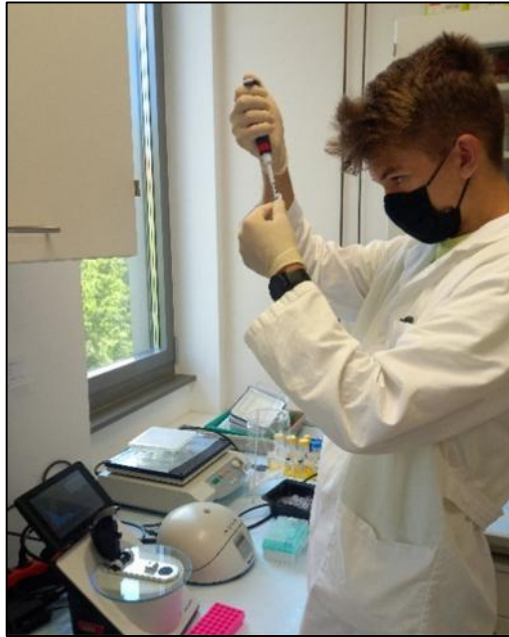
Reagenti, instrumenti in materiali

- vzorci DNA vseh preiskovancev, vključeni v raziskavo in destilirana voda,
- pipete, sterilni nastavki za pipete,
- naprava NanoDrop One, Thermo Scientific.

Postopek merjenja čistote DNA na napravi NanoDrop One

Merjenje čistote DNA smo izvajali po spodnjem postopku in sicer na napravi NanoDrop One proizvajalca KOBIS, kot je prikazano na Sliki 3.

- Napravo NanoDrop One pred uporabo očistimo tako, da na šobo odpipetiramo 1 μ L deionizirane vode, nato merilno mesto obrišemo s papirnato brisačko.
- Na šobo še enkrat odpipetiramo 1 μ L deionizirane vode, NanoDrop One zapremo in na zaslonu označimo slepo meritve.
- Na šobo odpipetiramo 1 μ L vodne raztopine vzorca DNA, NanoDrop One zapremo in izmerimo razmerje absorbanco pri 260 nm in pri 280 nm.
- Po končani meritvi NanoDrop One odpremo, pobrišemo šobo in enako ponovimo z ostalimi vzorci.
- Zaradi sprotnega beleženja in preglednosti rezultatov, po vsaki meritvi poimenujemo vzorec na ekranu NanoDrop One.



Slika 3: Merjenje istote DNA na napravi NanoDrop One (Kobis) (avtorica fotografije I. Sotlar).

4.2.2. Red enje vzorcev DNA

Princip metode

Za nadaljnjo genetsko analizo je bilo pomembno, da imajo vsi vzorci DNA enako koncentracijo. Zato smo vzorce DNA vseh preiskovancev razredili s sterilno destilirano vodo do koncentracije $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Na red enja smo izračunali glede na koncentracijo DNA posameznega vzorca, ki smo jo izmerili z aparatom NanoDrop One.

Reagenti in materiali

- Vzorci DNA vseh preiskovancev in sterilna destilirana voda.
- Pipete, sterilni nastavki za pipete, plošča PCR s 96 jamicami.

Postopek red enja vzorcev DNA

- Pripravili smo shemo pipetiranja vzorcev v mikrotitrsko ploščo, kjer je imel vsak vzorec določeno mesto na mikrotitrski plošči.
- Vzorce smo razredili na delovno koncentracijo $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ in do končne volumna $100 \mu\text{L}$. Volumen vzorca in vode za red enje smo izračunali po Ena bi 1. V mikrotitrsko ploščo smo najprej s pipeto dodali izračunani volumen vode in nato še izračunani volumen posameznega vzorca DNA. Mešanico smo nežno premešali na vibracijskem mešalniku.

- Red ene vzorce smo shranili na temperaturi -20 °C.

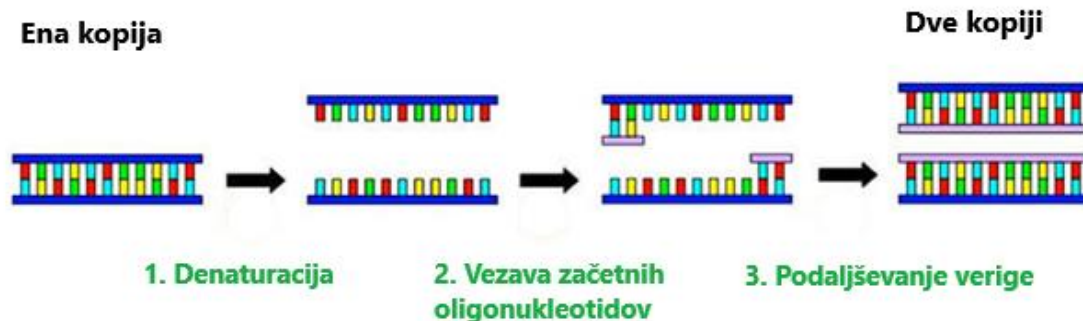
$$V_{\text{vzorcaDNA}} = 100 / ((C_{\text{vzorcaDNA}}/10)-1)$$

Ena ba 1: Izra un volumna vzorca DNA v μL za red enje DNA na koncentracijo 10 ng/ μL .

4.2.3. Reakcija s polimerazo v realnem asu

Princip metode

Za dolo anje genotipa preiskovancev smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo v realnem asu (qPCR). Temelji na verižni reakciji s polimerazo (PCR), ki je prikazana na Sliki 4.



Slika 4: Postopek verižne reakcije s polimerazo (PCR); prirejeno po (38).

Reakcija PCR je sestavljena iz treh osnovnih korakov:

Korak 1: Denaturacija DNA

Pri temperaturi 95 °C molekula DNA denaturira, torej dvojna vija nica DNA razpade na dve enojni vija nici

Korak 2: Vezava za etnih oligonukleotidov

Vezava za etnih oligonukleotidov na komplementarno zaporedje na verigi DNA pote e pri temperaturi med 40 in 60 °C in je odvisna od sestave posameznega oligonukleotida.

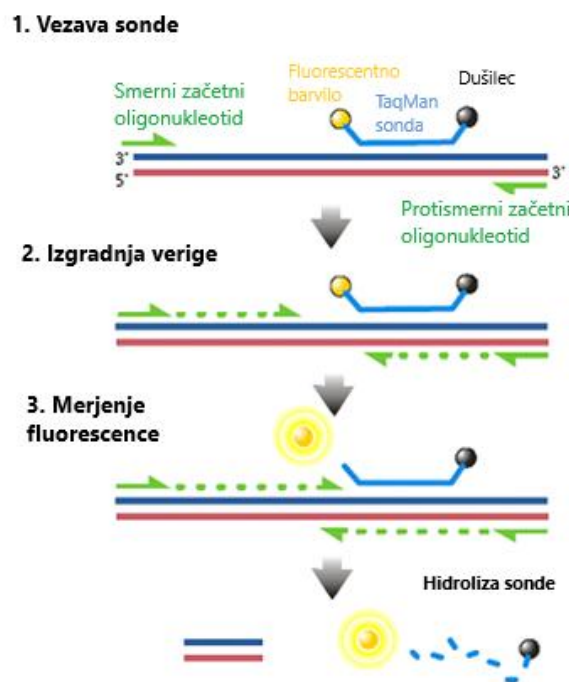
Korak 3: Podaljševanje verige

V tej fazi dvignemo temperaturo na 72 °C, kar omogo i vezavo encima DNA polimeraze in posledi no izgradnjo komplementarne verige v smeri 5 proti 3 .

Odsek DNA, ki nastane v prvem ciklu, v naslednjem ciklu služi kot osnova za izgradnjo novih verig DNA. Tako se koncentracija DNA eksponentno ve a, po navadi pote e 35 do 45 ciklov. Po opravljenih vseh ciklih pote e še zaklju no pomnoževanje in sledi ocena koncentracije in dolžine produkta PCR reakcije. Prav tu se pojavi razlika med osnovnim PCR in kvantitativnim PCR (qPCR), saj je pri osnovnem PCR to mogo e le ob koncu celotnega postopka, pri qPCR

pa merjenje poteka po vsakem ciklu in je kontinuirno. To pomeni, da lahko ocenimo, kako se je količina produkta qPCR reakcije spreminjala skozi celoten postopek.

Genotipizacijo posameznega polimorfizma smo pri preiskovancih izvedli z genotipizacijskimi sondami TaqMan proizvajalca Thermo Fisher Scientific (38), ki na enostaven in hiter način omogočajo določitev prisotnosti izbrane genetske spremembe (genotipizacijo) in to z visoko zanesljivostjo. Pri postopku se uporabi hidrolizirajoča sonda, to je enoverižno, kratko zaporedje oligonukleotidov, ki ima na 5' koncu kovalentno vezano fluorescentno reportersko barvilo, na 3' koncu pa dušilec (Slika 5). Sonda, ki je komplementarna alelu 1, ima vezano fluorescentno barvilo VIC, sonda, ki je komplementarna alelu 2, pa barvilo FAM, kar omogoča njuno ločevanje. Vsako barvilo se preko fluorescentne svetlobe določene valovne dolžine zazna le ob prisotnosti vnaprej določenega alela.



Slika 5: Genotipizacija s TaqMan sondami; povzeto in prirejeno po (38).

V primeru, da DNA preiskovanca vsebuje alel, ki je komplementaren sondi z določenim barvilom, se sonda hidrolizira, barvilo in dušilec se ločita in signal v obliki fluorescence lahko aparaturna nemoteno zazna in zabeleži. Jakost signala se premo sorazmerno povečuje s količino DNA, ki se dvakrat poveča v vsakem ciklu. Več kot je enojnih verig DNA, več sond je lahko na njih nameščenih, in več fluorescentne svetlobe se odda.

V primeru, da preiskovanec nima alela, ki je komplementaren sondi z določenim barvilom, se sonda ne hidrolizira. Tako sondo imenujemo intaktna sonda. Fluorescentno barvilo pa se v obliki energije resonančno prenese na dušilec, ki barvilo absorbira in onemogoči oddajanje fluorescentne svetlobe. Aparatura signala tako ne zazna.

Reagenti, instrumenti in materiali

- Uporabili smo predpripravljeno mešanico reagentov Universal MasterMix proizvajalca Thermo Fisher Scientific, DNA vseh preiskovancev s koncentracijo 10 ng/μL, komercialno dostopne komplete sond in za etnih nukleotidov za določanje izbranega polimorfizma (Thermo Fisher Scientific) in sterilno destilirano vodo (dH₂O).
- Instrument QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System, računalnik s programsko opremo QuantStudio™ Real-Time PCR Software v2.6 (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific).
- Pipete, večkanalna pipeta, avtomatska pipeta, sterilni nastavki za pipete, centrifugirka (15 mL), plošča PCR s 96 jamicami, prozorna folija, vibracijski mešalnik, protiutež, centrifuga, aluminijasta folija.

Postopek analize polimorfizmov s qPCR z uporabo TaqMan sond

V vzorcu DNA vsakega preiskovanca smo s specifičnimi TaqMan sondami preverili prisotnost štirih različnih polimorfizmov: polimorfizma rs1800795 v genu *IL6*, polimorfizma rs1800629 v genu *TNFA*, polimorfizma rs1800947 v genu *CRP* in polimorfizma rs2010963 v genu *VEGFA* (Tabela 1). Vsak polimorfizem smo analizirali pri posameznem preiskovancu po istem postopku. Pomnoževanje in detekcijo smo izvajali na napravi QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). 15% naključju njih vzorcev smo analizirali dvakrat, da smo preverili zanesljivost genotipizacije.

Tabela 1: Kompleti sond in za etnih oligonukleotidov za določanje polimorfizmov rs1800795, rs1800629, rs1800947, rs2010963 proizvajalca Thermo Fisher Scientific

Gen	rs številka	Normalni > polimorfni alel	VIC / FAM	Komplet sond in za etnih oligonukleotidov
<i>IL6</i>	rs1800795	C>G	C/G	C_1839697_20
<i>TNFA</i>	rs1800629	A>G	G/A	C_7514879_10
<i>CRP</i>	rs1800947	C>G	C/G	C_177490_10
<i>VEGFA</i>	rs2010963	G>C	G/C	C_8311614_10

hsCRP- C-reaktivni protein visoke občutljivosti (angl. High sensitive C-reactive protein); TNF- α - dejavnik tumorske nekroze; IL6- interleukin 6; C-citozin; G-gvanin; A-adenin

Postopek dela:

a) Priprava mešanice

Priprava je potekala v komori za pipetiranje, ki smo jo pred uporabo razkužili s 70% etanolom (Slika 6). Med delom smo skrbeli, da ni prišlo do kontaminacije mešanice, kar bi vodilo v napačne rezultate. Reakcijsko zmes smo morali pripraviti za 69 preiskovalcev, 1 negativno kontrolo in rezervo (kar je skupaj predstavljajo 85 vzorcev) in sicer v 15 mL centrifugirki. Sestava reakcijske mešanice je zavedena v Tabeli 2. Mešanico smo nežno premešali na vibracijskem mešalniku.



Slika 6: Pipetiranje predhodno pripravljene reakcijske zmesi na reagen ni nosilec v komori za pipetiranje (avtorica fotografije I. Sotlar).

Tabela 2: Kon na reakcijska zmes.

	En vzorec (μL)	85 vzorcev (μL)
Universal MasterMix (2x)	5	425
DNA (10 ng/ μL)	3	255
Komplet sond in za etnih oligonukleotidov za dolo anje posameznega polimorfizma (40x)	0,25	21,25
dH ₂ O	1,75	148,75
Skupaj	10	850

Opomba: DNA vsakega preiskovanca smo dodali kasneje.

b) Priprava reagen nega nosilca

Reakcijsko zmes brez DNA smo odpipetirali v reagen ni nosilec s 96 jamicami. Na vsako mesto kjer so bili na rtovani vzorci, smo odpipetirali 7,5 μL predhodno pripravljene reakcijske zmesi, nato pa smo v vsako jamico dodali po 2,5 μL DNA enega, to no dolo enega preiskovanca. Pri tem smo uporabljali ve kanalno pipeto, saj je bilo pipetiranje tako hitrejše. Dodatno mesto nam je služilo kot negativna kontrola, zato smo najprej vanjo odpipetirali 7,5 μL reakcijske zmesi, nato pa smo namesto vzorca DNA dodali 2,5 μL dH₂O. V tej jamici ni smelo priti do pomnoževanja, saj DNA ni bila prisotna. S tem smo preverili ali je med postopkom morda prišlo do kontaminacije reakcijske mešanice.

Reakcijski nosilec smo nato pokrili s prozorno folijo, zmes nežno premešali z vibracijskim mešalnikom in nato še kratko centrifugirali (Slika 7), da na pokrov ku in stenah jamnic ni bilo kapljic. Paziti smo morali, da je bila reakcijska zmes im manj izpostavljena son ni svetlobi, saj se ob preveliki izpostavljenosti son ni svetlobi fluorescenca bavila manjša in bi to

posledi no vplivalo na rezultate. To smo prepre ili tako, da smo reakcijski pladenj med prenašanjem od komore za sterilno delo do qPCR zavili v aluminijasto folijo.



Slika 7: Centrifugiranje reagen nega nosilca (avtorica fotografije I. Sotlar).

c) qPCR

qPCR pomnoževanje v instrumentu QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Slika 8) smo izvedli po protokolu za analizo z TaqMan sondami (Tabela 3), ki smo ga predhodno pripravili z računalniškim programom QuantStudio™ Real-Time PCR Software v2.6.



Slika 8: Delo na napravi QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System. Prikazano je vstavljanje reagen nega nosilca v aparat (avtorica fotografije I. Sotlar).

Tabela 3: Postopek pomnoževanja z TaqMan sondami.

Stopnja	Temperatura [°C]	Trajanje
Pred-PCR	60	1 minuta
Aktivacija encima DNA polimeraze	95	10 minut
45 ciklov pomnoževanja		
Denaturacija	95	15 sekund
Skupen korak naleganja za etnih oligonukleotidov in podaljševanja verige	60	1 minuta
Kon ni zajem podatkov (Post-PCR)	60	1 minuta

4.3. Statisti na analiza

Odstopanje spremenljivk od normalne porazdelitve, katero predstavlja Gausova krivulja, smo dolo ili s Shapiro-Wilkovim testom normalnosti.

Spremenljivke smo najprej opisali z opisno statistiko. Za opis kategori nih spremenljivk (npr.: spol) smo uporabili število in relativno frekvenco, za opis zveznih spremenljivk (npr.: starost, laboratorijski parametri) pa mediano in interkvartilni razpon (25 % - 75 %), za tiste, ki se razporejajo nenormalno, tiste, ki pa se razporejajo normalno pa smo jih predstavili kot srednja vrednost plus/minus standardna derivacija.

Ni elna hipoteza tega testa pravi, da se spremenljivka v populaciji ne porazdeljuje normalno, e je izra unana p vrednost manjša od vnaprej izbrane alfa vrednosti (obi ajno 0,05). V tem primeru ni elno hipotezo ovržemo. e pa je izra unana P vrednost ve ja od vnaprej izbrane alfa vrednosti, ni elne hipoteze ne moremo zavrniti in sklepamo, da se spremenljivka porazdeljuje normalno.

Za vsak polimorfizem smo s χ^2 testom preverili, e je v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem (HW). e so genotipi v ravnotežju, je vrednost P ve kot 0,05. e pa genotipi niso v HW ravnotežju, je vrednost p manj kot 0,05.

Za analizo podatkov, ki so med seboj odvisni (npr.: dve razli ni meritvi Lp(a) pri istem preiskovancu), smo uporabili Wilcoxonov test predzna nih rangov.

Za ugotavljanje vpliva genotipa na posamezne laboratorijske parametre smo uporabili Mann-Whitneyev U test za neodvisne vzorce za primerjavo dveh skupin in Kruskal-Wallisov test za neodvisne vzorce za primerjavo treh skupin. Pri vseh izvedenih testih smo za mejo statisti ne zna ilnosti uporabili vrednost alfa 0,05. Za ugotavljanje vpliva genotipa na posamezne laboratorijske parametre smo uporabili Mann-Whitneyev U test za neodvisne vzorce, s katerim smo primerjali dve skupini, in Kruskal-Wallisov test za neodvisne vzorce, s katerim smo primerjali tri skupine.

Statisti na analiza je bila s pomo jo asist. Tine Levstek opravljena z ra unalniškim programom IBM SPSS Statistics, verzija 27 (IBM Corporation, New York, ZDA).

5. Rezultati

5.1. Klinični in laboratorijski rezultati

V raziskavo je bilo vključenih 69 preiskovancev s klinično stabilno boleznijo srca in ožilja, ki so že imeli v preteklosti miokardni infarkt, hkrati pa so imeli možno zvišane vrednosti Lp(a). Značilnosti celotne skupine preiskovancev ob vključitvi v raziskavo so predstavljene v Tabeli 4. Večina, 61 (88,4 %) preiskovancev, je bila moškega spola, povprečna starost ob prvem miokardnem infarktu je bila 45 let. Vsi preiskovanci so imeli dobro urejen krvni pritisk. Mediana vrednosti Lp(a) je bila 1483 mg/L.

Tabela 4: Značilnosti celotne skupine preiskovancev ob vključitvi v raziskavo (N = 69).

Parameter	Mediana (25–75 %)
Starost ob vključitvi v raziskavo (leta)	52.6 (45.8–56.9)
Starost ob prvem miokardnem infarktu (leta)	45.1 (38,5-51,7)
Indeks telesne teže (kg/m ²)	28,6 ± 3,9
Sistolični krvni tlak (mm Hg)	128 (120–135)
Diastolični krvni tlak (mm Hg)	78 (70–82)
Celokupni holesterol (mmol/L)	4,24 ± 0,82
HDL holesterol (mmol/L)	1,20 ± 0,28
LDL holesterol (mmol/L)	2.27 (1.69–2.66)
Triacilgliceroli (mmol/L)	1.43 (1.01–2.12)
Lipoprotein (a) (mg/L)	1483 (1171-1780)
hsCRP (mg/L)	0.87 (0.41–2.31)
TNF- α (ng/L)	3.91 (3.13–5.14)
IL6 (ng/L)	1.69(1.20–2.18)

Vrednosti, ki se razporejajo normalno, so prikazane kot povprečna vrednost (plus/minus standardna deviacija), vrednosti, ki se razporejajo nenormalno, pa so prikazane kot mediana (spodnja-zgornja kvartila).

hs-CRP, C-reaktivni protein visoke občutljivosti (angl. High sensitive C-reactive protein); TNF- α , dejavnik tumorske nekroze; IL6, interlevkin 6; HDL, lipoproteini visoke gostote (angl. high density lipoprotein); LDL, lipoproteini nizke gostote (angl. low density lipoprotein).

5.2. Molekularno genetski rezultati

5.2.1. Razporeditev alelov in genotipov

Z alelno diskriminacijo smo za posamezen polimorfizem določili genotip preiskovancev. Pri posameznem polimorfizmu so bili možni trije genotipi, homozigotno stanje za prvi alel, homozigotno stanje za drugi alel in heterozigotno stanje. Razporeditve genotipov pri celotni skupini preiskovancev so prikazani na sliki 9. Pri vseh 9 kvadratih v levem spodnjem kotu predstavlja negativno kontrolo. Tam DNA ni bila dodana, zato ni bilo pomnoževanja in signala nismo zaznali.

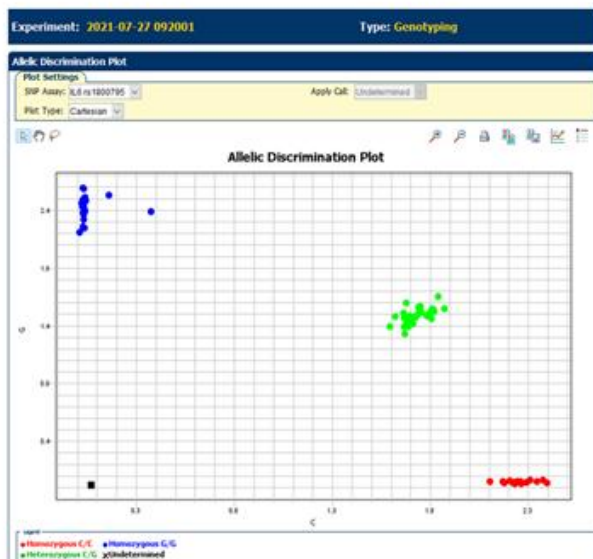
Preiskovanci, ki imajo na obeh alelih polimorfizma rs1800795 gena *IL6* prisoten alel C, so na Sliki 9 a obarvani z rdečo barvo. V naši raziskavi je takih preiskovancev 16 (23,2 %) in imajo tako genotip CC. Preiskovanci, ki imajo na enem alelu C in na drugem G, so obarvani z zeleno barvo. Takih preiskovancev je v naši raziskavi 34 (49,3 %) in imajo tako genotip CG. Preiskovanci, ki imajo na obeh alelih G so prikazani z modro barvo. Takih preiskovancev je v naši raziskavi 19 (27,5 %) in imajo torej genotip GG.

Preiskovanci, ki imajo na obeh alelih polimorfizma rs1800629 gena *TNFA* prisoten alel A, so na Sliki 9 b obarvani z rdečo barvo. V naši raziskavi je tak le en preiskovanec (1,4 %) in ima tako genotip AA. Preiskovanci, ki imajo na enem alelu G in na drugem A, so obarvani z zeleno barvo. Takih preiskovancev je v naši raziskavi 10 (14,5 %) in imajo tako genotip GA. Preiskovanci, ki imajo na obeh alelih G so prikazani z modro barvo. Takih preiskovancev je v naši raziskavi 58 (84,1 %) in imajo torej genotip GG.

Preiskovanci, ki imajo na obeh alelih polimorfizma rs1800947 gena *CRP* prisoten alel G, so na Sliki 9 c obarvani z modro barvo. V naši raziskavi je tak le en preiskovanec (1,4%) in ima tako genotip GG. Preiskovanci, ki imajo na enem alelu G in na drugem C, so obarvani z zeleno barvo. Takih preiskovancev je v naši raziskavi 10 (14,5%) in imajo tako genotip CG. Preiskovanci, ki imajo na obeh alelih C so označeni z rdečo barvo. Takih preiskovancev je v naši raziskavi 58 (84,1 %) in imajo torej genotip CC.

Preiskovanci, ki imajo na obeh alelih polimorfizma rs2010963 gena *VEGFA* prisoten alel G, so na Sliki 9 d obarvani z modro barvo. V naši raziskavi je takih 30 (43,5 %) preiskovancev in imajo tako genotip GG. Preiskovanci, ki imajo na enem alelu G in na drugem C, so obarvani z zeleno barvo. Takih preiskovancev je v naši raziskavi 32 (46,4 %) in imajo tako genotip CG. Preiskovanci, ki imajo na obeh alelih C so označeni z rdečo barvo. Takih preiskovancev je v naši raziskavi 7 (10,1%) in imajo torej genotip CC.

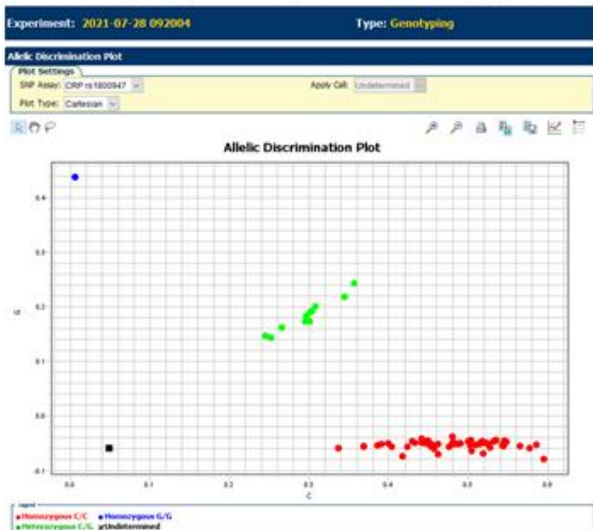
a) rs1800795 (NG_011640.1:g.4880C>G) gena *IL6*



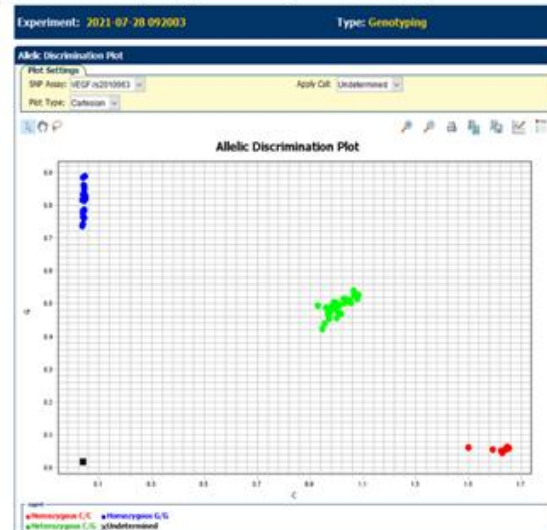
b) rs1800629 (NG_007462.1:g.4682G>A) gena *TNFA*



c) rs1800947 (NC_000001.10:g.159683438C>G) gena *CRP*



d) rs2010963 (NG_008732.1:g.5398C>G) gena *VEGFA*



Slika 9: Razporeditev genotipov pri celotni skupini preiskovancev za polimorfizme a) rs1800795 gena *IL6*, b) rs1800629 gena *TNFA*, c) rs1800947 gena *CRP* in d) rs2010963 gena *VEGFA*. Pogled iz *QuantStudio™ Real-Time PCR Software v2.6*.

5.3. Rezultati statistične analize

5.3.1. Hardy-Weinbergovo ravnotežje

Za vsak polimorfizem smo preverili, če je v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem (HW). Rezultati so prikazani v Tabeli 5. V zadnjem stolpcu je zabeležena pogostost manj zastopanega alela (PMA) analiziranih polimorfizmov. Porazdelitev genotipov vseh analiziranih polimorfizmov in njihove PMA v analizirani skupini preiskovancev so v skladu z Hardy-Weinbergovim ravnotežjem, saj so vse vrednosti p veje kot 0,05. Posledično so podatki primerni za nadaljnjo analizo. Pri tem so vrednosti redkejšega alela po podatkih baze GnomAD za evropsko splošno populacijo 0.065 za *CRP* rs1800947, 0.557 za *IL6* rs1800795, 0.165 za *TNFA* rs1800629 in 0,709 za *VEGFA* rs2010963.

Tabela 5: Genotipi in izraženost Hardy-Weinbergovega ravnotežja (p_{HW} : vrednost p Hardy-Weinbergovega ravnotežja).

Polimorfizem	Genotip	Zastopnost (%)	p_{HW}	PMA
<i>CRP</i> rs1800947	CC	58 (84.1)	1.000	0.087
	CG	10 (14.5)		
	GG	1 (1.4)		
<i>IL6</i> rs1800795	CC	16 (23.2)	0.988	0.478
	GC	34 (49.3)		
	GG	19 (27.5)		
<i>TNFA</i> rs1800629	GG	58 (84.1)	1.000	0.087
	GA	10 (14.5)		
	AA	1 (1.4)		
<i>VEGFA</i> rs2010963	GG	30 (43.5)	0.985	0.333
	GC	32 (46.4)		
	CC	7 (10.1)		

hsCRP- C-reaktivni protein visoke občutljivosti (angl. High sensitive C-reactive protein); TNF- α , dejavnik tumorske nekroze; IL6, interleukin 6; A, adenin; C, citozin; G, gvanin.

5.3.2. Vpliv zdravljenja z zaviralci PCSK9 na vrednosti vnetnih parametrov in lipidov

V Tabeli 6 je predstavljena primerjava izmerjenih parametrov v krvi v celotni skupini preiskovancev in sicer pred začetkom zdravljenja z zaviralci PCSK9, te vrednosti so označene z oznako *pred*, in po 6 mesecih zdravljenja z zaviralci PCSK9, te vrednosti so označene z oznako *po*.

Tabela 6: Primerjava izmerjenih parametrov v celotni skupini preiskovancev in sicer pred zdravljenju z zaviralci PCSK9 in 6 mesecev po za etku zdravljenja.

Parameter	Zdravljenje	Vrednosti	Vrednost p
Sistoli ni krvni tlak (mm Hg)	pred	128 (118–140)	0,974
	po	128 (120–136)	
Diastoli ni krvni tlak (mm Hg)	pred	78 (70–80)	0,105
	po	80 (72–82)	
Celokupni holesterol (mmol/L)	pred	4,23 ± 0,88	< 0,001
	po	2,74 ± 0,95	
HDL (mmol/L)	pred	1,16 ± 0,25	0,001
	po	1,27 ± 0,32	
LDL (mmol/L)	pred	2,35 (1,73–2,65)	< 0,001
	po	0,63 (0,38–1,11)	
Triacilgliceroli (mmol/L)	pred	1,46 (1,06–2,09)	< 0,001
	po	1,20 (0,78–1,81)	
Lp(a) (mg/L)	pred	1437,5 (1205,0–1785,5)	< 0,001
	po	1111,0 (815,3–1544,8)	
ApoB (g/L)	pred	0,83 ± 0,2127	< 0,001
	po	0,46 ± 0,21	
ApoA1 (g/L)	pred	1,30 (1,20–1,47)	0,001
	po	1,35 (1,22–1,56)	
hsCRP (mg/L)	pred	0,85 (0,36–1,81)	0,989
	po	0,79 (0,31–1,57)	
TNF- (ng/L)	pred	3,91 (3,36–5,36)	0,402
	po	3,30 (2,53–6,04)	
IL6 (ng/L)	pred	1,69 (1,20–2,53)	0,066
	po	1,36 (1,16–2,18)	

Vrednosti ki se razporejajo normalno so prikazane kot povpre na vrednost (plus/minus standardna deviacija), vrednosti, ki se razporejajo nenormalno pa so prikazane kot mediana (spodnja-zgornja kvartila).

HDL, lipoproteini visoke gostote (angl. high density lipoprotein); LDL, lipoproteini nizke gostote (angl. low density lipoprotein); Lp(a), alipoprotein mali a; ApoB, apolipoprotein B; ApoA1, apolipoprotein A1; hsCRP, C-reaktivni protein visoke občutljivosti (angl. High sensitive C-reactive protein); TNF- α , dejavnik tumorske nekroze; IL6, interleukin 6.

Glede na rezultate iz Tabele 6 lahko ugotovimo, da so zaviralci PCSK9 vplivali na vrednost celokupnega holesterola, LDL, HDL, Lp(a), triacilglicerolov in ApoB. Vrednosti p vseh teh parametrov je namreč manjša od 0,05, kar pomeni, da je razlika v povprečnih vrednostih parametrov pred in po zdravljenju z zaviralci PCSK9 statistično značilna. Vrednosti p ostalih parametrov, vključno z vsemi vnetnimi parametri, so vse večje od 0,05, zato vpliv zaviralcev PCSK9 na te parametre ni statistično značilen.

V Tabeli 7 je prikazana povezava prisotnosti genotipov analiziranih polimorfizmov treh genov z vrednostmi vnetnih dejavnikov hsCRP, IL6 in TNF- α , ki jih ti geni kodirajo, ob vstopu preiskovancev v raziskavo, ko še niso bili zdravljeni z zaviralci PCSK9. Pri statistični analizi polimorfizmov smo uporabili aditivni model, saj je bil pri dveh polimorfizmih v vsaj eni skupini genotipov prisoten le po en preiskovanec. Statistično pomembne povezave pri tem nismo dokazali, saj je vrednost p v vseh primerih večja od 0,05.

Tabela 7: Povezave med genotipi analiziranih polimorfizmov in vrednosti vnetnih parametrov preiskovancev ob vstopu v raziskavo.

Polimorfizem	Vnetni parameter	Genotip	Mediana (25–75%)	Vrednosti p
CRP rs1800947	hsCRP	CC	0,93 (0,41–2,10)	0,664
		CG+GG	0,81 (0,40–2,38)	
IL6 rs1800795	IL6	CC	1,69 (1,20–2,07)	0,888
		CG+GG	1,69 (1,18–2,36)	
TNFA rs1800629	TNF-	GG	3,91 (3,05–5,14)	0,555
		GA+AA	3,83 (3,28–35,27)	

hsCRP- C, reaktivni protein visoke občutljivosti (angl. High sensitive C-reactive protein); TNF- α , dejavnik tumorske nekroze; IL6, interleukin 6; A, adenin; C, citozin; G, gvanin.

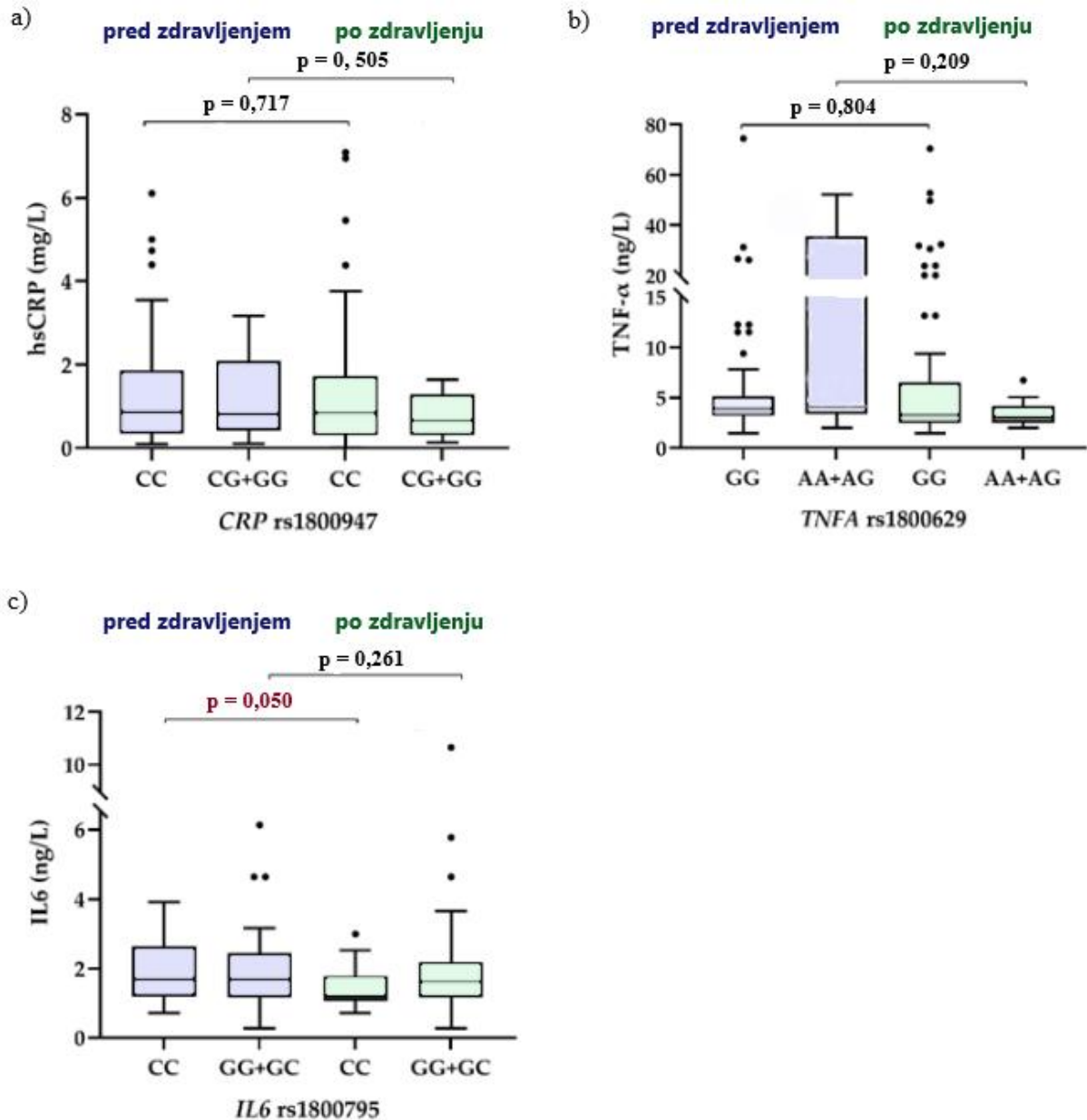
V Tabeli 8 je prikazana povezava prisotnosti genotipov analiziranih polimorfizmov z vrednostmi vnetnih dejavnikov hsCRP, IL6 in TNF- α po šestih mesecih zdravljenja z zaviralci PCSK9. Tudi tu smo pri statistični analizi polimorfizmov uporabili aditivni model. Statistično pomembne povezave pri tem nismo dokazali, saj je vrednost p v vseh primerih večja od 0,05.

Tabela 8: Povezave med genotipi analiziranih polimorfizmov in vrednosti vnetnih parametrov preiskovancev po šestih mesecih zdravljenja z zaviralci PCSK9.

Polimorfizem	Vnetni parameter	Genotip	Mediana (25–75%)	Vrednosti p
CRP rs1800947	hsCRP	CC	0,84 (0,31–1,69)	0,318
		CG+GG	0,67 (0,32–1,29)	
IL6 rs1800795	IL6	CC	1,20 (1,08–1,79)	0,418
		CG+GG	1,62 (1,16–2,18)	
TNFA rs1800629	TNF-	GG	3,33 (2,53–6,61)	0,493
		GA+AA	3,05 (2,53–4,19)	

hsCRP- C, reaktivni protein visoke občutljivosti (angl. High sensitive C-reactive protein); TNF- α , dejavnik tumorske nekroze; IL6, interleukin 6; A, adenin; C, citozin; G, gvanin.

Analizirali smo tudi povezavo med vrednostjo dejavnikov vnetja pred in po šestih mesecih zdravljenja z zaviralci PCSK9 in sicer glede na genotipe analiziranih polimorfizmov. Rezultati so prikazani na Sliki 10. Statistično pomembne povezave pri hsCRP in TNF- α nismo dokazali. Pri IL6 pa so imeli preiskovanci z genotipom CC polimorfizma rs1800795 po 6 mesecih zdravljenja statistično značilno nižje vrednosti IL6 v primerjavi s preiskovanci z genotipom CG in GG ($p = 0.050$) (Slika 10 c).



Slika 10: Povezava genotipov polimorfizmov a) rs1800947 gena CRP, b) rs1800629 gena TNFA in c) rs1800795 gena IL6 s koncentracijami vnetnih dejavnikov pred in po zdravljenju z zaviralci PCSK9.

Analizirali smo tudi povezavo med prisotnostjo genotipov polimorfizma *VEGFA* rs2010963 in spremembo v koncentraciji vnetnih parametrov po šestih mesecih zdravljenja z zaviralci PCSK9. Rezultati so prikazani v Tabeli 9. Statistično pomembne povezave pri tem nismo dokazali, saj je vrednost *p* v vseh primerih večja od 0,05.

Tabela 9: Povezave med genotipi analiziranih polimorfizmov VEGFA rs2010963 in spremembo v koncentraciji vnetnih parametrov pri preiskovancih po šestih mesecih zdravljenja z zaviralci PCSK9.

Polimorfizem	Genotip	Vnetni parameter	Mediana (25–75%)	p vrednost
<i>VEGFA</i> rs2010963	GG	hsCRP	0,87 (0,37-1,89)	0,734
	GC		0,84 (0,47-2,46)	
	CC		1,30 (0,87- 5,20)	
	GG	IL6	3,91 (3,09-5,36)	0,428
	GC		3,91 (3,13-5,11)	
	CC		3,36 (3,05-5,74)	
	GG	TNF-	1,69 (1,16-2,18)	0,437
	GC		1,88 (1,20-2,63)	
	CC		2,07 (1,16-2,67)	

hsCRP- C, reaktivni protein visoke občutljivosti (angl. High sensitive C-reactive protein); TNF- , dejavnik tumorske nekroze ; IL6, interleukin 6; A, adenin; C, citozin; G, gvanin.

6. Razprava

Naša raziskava je prva, ki je pri bolnikih po prebolelem miokardnem infarktu in z zvišanimi vrednostmi Lp(a) preu evala povezavo med prisotnostjo polimorfizmov v genih *CRP*, *TNFA*, *IL6* in *VEGFA* ter spreminjanjem dejavnikov vnetja hsCRP, TNF- in IL6 med zdravljenja z zaviralci PCSK9. V raziskavo smo vklju ili bolnike po prebolelem miokardnem infarktu, ki so bili zdravljeni po trenutno veljavnih smernicah vklju no s statini v najvišjem odmerku. Ob tem so imeli bolniki tudi zelo pove ane vrednosti Lp(a).

Iz Tabele 6 je razvidno, da so se preiskovancem po 6 mesecih zdravljenja s zaviralci PCSK9 statisti no zna ilno spremenile vrednosti, celokupnega holesterola, LDL, HDL, Lp(a), triacilglicerolov in ApoB. Takšen rezultat je pri akovan in je v skladu z znanimi dejstvi, da so zaviralci PCSK9 izredno u inkovita zdravila za zniževane krvnega holesterola in tudi Lp(a) (35). V že izvedeni raziskavi, ki je vklju evala 239 bolnikov po prebolelem miokardnem infarktu ali z zelo visokim tveganje za akutni sr no-žilni dogodek, so imeli bolniki ob vklju itvi nižje vrednosti holesterola LDL in tudi Lp(a) (36), povpre no znižanje obeh pa je bilo primerljivo z rezultati v naši skupini preiskovancev. Tako tudi naša raziskava nakazuje na to, da so zaviralci PCSK9 u inkovita zdravila ne glede na izhodiš ne vrednosti LDL ali Lp(a). V obeh raziskavah so bili bolniki zdravljeni s statini, zaviralci angiotenzina in acetilsalicilno kislino, ki vsi znižujejo tudi parametre vnetja, ki smo jih prou evali v naši raziskavi.

Rezultati naše raziskave tudi kažejo, da po šestih mesecih zdravljenja z zaviralci PCSK9 pri bolnikih po miokardnem infarktu in z visokimi vrednostmi Lp(a) ni bilo sprememb v parametrih vnetja hsCRP, TNF- , IL6 (Tabela 6). Zaviralci PCSK9 sicer znano vplivajo na vnetno dogajanje (35). Vplivali naj bi na vnetje, ki ga uravnava IL6 (39), pri tem pa naj ne bi vplivali na vrednosti hsCRP, IL6 in TNF- (36). Tudi pri bolnikih s predhodnim miokardnim infarktom 24-mese no zdravljenje z zaviralci PCSK9 ni vplivalo na vrednosti hsCRP, IL6 in TNF- (36), kar je v skladu z našimi rezultati.

Ugotovili smo, da genotipi analiziranih polimorfizmov ne vplivajo na vrednosti dejavnikov vnetja preiskovancev ob vklju itvi v raziskavo, kakor tudi ne na njihovo spremembo med zdravljenjem zdravljenju z zaviralci PCSK9. Prav tako ni bilo statisti no zna ilne razlike v vrednostih hsCRP in TNF- pred in po 6-mese nem zdravljenju z zaviralci PCSK9 glede na genotip polimorfizmov v genih *CRP* in *TNFA*. Smo pa v dokazali, da so imeli preiskovanci z genotipom CC polimorfizma rs1800795 gena *IL6* po 6 mesecih zdravljenja statisti no zna ilno nižje vrednosti IL6 v primerjavi s preiskovanci z genotipom CG in GG.

Statini, s katerimi so bili zdravljeni naši preiskovanci preden smo jih vklju ili v raziskavo, ne vplivajo na vrednosti IL6, pomembno pa znižajo vrednosti hsCRP in tudi TNF- (40, 41). To je bilo dokazano pri bolnikih v primarni preventivi (40) in pri bolnikih po sr no-žilnem dogodku, ki so bili zdravljenimi s statini (41). Dokazano je bilo tudi, da zdravljenje s statini pri bolnikih po miokardnem infarktu zniža hsCRP neodvisno od znižanja holesterola LDL (20). Zato je verjetno, da v naši skupini bolnikov, ki so bili predhodno zdravljeni s statini, ni bilo mogo e natan no oceniti vpliva analiziranih polimorfizmov na vrednosti hsCRP in TNF- med

zdravljenjem z zaviralci PCSK9, ker so bile vrednosti hsCRP in TNF- α že pred tem spremenjene zaradi predhodnega zdravljenja s statini. Smo pa pokazali (Slika 10) in s tem vsaj delno potrdili zastavljeno hipotezo, da se IL6, na katerega zdravljenje s statini ne vpliva, spremeni ob zdravljenju z zaviralci PCSK9, vendar je ta sprememba odvisna od genotipa. Genotip CC polimorfizma rs1800795 je povezan z nižjimi vrednostmi IL6 in tako deluje zaščitno pred vnetnim dogajanjem. Natančen mehanizem ni poznan, lahko pa na spremembo vpliva tudi dinamika uravnavanja IL6, ki zahteva daljši čas, ki se meri v tednih in mesecih (42). V obširni raziskavi z več kot 6500 bolniki s hiperholesterolemijo in brez znane koronarne bolezni se je pojavnost koronarne bolezni z zdravljenjem s statini znižala, in sicer ne glede na genotip polimorfizma rs1800795 gena *IL6*. Je pa je bil ta učinek bolj izrazit pri bolnikih z genotipom CC (43). V tej skupini je bilo takih preiskovancev 16 %, v naši skupini pa 23 %, kar je primerljivo. Prav tako so poročali, da je bila v skupini z genotipom CC vrednost IL6 po zdravljenju statistično nižja, kot v skupini GG ali GC (43). Zato bi lahko sklepali, da je bilo tudi zdravljenje z zaviralci PCSK9 pri v tej skupini bolj uspešno. Vendar pa je za potrditev tega potrebna raziskava z bistveno večjim številom preiskovancev.

Angiogeneza in VEGF, kot eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki jo uravnava, pomembno prispevata k stabilnosti aterosklerotične lezije (44). Raziskav, ki bi preučevale vpliv zaviralcev PCSK9 na VEGF, ni, podatki o vplivu statinov na VEGF pa so si nasprotujoči (45, 46). V naši raziskavi povezave med prisotnostjo polimorfizma gena *VEGFA* rs2010963 in spremembo v koncentraciji vnetnih dejavnikov hsCRP, TNF- α in IL6 po šestih mesecih zdravljenja z zaviralci PCSK9 nismo dokazali. Žal pri preiskovancih nismo določili koncentracij VEGF, tako da ne moremo sklepati, ali bi genetski polimorfizmi gena *VEGFA* vplivali na spremembo koncentracije samega VEGF med zdravljenjem z zaviralci PCSK9. Glede na to, da je bila velika večina naših bolnikov zdravljena z visoko potentnimi statini, ki znižajo koncentracijo VEGF, bi lahko prišlo do njegovega znižanja.

Da bi lahko natančneje opredelili vpliv genetskih dejavnikov na vrednosti hsCRP, TNF- α in VEGF med zdravljenjem s PCSK9, bi morali v raziskavo vključiti le bolnike, ki prej ne bi bili zdravljeni s statini. Glede na to, da so statini še vedno temeljna zdravila za zdravljenje hiperholesterolemij in preprečevanje srčno-žilnih bolezni, bi bila to izredno težka naloga. V raziskavo bi namreč lahko vključili le bolnike z dokazanim ne-prenašanjem statinov, njihovo število pa ni zelo veliko. Ker pa je učinek zaviralcev PCSK9 pri bolnikih zdravljenih s statini in tistih brez nekoliko različen (47), bi to zopet predstavljalo pristranskost, ki bi lahko vplivala na rezultate.

Relativno majhno število vključenih preiskovancev je pomembna pomanjkljivost naše raziskave. To je bilo še posebno pomembno pri analizi tistih polimorfizmov, pri katerih se manj pogostejši alel nahaja v manj kot 10%. Odlični primer za to je polimorfizem rs1800947 v genu CRP, pri katerem je redkejši alel G prisoten le pri 6,5% splošne evropske populacije (26). Ker smo preiskovali tako majhno skupino, razporeditev genotipov v naši skupini v nekaterih primerih najverjetneje ni dobro odražala dejanskega stanja. V določenih skupinah genotipov je bil tako le eden preiskovanec, kar seveda pomembno vpliva na izračun statistične značilnih povezav. Razlog za majhno skupino preiskovancev so bili izjemno strogi vključitveni kriteriji,

saj so morali preiskovanci imeti miokardni infarkt pred 50 letom, vsaj 6 mesecev po miokardnem infarktu stabilno zdravstveno stanje, povišane vrednosti Lp(a) in nespremenjen na in zdravljenja vsaj 8 tednov pred vklju itvijo v preiskavo. Po drugi strani pa je tako natan no izbrana skupina hkrati tudi pomembna prednost naše raziskave, ker omogo a prepoznavanje klini no pomembnih povezav za dolo eno skupino bolnikov, ki so si klini no podobni. Źal pa je zato takšnih bolnikov z zelo podobnim klini nim stanjem manj na voljo in je zato skupina manjša.

Rezultati, ki smo jih pridobili v tej raziskavi kažejo, da nekateri genetski dejavniki vplivajo na parametre vnetja in s tem pomembno vplivajo na odziv na zdravljenje z zaviralci PCSK9. To je v skladu s tem, da na u inkovitost zdravil in pojav stranskih u inkov pomembno vplivajo tudi genetski dejavniki, ki pa so zna ilni za posameznika. To podro je preiskuje veda, ki se imenuje farmakogenetika, in postaja vse bolj pomembna pri odlo anju o dozi zdravila, ki se bo predpisala posamezniku glede na njegov genotip (48). V tej raziskavi smo se omejili le na preiskovanje štirih izbranih polimorfizmov. Širša genetska analiza bi namre presegala obseg te raziskovalne naloge. Vsekakor pa mislim, da bi bilo smiselno nabor preiskovanih polimorfizmov mo no zve ati. Morda celo uporabiti druge molekularno genetske metode, kot je sekvenciranje nukleotidnega zaporedja. Te metode namre ne omogo ajo analiziranja samo ene genetske spremembe, kot to omogo a tehnologija TaqMan, ki smo jo uporabili v tej raziskovalni nalogi. S sekvenciranjem se lahko analizirajo vse genetske spremembe, ki se nahajajo v analiziranem podro ju. S takšnim pristopom bi namre lahko analizirali celotno zaporedje genov *CRP*, *TNFA*, *IL6*, in *VEGF*, ter s tem bolj podrobno opredelili vpliv genetskih dejavnikov na koncentracije vnetnih dejavnikov pri zdravljenju z zaviralci PCSK9. To pa bi v morda prihodnosti lahko bila osnova za predpisovanja individualno izbrane doze zaviralcev PCSK9 glede na genotip posameznega bolnika.

7. Zaključek

V tej raziskovalni nalogi smo potrdili, da se preiskovancem z zdravljenjem s zaviralci PCSK9 znižajo vrednosti holesterola, zdravljenje pa ne vpliva na vrednosti vnetnih dejavnikov IL-6, TNF- α in CRP. Ugotovili smo, da polimorfizmi rs1800795 gena *IL6*, rs1800629 gena *TNFA*, rs1800947 gena *CRP* in rs2010963 gena *VEGFA* ne vplivajo na koncentracije vnetnih parametrov v krvi ob začetku zdravljenja z zaviralci PCSK9 in po 6 mesecih zdravljenja. Smo pa pokazali, da je vrednost vnetnega dejavnika IL6 pred in po zdravljenju z zaviralci PCSK9 odvisna od genotipa. Genotip CC polimorfizma rs1800795 gena *IL6* je povezan z nižjimi vrednostmi IL6 in tako deluje zaščitno pred vnetnim dogajanjem. Za glavno pomanjkljivost raziskave se je izkazala majhna skupina preiskovancev. Razlog za to so zelo strogi vključitveni kriteriji pri izboru preiskovancev. Hkrati je natančno izbrana skupina tudi prednost te raziskave, saj omogoča raziskovanje klinično pomembnih povezav za skupino bolnikov z zelo podobnim zdravstvenim stanjem.

Hipotezo, da prisotnost polimorfizma v genih *IL6*, *TNFA* in *CRP*, ki kodirajo dejavnike vnetja IL-6, TNF- α in CRP, in v genu *VEGFA* vpliva na dinamiko spreminjanja parametrov vnetja ob zdravljenju hiperholesterolemije z zaviralci PCSK9, smo delno potrdili in sicer za analiziran polimorfizem v genu *IL6*. Glede na to, da genetski dejavniki pomembno vplivajo na dinamiko vnetja, menim, da bi bilo zato smiselno v prihodnjih raziskavah razširiti nabor analiziranih polimorfizmov.

Pri eksperimentalnem delu in pri pripravi naloge sem se seznanil in samostojno izvedel nekatere molekularno genetske analize. S tem sem dobil vpogled v laboratorijsko delo, ki me je res pritegnilo. Tako je bilo delo pomembna izkušnja, ki je vplivala tudi na mojo odločitev o izbiri študija. Rezultati so zanimivi tudi iz znanstvenega in strokovnega vidika in jih bomo v obliki plakata predstavili na mednarodni konferenci *Evropskega združenja za humano genetiko*, ki bo potekala 11. do 14.6.2022 na Dunaju (Priloga 1). Rokopis, ki med drugimi opisuje tudi te rezultate, pa je bil oddan v presojo za objavo v znanstveni reviji *Journal of Cardiovascular Development and Disease* s faktorjem vpliva 3,9 (Priloga 2).

8. Zahvala

Iskreno bi se rad zahvalil mentorjema, Danijeli Vlašič, in izr. prof. Miranu Šebeščen, za pomoč, nasvete in podporo pri izdelovanju naloge. Velika zahvala gre tudi Inštitutu za biokemijo in molekularno genetiko Medicinske fakultete, kjer sem opravljal eksperimentalni del naloge. Prav tako bi se rad zahvalil Inge Sotlar, mag. biokem., in Tini Levstek, mag. lab. biomed., za potrpežljivo uvajanje v laboratorijsko delo.

9. Literatura

1. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):56.
2. Ugovsek S, Sebestjen M. Lipoprotein(a)-The Crossroads of Atherosclerosis, Atherothrombosis and Inflammation. *Biomolecules*. 2021;12(1).
3. European Association for Cardiovascular P, Rehabilitation, Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*. 2011;32(14):1769-818.
4. Boren J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2020;41(24):2313-30.
5. Laboratorijski vodnik Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana <https://lab.biarti.si/>; Univerzitetni klinični center Ljubljana;
6. Kamstrup PR, Nordestgaard BG. Elevated Lipoprotein(a) Levels, LPA Risk Genotypes, and Increased Risk of Heart Failure in the General Population. *JACC Heart Fail*. 2016;4(1):78-87.
7. Kiechl S, Willeit J. The mysteries of lipoprotein(a) and cardiovascular disease revisited. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(19):2168-70.
8. Allen S, Khan S, Tam S, Koschinsky M, Taylor P, Yacoub M. Expression of adhesion molecules by lipoprotein(a): a potential novel mechanism for its atherogenicity. *FASEB J*. 1998;12(15):1765-76.
9. Ferretti G, Bacchetti T, Johnston TP, Banach M, Pirro M, Sahebkar A. Lipoprotein(a): A missing culprit in the management of athero-thrombosis? *J Cell Physiol*. 2018;233(4):2966-81.
10. Tsimikas S, Witztum JL. The role of oxidized phospholipids in mediating lipoprotein(a) atherogenicity. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19(4):369-77.
11. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Boren J, Andreotti F, Watts GF, et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J*. 2010;31(23):2844-53.
12. Zavrtnik M, Rehberger Likozar A, Šebeštjen M. Vloga lipoproteina (a) v patogenezi ishemične bolezni srca, degenerativne aortne stenoze in srčne popušnja. *Zdrav Vestn*. 90(5-6):307-21.
13. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74.
14. Ježovnik M, Poredoš, Pavel, Rener-Primec, Zvonka. Vnetje - skupni patogenetski dejavnik arterijske aterosklerotične in venske tromboembolične bolezni. *Zdravniški vestnik*. 2017;86(5/6):10.
15. Ballantyne CM, Nambi V. Markers of inflammation and their clinical significance. *Atheroscler Suppl*. 2005;6(2):21-9.
16. Ridker PM. C-reactive protein: eighty years from discovery to emergence as a major risk marker for cardiovascular disease. *Clin Chem*. 2009;55(2):209-15.
17. Cozlea DL, Farcas DM, Nagy A, Keresztesi AA, Tifrea R, Cozlea L, et al. The impact of C reactive protein on global cardiovascular risk on patients with coronary artery disease. *Curr Health Sci J*. 2013;39(4):225-31.
18. McPherson R, Frohlich J, Fodor G, Genest J, Canadian Cardiovascular Society. Canadian Cardiovascular Society position statement--recommendations for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease. *Can J Cardiol*. 2006;22(11):913-27.
19. Sabatine MS, Morrow DA, Jablonski KA, Rice MM, Warnica JW, Domanski MJ, et al. Prognostic significance of the Centers for Disease Control/American Heart Association high-

- sensitivity C-reactive protein cut points for cardiovascular and other outcomes in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*. 2007;115(12):1528-36.
20. Ridker PM, Pradhan A, MacFadyen JG, Libby P, Glynn RJ. Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the JUPITER trial. *Lancet*. 2012;380(9841):565-71.
21. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407(6801):242-8.
22. Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation*. 1998;98(20):2108-16.
23. Wang Y, Huang Q, Liu J, Wang Y, Zheng G, Lin L, et al. Vascular endothelial growth factor A polymorphisms are associated with increased risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(18):30539-51.
24. Nicholls SJ. Using genetics to guide treatment and drug development in cardiovascular medicine: time to reveal the proof in the pudding. *Cardiovasc Res*. 2020;116(2):e30-e2.
25. Worns MA, Victor A, Galle PR, Hohler T. Genetic and environmental contributions to plasma C-reactive protein and interleukin-6 levels--a study in twins. *Genes Immun*. 2006;7(7):600-5.
26. Genome Aggregation Database (GnomAD) <https://gnomad.broadinstitute.org/>
27. Hernandez-Diaz Y, Tovilla-Zarate CA, Juarez-Rojop I, Banos-Gonzalez MA, Torres-Hernandez ME, Lopez-Narvaez ML, et al. The role of gene variants of the inflammatory markers CRP and TNF-alpha in cardiovascular heart disease: systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(8):11958-84.
28. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*. 1997;34(5):391-9.
29. Pulido-Gomez K, Hernandez-Diaz Y, Tovilla-Zarate CA, Juarez-Rojop IE, Gonzalez-Castro TB, Lopez-Narvaez ML, et al. Association of G308A and G238A Polymorphisms of the TNF-alpha Gene with Risk of Coronary Heart Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Med Res*. 2016;47(7):557-72.
30. Jenny NS, Tracy RP, Ogg MS, Luong le A, Kuller LH, Arnold AM, et al. In the elderly, interleukin-6 plasma levels and the -174G>C polymorphism are associated with the development of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(12):2066-71.
31. Tan J, Hua Q, Li J, Fan Z. Prognostic value of interleukin-6 during a 3-year follow-up in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Heart Vessels*. 2009;24(5):329-34.
32. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020;41(1):111-88.
33. Tsimikas S, Gordts P, Nora C, Yeang C, Witztum JL. Statin therapy increases lipoprotein(a) levels. *Eur Heart J*. 2020;41(24):2275-84.
34. Enkhmaa B, Anuurad E, Zhang W, Tran T, Berglund L. Lipoprotein(a): genotype-phenotype relationship and impact on atherogenic risk. *Metab Syndr Relat Disord*. 2011;9(6):411-8.
35. Bittner VA, Szarek M, Aylward PE, Bhatt DL, Diaz R, Edelberg JM, et al. Effect of Alirocumab on Lipoprotein(a) and Cardiovascular Risk After Acute Coronary Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(2):133-44.
36. Baruch A, Mosesova S, Davis JD, Budha N, Vilimovskij A, Kahn R, et al. Effects of RG7652, a monoclonal antibody against PCSK9, on LDL-C, LDL-C subfractions, and

- inflammatory biomarkers in patients at high risk of or with established coronary heart disease (from the Phase 2 EQUATOR Study). *Am J Cardiol.* 2017;119(10):1576-83.
37. Rehberger Likoza A, Blinc A, Trebusak Podkrajsek K, Sebestjen M. LPA Genotypes and Haplotypes Are Associated with Lipoprotein(a) Levels but Not Arterial Wall Properties in Stable Post-Coronary Event Patients with Very High Lipoprotein(a) Levels. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2021;8(12).
38. LifeTechnologies. TaqMan® SNP Genotyping Assays USER GUIDE. In: Biosystems A, editor. Carlsbad, CA, USA: Life Technologies Corporation; 2017.
39. Ricci C, Ruscica M, Camera M, Rossetti L, Macchi C, Colciago A, et al. PCSK9 induces a pro-inflammatory response in macrophages. *Sci Rep.* 2018;8(1):2267.
40. Sebestjen M, Keber I, Zegura B, Simcic S, Bozic M, Fressart MM, et al. Statin and fibrate treatment of combined hyperlipidemia: the effects on some novel risk factors. *Thromb Haemost.* 2004;92(5):1129-35.
41. Abbasifard M, Kandelouei T, Aslani S, Razi B, Imani D, Fasihi M, et al. Effect of statins on the plasma/serum levels of inflammatory markers in patients with cardiovascular disease; a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Inflammopharmacology.* 2022.
42. Fontes JA, Rose NR, Cihakova D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine.* 2015;74(1):62-8.
43. Basso F, Lowe GD, Rumley A, McMahon AD, Humphries SE. Interleukin-6 -174G>C polymorphism and risk of coronary heart disease in West of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(4):599-604.
44. Wesolowska A, Winiarska H, Owoc J, Borowska M, Domagala J, Mikolajczak PL, et al. Effects of Low-Dose Atorvastatin on the Peripheral Blood Mononuclear Cell Secretion of Angiogenic Factors in Type 2 Diabetes. *Biomolecules.* 2021;11(12).
45. Nishimoto-Hazuku A, Hirase T, Ide N, Ikeda Y, Node K. Simvastatin stimulates vascular endothelial growth factor production by hypoxia-inducible factor-1alpha upregulation in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008;51(3):267-73.
46. Koyuturk M, Ersoz M, Altioek N. Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase. *Neurosci Lett.* 2004;370(2-3):212-7.
47. Watts GF, Chan DC, Pang J, Ma L, Ying Q, Aggarwal S, et al. PCSK9 Inhibition with alirocumab increases the catabolism of lipoprotein(a) particles in statin-treated patients with elevated lipoprotein(a). *Metabolism.* 2020;107:154221.
48. Rigter T, Jansen ME, de Groot JM, Janssen SWJ, Rodenburg W, Cornel MC. Implementation of Pharmacogenetics in Primary Care: A Multi-Stakeholder Perspective. *Front Genet.* 2020;11:10.

10. Priloge

Priloga 1: Povzetek sprejet za predstavitev v obliki plakata na mednarodni konferenci Evropskega združenja za humano genetiko na Dunaju.



European Human Genetics Conference

Vienna, Austria

JUNE 11-14, 2022

Abstract Title: No effect of CRP rs1800947, TNF- α rs1800629 and IL6 rs1800795 polymorphisms on plasma levels of inflammatory markers after treatment with PCSK9 inhibitors

Control Number: 1259

Topic: 06. Cardiovascular Disorders

Presentation Preference: Digital Only Poster

Applied for Early Career Award and/or Fellowship:

Conference Fellowships for European Countries

Authors:

Tina Levstek*¹, Nik Podkrajšek¹, Inge Sotlar¹, Andreja Rehberger Likozar²

¹Institute of Biochemistry and Molecular Genetics, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, ²Department of Vascular Diseases, University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

Background/Objectives:

Inflammation plays a key role in the pathogenesis of atherosclerosis. However, the role of genetic variability on inflammation after treatment with proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibitors remains to be elucidated. For the first time, we examined the influence of polymorphisms in *CRP*, *TNF- α* , and *IL6* genes on plasma levels of hsCRP, TNF- α , and IL6 at baseline and after treatment with PCSK9 inhibitors.

Methods:

A total of 69 patients with stable coronary artery disease after a premature myocardial infarction were included in the study. All patients had extremely elevated lipoprotein(a) levels and received a PCSK9 inhibitor. Genotyping for *CRP* rs1800947, *TNF- α* rs1800629, and *IL6* rs1800795 was performed.

Results:

Our results showed no significant association between single nucleotide polymorphisms in *CRP*, *TNF- α* , and *IL6* and plasma levels of hsCRP, TNF- α , and IL6, respectively. Consistent with previous studies, no significant change in levels of inflammatory biomarkers was observed after 6 months of treatment with PCSK9 inhibitors. Moreover, genetic variability in selected genes was not significantly associated with the change in plasma levels of corresponding inflammatory markers.

Conclusion:

Genetic variability did not affect plasma levels of inflammatory markers, which could be due to background therapy with statins or extremely elevated lipoprotein(a) levels, because lipoprotein(a) itself contributes to inflammation. Further studies are needed to clarify which factors contribute most to the modulation of inflammation in high-risk patients.

Priloga 2: Naslovnica rokopisa, ki opisuje rezultate te naloge, in je bil oddan v presojo za objavo v reviji *Journal of Cardiovascular Development and Disease*.

Article /

The Influence of Treatment with PCSK9 Inhibitors and Variants in the *CRP* (rs1800947), *TNFA* (rs1800629), and *IL6* (rs1800795) Genes on the Corresponding Inflammatory Markers in Patients with Very High Lipoprotein(a) Levels

Tina Levstek ¹, Nik Podkrajšek ¹, Andreja Rehberger Likozar ², Miran Šebeštjen ^{2,3,4} Katarina Trebušak Podkrajšek ^{1,5,*}

¹ Institute of Biochemistry and Molecular Genetics, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Vrazov trg 2 1000 Ljubljana, Slovenia; tina.levstek@mf.uni-lj.si (T.L.)

² Department of Vascular Diseases, University Medical Centre Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenia; andreja.rehbergerlikozar@kclj.si (A.R.L.), miran.sebestjen@guest.arnes.si (M.Š.)

³ Department of Cardiology, University Medical Centre Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenia

⁴ Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenia

⁵ Clinical Institute for Special Laboratory Diagnostics, University Children's Hospital, University Medical Centre Ljubljana, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana, Slovenia

* Correspondence: katarina.trebusakpodkrajsek@mf.uni-lj.si