

Autoreferat

1. Imię i nazwisko:

Małgorzata Waluś - Miarka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

- Lekarz medycyny – Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, 2002r.
- Doktor nauk medycznych - Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, 2008 r., praca pt.: „Wybrane parametry funkcji śródbłónka u pacjentów z cukrzycą typu 2”, promotor: Prof. dr hab. Maciej T. Małecki
- Specjalista chorób wewnętrznych, Szpital Uniwersytecki, Kraków 2010 r.
- Specjalista diabetologii, Szpital Uniwersytecki, Kraków 2013 r.
- Rozpoczęta specjalizacja z endokrynologii, Kraków 2015 r.

Kursy:

- 2006: Introduction to Clinical Research, Vienna School of Clinical Research, ProMedicina Erudita, Warszawa
- 2012: Kurs z lipidologii Polskiego Towarzystwa Lipidologicznego-PoLa dyplom specjalisty lipidologa –Warszawa
- 2015: Kurs na temat rozpoznawania i leczenia rodzinnej hipercholesterolemii organizowany przez Europejskie Towarzystwo Miażdżycowe (European Atherosclerosis Society EAS) EAS FH Course - 2015, Goteborg, Sweden
- 2017: Kurs APEX na temat rozpoznawania i leczenia rodzinnej Hipercholesterolemii, Paryż, Francja

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- Studia na kierunku lekarskim, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum 1996-2002 r.
- Studia doktoranckie, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum 2003-2007 r.
- Szpital Uniwersytecki w Krakowie, od 2002 r. w ramach studiów doktoranckich i umowy cywilno – prawnej oraz wykonywania grantu MNiSW
- Katedra Chorób Metabolicznych i Zakład Dydaktyki Medycznej, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum od 2002 r. (aktualnie na stanowisku adiunkta)
- Szkoła Medyczna dla Obcokrajowców Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum od roku 2005

Udział w grantach

1. Grant w ramach STN GS-2001-5: Podatność naczyń tętniczych a stężenie homocysteiny w surowicy krwi u chorych z cukrzycą typu 2 - Kierownik.
2. Grant Juventus plus nr IP2011 058771 pt. Badanie spektrum mutacji autosomalnej dominującej hipercholesterolemii u osób z regionu Małopolski celem stworzenia nowego testu diagnostycznego” - Kierownik
3. Grant MNiSZW, ID: 6-POSD-095-20 pt. Familial LCAT deficiency - clinical characteristic and molecular analysis of genetic defect in patients from Polish family - wykonawca
4. Grant MZ, ID N N404 0709 33 pt. „Rejestr, badanie podłoża molekularnego i wybranych zagadnień klinicznych rodzinnej heterozygotycznej hipercholesterolemii w populacji Małopolski” - wykonawca
5. Badanie K/ZDS/000631 - Hyperhomocysteinemia a makroangiopatia u pacjentów z cukrzycą typu 2 (2008-2010) - wykonawca
6. Badanie K/ZDS/002459 - Makroangiopatia cukrzycowa a stłuszczenie wątroby u chorych z cukrzycą typu 2 i u chorych w stanie przedcukrzycowym (2011-2015) - wykonawca
7. Badanie K/ZDS/5595 Zaburzenia transportu lipoprotein i niealkoholowe stłuszczenie wątroby (2015 i nadal) - wykonawca
8. Badanie DIRECT – Diabetic Retinopathy Candesartan Trial - wykonawca w ośrodku krakowskim

Współpraca z Zakładem Genetyki II Katedry Chorób Wewnętrznych, Kierownik: Prof. dr hab. Marek Sanak, na temat podłoża molekularnego rodzinnej hipercholesterolemii.

Współpraca z Kliniką Kardiologii, Kierownik Prof. dr hab. med. Danuta Czarnecka, na temat czynników ryzyka nieinwazyjnych markerów miażdżycy (sztywność tętnic, grubość błony wewnętrznej i środkowej tętnic szyjnych) u pacjentów z cukrzycą typu 2 i pacjentów z rodzinną hipercholesterolemią.

Współpraca z Prof. S. Humphriesem, kierownikiem Genetics Institute, UCL London, na temat badań genetycznych w hipercholesterolemii rodzinnej.

VII. Praca dydaktyczna i popularyzatorska

Prowadzenie zajęć dydaktycznych:

- 2003-nadal: zajęcia dydaktyczne dla studentów wydziału lekarskiego; od 2010 roku w wymiarze pełnego etatu naukowo-dydaktycznego: 210 godz/rok z przedmiotu laboratoryjne nauczanie umiejętności klinicznych, wprowadzenie do nauk klinicznych oraz zajęć z chorób wewnętrznych i komunikacji klinicznej.
- Prowadzenie zajęć w Szkole dla Obcokrajowców z przedmiotów: Laboratory Training of Clinical Skills, Introduction to Clinical Science oraz Clinical Communication w Zakładzie Dydaktyki Medycznej UJ CM
- Prowadzenie zajęć w Szkole dla Obcokrajowców z przedmiotu: Metabolic Diseases (bedside teaching, teaching ward round) w Katedrze Chorób Metabolicznych CM UJ; 2004 – nadal

Opieka nad pracami magisterskimi:

- Brak

Kursy i szkolenia w Polsce i za granicą, między innymi:

- 2013 – 2016: wykładowca na konferencjach z zakresu lipidologii organizowanych przez Katedrę Chorób Metabolicznych UJ CM
- 2014: udział w warsztatach PTK (Polskie Towarzystwo Kardiologiczne) na temat leczenia hipercholesterolemii, Wisła
- 2015: udział w przygotowaniu programu szkolenia z zakresu chorób rzadkich dla studentów Wydziału Lekarskiego (koordynator dr hab. Grzegorz Kopeć; opracowanie części dot. rodzinnej hipercholesterolemii)

Inne:

Wykłady dla chorych na cukrzycę w ramach spotkań Stowarzyszenia dla Chorych na Cukrzycę (2010)

- Od 2015: opiekun studenckiego Koła Zaburzeń Lipidowych przy Katedrze i Klinice Chorób Metabolicznych, CM UJ
- 2015 – praca pt. „ An Interesting Case of Familial Hypercholesterolemia Due to LDL Receptor Mutation”, Author: Katarzyna Dądela, Tutor: Małgorzata Waluś-Miarka MD, PhD,

Jagiellonian University Medical College prezentowana na zjeździe
Studenckiego Towarzystwa Naukowego
– w 2016r. grant Studenckiego Towarzystwa Naukowego na projekt pt.
„Mutacja genu APOB (R3527Q) u pacjentów z hipercholesterolemią
rodzinną w Południowo-Wschodniej Polsce”.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a. Tytuł osiągnięcia naukowego

Nowe kierunki badań nad charakterystyką kliniczną oraz spektrum genetycznym pacjentów z rodzinną hipercholesterolemią.

b. (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

1. **Waluś-Miarka M**, Czarnecka D, Wojciechowska W, Kloch-Badełek M, Kapusta M, Sanak M, Wójcik M, Małecki MT, Starzyk J, Idzior-Waluś B. Carotid Plaques Correlates in Patients With Familial Hypercholesterolemia. *Angiology*. 2016,67 (5), 471-7. **Punktacja MNiSW: 20.000 Impact Factor ISI- 3.085**
2. **Waluś-Miarka M**, Czarnecka D, Kloch-Badełek M, Wojciechowska W, Kapusta M, Malecki MT. Carotid artery plaques - Are risk factors the same in men and women with familial hypercholesterolemia? *Int J Cardiol*. 2017 Oct 1;244:290-295. **Punktacja MNiSW: 35.000 Impact Factor ISI- 6.189**
3. **Waluś-Miarka M**, Sanak M, Idzior-Waluś B, Miarka P, Witek P, Małecki MT, Czarnecka D. A novel mutation (Cys308Phe) of the LDL receptor gene in families from the South-Eastern part of Poland. *Mol Biol Rep*. 2012 May;39(5):5181-6. **Punktacja MNiSW: 15.000 Impact Factor ISI: 2.506**
4. Sharifi M, **Walus-Miarka M**, Idzior-Waluś B, Malecki MT, Sanak M, Whittall R, Li KW, Futema M, Humphries SE. The genetic spectrum of familial hypercholesterolemia in south-eastern Poland. *Metabolism*. 2016 Mar;65(3):48-53. **Punktacja MNiSW 30.000 IF- 5.777**

Łączny **Impact Factor** prac zgłaszanych jako osiągnięcie – **17.557**

(100 KBN/MNiSW)

c. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z

omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Prace badawcze opublikowane przeze mnie po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych dotyczą zagadnień prewencji chorób układu krążenia i koncentrują się na chorych o wysokim lub bardzo wysokim ryzyku sercowo-naczyniowym – z rodzinną hipercholesterolemią a także chorych z cukrzycą typu 2. Modyfikacja behawioralna oraz farmakologiczna czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego ma istotne znaczenie w zapobieganiu miażdżycy naczyń i jej powikłaniom w postaci zawałów serca, niedrożności naczyń i zapotrzebowaniu na zabiegi rewaskularyzacyjne oraz nagłym zgonom sercowym. Powikłania te stanowią obciążenie zdrowotne i ekonomiczne, stąd wykrywanie osób o wysokim ryzyku sercowo-naczyniowym i ich leczenie ma kluczowe znaczenie.

Wybór publikacji powstałych w ramach realizowanego przeze mnie jako wykonawcę grantu K/PBW/0000/78 pt. „Rejestr, badanie podłoża molekularnego i wybranych zagadnień klinicznych Rodzinnej Heterozygotycznej Hipercholesterolemii (RHH) w populacji Małopolski” oraz kierowanego przeze mnie projektu Juventus Plus (Projekt Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, nr K/PMI/000004, stanowiący cykl badań nad rodzinną hipercholesterolemią zgłaszam w niniejszym wniosku jako Osiągnięcie.

Wprowadzenie

Rodzinna hipercholesterolemia (RH) jest najczęstszym, dziedzicznym autosomalnie dominującym zaburzeniem metabolizmu lipidów. Szacuje się, że występuje z częstością 1:500, a nawet 1:200 osób w populacji ogólnej. Jednak w znacznym odsetku przypadku pozostaje niewykryta lub nierozpoznana i nieskutecznie leczona. RH charakteryzuje się znacznie podwyższonym stężeniem cholesterolu i aterogenicznej frakcji LDL-cholesterolu oraz występowaniem przedwczesnej choroby niedokrwiennej serca, prowadzącej do zawałów serca i nagłych zgonów wieńcowych. Średni wiek rozpoznania CHNS u nieleczonych mężczyzn z RH wynosi 43 lata, u nieleczonych kobiet z RH CHNS występuje około 10 lat później. Szczególnie wysoka nadumieralność występuje u osób młodych z RH. Leczenie hipolipemizujące, obniżające stężenie LDL-C w surowicy jest skuteczne w prewencji incydentów sercowo – naczyniowych, tym niemniej nawet u chorych leczonych intensywnie lekami obniżającymi stężenie LDL-cholesterolu umieralność na CHNS jest wyższa niż w populacji ogólnej. Stwierdzono, że większa redukcja wyjściowego stężenia LDL-C wiąże się z większą redukcją chorób układu krążenia. Wykrycie RH u pacjenta zobowiązuje lekarza do przebadania jego krewnych - rodzeństwa, dzieci – tzw. skryning kaskadowy i objęcia opieką medyczną wszystkich wykrytych chorych. Wczesne wykrywanie i skuteczne leczenie jest także bardziej ekonomiczne niż leczenie powikłań sercowo naczyniowych, które stanowią obciążenie chorego i jego rodziny, a także obciążenie dla społeczeństwa.

Przyczyną RH są mutacje w genie receptora LDL, genie apo B 100, liganda receptora LDL oraz mutacje w niedawno odkrytym genie PCSK9. Mutacje te prowadzą do upośledzenia katabolizmu LDL i usuwania LDL-C z krążenia. Mimo znacznego ryzyka sercowo-naczyniowego, manifestującego się podwyższonym stężeniem LDL-C od urodzenia, występowaniem zawałów serca i nagłych zgonów

sercowych w rodzinie chorego oraz objawów w badaniu fizykalnym w postaci żółtaków ścięgien, choroba jest często nierozpoznawana i w związku z tym nie leczona, lub leczona nieadekwatnie do stopnia ryzyka sercowo-naczyniowego. Chorzy z hipercholesterolemią i obecnością zmian miażdżycowych cechują się bardzo wysokim ryzykiem sercowo-naczyniowym (s-n), stąd trwają poszukiwania nieinwazyjnych markerów subklinicznych zmian miażdżycowych w celu wyodrębnienia chorych o wysokim zagrożeniu. Do nieinwazyjnych markerów oceny naczyń należą pomiary wartości intymy – medii tętnic szyjnych i pomiary sztywności naczyń. Wyniki ostatnio przeprowadzonych badań markerów ryzyka s-n sugerują, że obecność blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych jest bardziej wiarygodnym markerem incydentów s-n niż pomiar grubości błony środkowej i wewnętrznej tętnic szyjnych.

Celem badań była charakterystyka kliniczna i biochemiczna pacjentów z RH pod kątem poszukiwania związku wiarygodnych markerów zmian w naczyniach szyjnych: blaszek miażdżycowych, grubości intima-medii i prędkości fali tętna z czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowymi, takimi jak stężenie lipidów i apolipoprotein w surowicy, ciśnienie tętnicze, glikemia, czy parametry nadwagi i otyłości.

Ponadto postawiono zadanie określenia podłoża molekularnego RH u pacjentów zamieszkujących rejon Małopolski.

W pracy nr. 1 poddano ocenie związku pomiędzy obecnością blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych, wiarygodnych predyktorów incydentów sercowo-naczyniowych a modyfikowalnymi czynnikami ryzyka s-n. Badaniem objęto 241 pacjentów z rodzinną hipercholesterolemią (w tym 40,7% mężczyzn), zdiagnozowaną na podstawie oceny klinicznej (kryteria Simon Broome Register). U wszystkich pacjentów wykonano badanie kwestionariuszowe, obejmujące pytania na temat obecności chorób układu krążenia, wywiadu rodzinnego, stosowanych leków. Wykluczono wtórne przyczyny hipercholesterolemii. U wszystkich chorych wykonano wystandaryzowanymi metodami pomiary antropometryczne, pomiar ciśnienia tętniczego krwi oraz badanie fizykalne. Ponadto dokonano, we współpracy z II Kliniką Kardiologii (kierownik - prof. dr hab. med. Danuta Czarnecka), pomiarów nieinwazyjnych markerów zmian miażdżycowych naczyń: prędkości fali tętna (puls wave velocity - PWV) oraz pomiarów błony wewnętrznej i środkowej tętnic szyjnych (intima-media thickness -IMT), łącznie z pomiarem obecności blaszek miażdżycowych. Pomiaru PWV dokonano pomiędzy tętnicą szyjną i udową, obliczano średnią z 10 pomiarów. Pomiaru IMT dokonano na proksymalnej i dystalnej ścianie tętnicy szyjnej wspólnej, obliczono średnią z 3 pomiarów. Blaszkę miażdżycową definiowano jako grubość $IMT > 1,5$ mm lub ogniskowy wzrost IMT o 0,5 mm lub o 50% IMT w przylegającym segmencie naczynia.

Badania laboratoryjne obejmowały wykonanie lipidogramu, oznaczenie stężenia apolipoproteiny B100 i A1 (metodą immunoturbidymetryczną) oraz badanie parametrów oceny czynności tarczycy, wątroby i nerek.

Średni wiek pacjentów wynosił $41 \pm 18,4$ lat. U 36,5% badanych stwierdzono występowanie blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych. Pacjenci z obecnością blaszek byli starsi i cechowali się wyższym stężeniem apolipoproteiny (apo) B, glukozy, apoA1, ciśnienia tętniczego krwi skurczowego i rozkurczowego

współczynnika talia/biodra (WHR) i wskaźnika masy ciała. Analiza logistyczna wykazała, że stężenie apo B wykazywało silny związek dodatni, a stężenie HDL-C istotny związek ujemny z obecnością blaszek: iloraz szans dla zmiany apo B o 1 jednostkę wynosił 1,03 ($p < 0.005$), dla zmiany HDL-C o 1 odchylenie standardowe 0.59 ($p = 0.015$) i dla nie-HDL-C 1,53 dla zmiany o 1 odchylenie standardowe ($p < 0.04$). Te wyniki potwierdzają istotny związek lipoprotein zawierających apoB i niskiego stężenia HDL-C z obecnością blaszek. Badanie wykazało także istotny związek grubości błony wewnętrznej i środkowej tętnic szyjnych ze stężeniem apo B, ciśnieniem tętniczym i wskaźnikiem talia/biodra. Badanie ma znaczenie poznawcze, a także implikacje praktyczne w postaci podkreślenia roli całego profilu lipidowego, również stężenia HDL-C i współistniejących czynników ryzyka w prewencji powikłań sercowo-naczyniowych u osób z FH.

W pracy nr 2 podjęto próbę porównania czynników ryzyka blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych, istotnych predyktorów miażdżycy naczyń wieńcowych, u pacjentów z RH w zależności od płci chorego. Badaniem objęto 154 pacjentów, w tym 40,9% mężczyzn, z RH rozpoznaną na podstawie kryteriów rejestru Simon Broome. Blaszkę miażdżycową oceniano na podstawie usg. Dokładny opis metodyki badania przedstawiono przy omawianiu pracy nr 1. Na podstawie analizy wieloczynnikowej regresji logistycznej, stwierdzono, że u kobiet ciśnienie tętnicze krwi skurczowe, stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości HDL (HDL-C) w surowicy, stężenie apolipoproteiny (apo) A1 i aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) wiązały się z obecnością blaszek tętnic szyjnych. W badanej przez nas grupie kobiet, wykazano, że po wystandaryzowaniu na wiek, wzrost HDL-C o 1 odchylenie standardowe wiązał się z 55% spadkiem ilorazu szans obecności blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych ($p = 0.01$), a wzrost aktywności ALT o 1 U/L wiązał się z 7% wzrostem ilorazu szans obecności blaszek miażdżycowych tt. szyjnych ($p = 0.02$). U mężczyzn w analizie regresji logistycznej tylko stężenie apolipoproteiny B wiązało się istotnie z obecnością blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych. Wzrost stężenia apo B o 1 mg/dl odpowiadał wzrostowi o 4% szansy obecności blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych ($p = 0.01$). Ponadto, analizując pacjentów stosujących statyny zaobserwowano, że u mężczyzn nie leczonych statynami wzrost ryzyka obecności blaszek przy wzroście stężenia apo B o 1 mg/dl wynosił 8% ($p = 0.04$). W podsumowaniu, wyniki tego badania wykazały, że czynniki ryzyka blaszek są różne u kobiet i mężczyzn z RH. Wyniki tego badania potwierdzają, że czynniki obecności blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych są różne u mężczyzn i kobiet z RH. Mają one implikacje poznawcze – sugerują istotną rolę cholesterolu lipoprotein HDL w prewencji zmian miażdżycowych u kobiet z RH i praktyczne, podkreślają znaczenie HDL-C w prewencji CHNS w tej grupie chorych. Ma to tym większe znaczenie, że ostatnio przeprowadzone badania skandynawskie wskazują, że początek wystąpienia CHNS i umieralność sercowo-naczyniowa u kobiet z RH nie różni się od mężczyzn. Stężenie HDL-C, ciśnienie tętnicze i aktywność aminotransferazy alaninowej wiążą się z zespołem insulinooporności, co pośrednio może wskazywać na rolę modyfikacji stylu życia w prewencji CHNS u kobiet z RH.

W pracy nr 3 przedstawiono wyniki badań poszukiwania podłoża molekularnego RH w populacji polskiej. Aktywne wykrywanie osób z rodzinną hipercholesterolemią oraz wczesne objęcie skutecznym leczeniem pacjenta i wszystkich jego krewnych dotkniętych chorobą ma istotne znaczenie w prewencji powikłań sercowo-naczyniowych w tej grupie chorych. Do rozpoznania rodzinnej hipercholesterolemii służy system punktowy, w którym bierze się pod uwagę stężenie cholesterolu LDL w surowicy u pacjenta i jego krewnych, obecność przedwczesnej choroby niedokrwiennej serca u pacjenta i jego rodziny, obecność złogów cholesterolu w tkankach, takich jak ścięgna prostowników palców, Achillesa, obecność rąbka rogówki. Potwierdzeniem rozpoznania jest diagnoza molekularna. Szacuje się, że w populacji Polski, podobnie jak w innych krajach, jest mało osób z RH wykrytych i jeszcze mniej skutecznie leczonych. Badanie podłoża molekularnego RH ma znaczenie poznawcze oraz praktyczne – wykrycie pacjentów z mutacją oraz wczesne wdrożenie leczenia hipercholesterolemii.

Do projektu badania podłoża molekularnego RH zrekrutowano niespokrewnionych pacjentów z rozpoznaniem klinicznym FH z regionu Małopolski. Pacjentów do badania kwalifikowano na podstawie kryteriów Simon Broome Register, do badania włączono pacjentów z pewnym i prawdopodobnym rozpoznaniem FH. W celu rekrutacji nawiązano współpracę z lekarzami podstawowej opieki zdrowotnej, kardiologami i pediatrami z regionu Małopolski (Klinika Endokrynologii Dzieci i Młodzieży Instytutu Pediatrii, kierownik: prof. dr hab. Jerzy Starzyk). Lekarzy informowano o programie drogą e-mailową i poprzez rozsyłanie wydrukowanych ulotek. Ponadto, zorganizowano w kolejnych latach trwania projektu trzy edycje konferencji lipidowych, w trakcie których przedstawiano kryteria rozpoznania FH, wyniki wstępne badania oraz informowano o poszukiwaniu spełniających kryteria FH pacjentów.

Projekt był realizowany w Katedrze Chorób Metabolicznych Collegium Medicum UJ w Krakowie, a także w ośrodku Omicron (Ośrodek zaawansowanych technologii molekularnych o wysokiej wydajności) oraz we współpracy z Genetics Institute, Department of Genetics, Environment and Evolution, University College London (kierownik prof. S. Humphries). W zakresie izolacji materiału genetycznego oraz analiz laboratoryjnych współpracowano również z Zakładem Diagnostyki Molekularnej II katedry chorób Wewnętrznych. (kierownik prof. dr hab. Marek Sanak). Jednostki zaangażowane w realizację projektu posiadają znaczącą pozycję naukową oraz doświadczenie w obszarze badawczym.

Poszukiwanie podłoża molekularnego RH w populacji polskiej doprowadziło do wykrycia nowych mutacji w genie receptora LDL. **W pracy nr. 3** przedstawiono charakterystykę nowej mutacji, występującej u trzech rodzin rodziny z klinicznym rozpoznaniem hipercholesterolemii zamieszkałych w Polsce Południowo-Wschodniej. U wszystkich probantów wykonano sekwencjonowanie wszystkich egzonów genu receptora LDL. Ponadto badano aktywność receptora LDL w limfocytach krwi obwodowej, poprzez określenie wiązania i wychwytu DiL-LDL. U 3 niespokrewnionych probantów z RH wykryto nową mutację c986G>T (Cys308Phe) w egzonie 7 genu receptora LDL. Analiza aktywności receptora LDL w limfocytach krwi obwodowej wykazała znaczne obniżenie wychwytu DiL-LDL u pacjentów heterozygot dla tej mutacji (o 24% w porównaniu z osobami zdrowymi, stanowiącymi grupę kontrolną). Stężenia LDL-cholesterolu

w surowicy u probantów przed leczeniem wynosiły 9.5 do 10.5 mmol/l. W badaniu fizykalnym wszyscy pacjenci mieli rąbek starczy i żółtaki ścięgien. Rodziny z mutacją cechowały się obecnością przedwczesnej choroby niedokrwiennej serca. Ta mutacja występowała względnie często w naszej grupie pacjentów z RH, ale może to być wynikiem efektu założyciela, ponieważ wykazaliśmy obecność wspólnych przodków tych rodzin. Opisanie tej mutacji przyczyniło się do pogłębienia wiedzy na temat podłoża genetycznego RH w populacji małopolski.

W zebranych materiale genetycznym dokonano analizy genów odpowiedzialnych za rozwój hipercholesterolemii rodzinnej – zbadano mutacje w genie receptora LDL (LDLR), genie liganda receptora – apo B 100 i niedawno odkrytym genie PCSK9, białka regulującego aktywność receptora (we współpracy z University College London (UCL)). Wyniki te opisano w **pracy nr 4**. Przeprowadzono sekwencjonowanie wszystkich 18 egzonów genu *LDLR*, fragmentu egzonu 26 genu *apoB* w pozycji p.Arg3527Gln, gdzie najczęściej występują mutacje i egzonu 7 genu *PCSK9* w pozycji p.Asp374Tyr.

Stosowano technikę High Resolution Melt i bezpośrednie sekwencjonowanie produktów PCR. Ponadto techniką MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) oceniono obecność delecji i insercji w genie LDLR.

Ostatnio wykazano, że u znacznego odsetka osób z klinicznym podejrzeniem FH (około 60%), u których nie wykryto mutacji w genach powodujących RH, akumulacja często występujących, wywołujących niewielki wpływ na wzrost stężenia LDL-C alleli prowadzić może do wystąpienia fenotypu RH. W konsekwencji wysokie stężenie LDL-C może być wynikiem poligenicznego dziedziczenia wybranych wariantów genetycznych. Na podstawie badania wybranych wariantów genetycznych w 12 genach obliczono tzw. poligenic score (12-single nucleotide polymorphism (12-SNP) score). Badania poligenic score wykonano w badanej grupie u pacjentów z negatywnym wynikiem poszukiwania mutacji w trzech genach (LDLR, apo B, PCSK9), związanych z występowaniem FH i obliczono “gene score”.

Patogenne mutacje wykryto u około 44% pacjentów. Pacjenci z mutacją mieli istotnie wyższy poziom cholesterolu całkowitego niż pacjenci bez mutacji (10.5 ± 3.2 vs 9.5 ± 2.1 , $p=0.039$). Najczęstszą mutacją w badanej populacji była mutacja w genie *APOB* (p.Arg3527Gln), obecna u 8% pacjentów. 82% mutacji stanowiły mutacje w genie LDLR - wykryto 39 różnych mutacji, z czego 10 opisano jako nowe. Najczęściej występowały mutacje w egzonie 6, następnie w 7, 12 i w egzonie 3 genu receptora LDL. W badanej grupie zidentyfikowano 6 różnych znacznych rearanżacji genowych w genie receptora LDL (17% pacjentów). Najczęściej występowały mutacje typu „missense” genu LDLR - u 77% badanych.

U 1 pacjenta wykryto mutację w genie PCSK9, charakterystykę kliniczną i molekularną rodziny z obecnością mutacji w genie PCSK9 przedstawiono na Zjeździe EAS w Lyonie 2013.

Wśród pacjentów, u których nie wykryto mutacji, 84% miało “gene score” w trzech górnych kwartylach w porównaniu do grupy kontrolnej, co świadczy o poligenicznej przyczynie występującej u nich hipercholesterolemii.

W podsumowaniu stwierdzono:

- 1) wysoką heterogenność genetyczną FH w populacji Małopolski, oraz
- 2) stosunkowo wysoką częstość znacznych rearanżacji w genie receptora LDL
- 3) Wysoką częstość mutacji w genie apo B 100, co implikuje podejście do poszukiwania mutacji FH w badanej populacji.
- 4) Obliczenie współczynnika „gene score” dla oznaczenia występowania poligenowej przyczyny hipercholesterolemii w populacji takiej jak badana w niniejszym projekcie wydaje się również być bardzo istotne dla wyjaśnienia tła hipercholesterolemii.

W podsumowaniu najważniejsze wyniki i wnioski uzyskane w ramach przeprowadzonych badań projektu NCN i Juventus Plus składające się na Osiągnięcie to:

1. Określenie cech podłoża molekularnego RH w populacji Małopolski :

- a) Stwierdzenie wysokiej heterogenności genetycznej RH w populacji Małopolski,
- b) Stwierdzenie stosunkowo wysokiej częstości znacznych rearanżacji w genie receptora LDL
- c) Stwierdzenie wysokiej częstości mutacji w genie apo B 100

Wyniki te implikują podejście do poszukiwania mutacji FH w badanej populacji.

Obliczenie współczynnika „gene score” dla oznaczenia występowania poligenowej przyczyny hipercholesterolemii w populacji takiej jak badana w niniejszym projekcie wydaje się również być bardzo istotne dla wyjaśnienia tła hipercholesterolemii.

2. Opisanie nowej mutacji w genie receptora LDL u członków rodziny z populacji Małopolski, charakteryzującą się wysokim stężeniem LDL-C i obecnością przedwczesnej chns, która występowała ze stosunkowo wysoką częstością w badanej grupie chorych. Prawdopodobnie jest to związane z efektem założyciela.

3. Charakterystyka laboratoryjna i kliniczna pacjentów z RH i z obecnością blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych i podkreślenie związku pomiędzy lipoproteinami zawierającymi apo B 100 i lipoproteinami wysokiej gęstości a blaszkami. Ta obserwacja ma implikacje naukowe - sugeruje celowość dalszych badań lipoprotein HDL pod kątem funkcji lipoprotein HDL, szczególnie zwrotnego transportu cholesterolu. Wyniki tego badania mają znaczenie w prewencji choroby niedokrwiennej serca u osób z RH, poprzez podkreślenie roli lipoprotein zawierających apoB (nie-HDL), a także HDL-C w rozwoju miażdżycy w tej grupie osób.

4. Obserwacja, że czynniki ryzyka blaszek miażdżycowych są różne u mężczyzn i kobiet z RH, co ma istotne implikacje praktyczne w prewencji Chns w tej grupie chorych. Uzyskane wyniki sugerują celowość szerszego podejścia do leczenia osób z RH, szczególnie kobiet, poprzez próby kontroli HDL-C i ciśnienia tętniczego krwi. Odpowiedź, czy wpływ na te czynniki ryzyka będzie mieć korzystny wpływ na redukcję ryzyka s-n, przyniosą badania prospektywne. Wyniki tego badania sugerują dalsze kierunki badań: interesujące byłoby przebadanie mechanizmów wpływających

na różnice między czynnikami lipidowymi w zależności od płci – rola procesów epigenetycznych, czynników hormonalnych, czy rodzaju stosowanych statyn i czasu trwania leczenia.

Wyniki badań zostały przedstawione w postaci prezentacji na 15 konferencjach międzynarodowych i 4 krajowych.

Uzyskane wyniki przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat molekularnego podłoża hipercholesterolemii rodzinnej w populacji Małopolski.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć badawczych.

Tematyka pozostałych prac badawczych:

1. Rzadkie zaburzenia metabolizmu lipidów

Rodzinny niedobór LCAT – FLD (Familial lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency (FLD) jest rzadkim, genetycznie uwarunkowanym zaburzeniem metabolizmu lipidów, charakteryzującym się niskim stężeniem HDL-cholesterolu, białkomoczem, anemią hemolityczną i zmętnieniami rogówki. W ramach grantu NCN brałam udział jako wykonawca w opracowaniu danych biochemicznych pacjentów z FLD. Opisano nową mutację Val309Met w egzonie 6 genu LCAT u rodzeństwa (brat i siostra) z homozygotyczną postacią choroby. Przebadano także członków rodziny chorych. Pacjenci cechowali się bardzo niskim stężeniem cholesterolu całkowitego i HDL-cholesterolu, niskim odsetkiem estrów cholesterolu i niskim stężeniem apo A 1 w surowicy. Była to pierwsza opisana mutacja LCAT w populacji słowiańskiej (Atherosclerosis 2006).

Głównym problemem klinicznym u tych chorych jest białkomocz, prowadzący do przewlekłej niewydolności nerek. W kolejnym artykule opisano skuteczność długoterminowego leczenia białkomoczu u probanta, 31-letniej kobiety z FLD za pomocą metyloprednisolonu i blokerów układu renina-angiotensyna-aldosteron. Wyniki tego badania sugerowały rolę procesu zapalnego i dyslipidemii w patogenezie uszkodzenia kłębuszków u pacjentów z niedoborem LCAT (J Clin Exp Nephrol, 2011) Rzadkie mutacje w genach regulujących przemianę lipidowe pozwalają na pogłębienie naszej wiedzy na ten temat genetycznych uwarunkowań metabolizmu lipidów i ich roli w powikłaniach narządowych.

2. Badanie determinantów niealkoholowej choroby tłuszczeniowej wątroby u chorych z cukrzycą

Zagadnienie związku dyslipidemii z niealkoholową chorobą tłuszczeniową wątroby (NCSW) u pacjentów z cukrzycą typu 2 jest ważnym problemem klinicznym. Niealkoholowa choroba tłuszczeniowa wątroby występuje często – u około 80% chorych z cukrzycą typu 2. Wiąże się z zespołem oporności na insulinę i prowadzi do jej nasilenia. Jest także czynnikiem ryzyka powikłań naczyniowych w cukrzycy, szczególnie makroangiopatii. W grupie przebadanych chorych z cukrzycą typu 2 obserwowano związek NCSW z otyłością brzuszną i niskim stężeniem HDL-C. Tylko w grupie kobiet z cukrzycą obserwowano, że wzrost HDL zmniejsza ryzyko rozwoju NCSW. U chorych z NCSW obserwowano większe zapotrzebowanie na angioplastykę

naczyń wieńcowych niż u osób bez stłuszczenia (Med.Sci. Monitor 2013, Przeg. Lek 2014)

3. Badanie funkcji śródbłonna u chorych z cukrzycą typu 2 i nieinwazyjnych markerów miażdżycy oraz czynników sprzyjających rozwojowi angiopatii cukrzycowej.

Powikłania makronaczyniowe w cukrzycy wiążą się z zaburzeniami funkcji śródbłonna. Badanie wzajemnych powiązań pomiędzy obecnością powikłań makro i mikro-naczyniowych wykazało, że chorzy z retinopatią cukrzycową cechują się większą grubością intymy-medii (0.87 mm vs. 0.79 mm, $P = 0.0001$) i zaburzeniem funkcji śródbłonna w postaci upośledzonej funkcji rozkurczowej (flow mediated dilatation) (8.38% vs. 10.45%, $P = 0.0023$) niż chorzy bez retinopatii. Wyniki tego badania sugerują, że upośledzenie funkcji śródbłonna może być wspólnym podłożem patogenetycznym nie tylko dla miażdżycy, ale także powikłań mikronaczyniowych. (Europ. J. Clin. Invest. 2008).

Poznanie uwarunkowań genetycznych zaburzeń funkcji śródbłonna może mieć znaczenie poznawcze w rozwoju miażdżycy u chorych z cukrzycą typu 2. Badanie polimorfizmu genu GTP cyklohydrolazy 1, enzymu biorącego udział w regulacji syntezy tetrahydrobiopteryny, wykazało związek polimorfizmów Rs841 tego genu z dysfunkcją śródbłonna, a polimorfizmów Rs10483639, Rs841, Rs3783641 ze stresem oksydacyjnym i stężeniem czynnika von Willebranda. Badanie to potwierdza, że zmienność genetyczna genu GCH1 wiąże się z dysfunkcją śródbłonna i stresem oksydacyjnym u pacjentów z DM2, co może mieć znaczenie w regulacji funkcji śródbłonna. (PLoS One, 2014).

Podłoże retinopatii cukrzycowej w cukrzycy typu 2 nie jest dokładnie poznane. Jedną z potencjalnych czynników przyczyniających się do rozwoju tego zaburzenia może być powstawanie u pacjentów z cukrzycą gęstego skrzepu fibryny, opornego na lizę. U pacjentów z cukrzycą typu 2 z i bez retinopatii cukrzycowej badano współczynnik przepuszczalności (permeation coefficient) i podatność skrzepu na fibrylizę. Pacjenci z cukrzycą w wieloczynnikowej analizie logistycznej cechowali się niższą przepuszczalnością skrzepu i wolniejszą lizą skrzepu. Związek z retinopatią wykazywały także stężenie glukozy na czczo, czas trwania cukrzycy, leczenie insuliną i nie-stosowanie statyn, ale przepuszczalność skrzepu była istotnie związana z retinopatią nawet po wystandaryzowaniu na te zmienne. Związek przyczynowy powstawania skrzepu fibryny i upośledzonej lizy z retinopatią cukrzycową wymaga dalszych badań (Diab. Met 2012).

Stwierdzono także związek pomiędzy stężeniem asymetrycznej dimetyloargininy, a rozwojem retinopatii cukrzycowej (Diab. Care 2007).

Badanie czynników wpływających na podatność naczyń u chorych z cukrzycą typu 2 wykazało związek z wiekiem, stężeniem homocysteiny i kreatyniny (Przegł. Lek. 2005), a także współczynnikiem talia – biodra.

Osteoprotegeryna, glikoproteina z nadrodziny receptorów czynnika martwicy guza, wiąże się z zawartością tłuszczu w organizmie, a także PWV i NTpro-BNP, nieinwazyjnymi markerami sercowo-naczyniowymi u chorych z cukrzycą typu 2. Ta obserwacja wskazuje na nowy mechanizm związku osteoprotegeryny z tkanką tłuszczową i miażdżycą (Int J Card. 2011).

4. Prewencja chorób układu krążenia u osób z rodzinną hipercholesterolemią i badanie podłoża molekularnego były przedmiotem kilku publikacji, oprócz prac zaliczonych do osiągnięcia.

W publikacji poglądowej na temat rodzinnej hipercholesterolemii podkreślano, że jest ona rzadko rozpoznawana i nieadekwatnie leczona. W opiece nad chorymi z RH istotne znaczenie ma wczesne wykrywanie choroby - przebadanie krewnych chorego i wdrożenie odpowiedniego leczenia, tzw. skринing kaskadowy (Kardiol. Pol.2009). W świetle własnych doświadczeń w prowadzeniu chorych z RH wydaje się celowe zapewnienie rodzinom z RH kompleksowej opieki, poprzez stworzenie zespołów, w skład których wszedłby lipidolog, lekarz rodzinny, pediatra, dietetyk i psycholog.

Istotne znaczenie w prewencji powikłań sercowo-naczyniowych u osób z RH ma badanie nieinwazyjnych markerów zmian miażdżycowych - grubość błony wewnętrznej i środkowej tętnic szyjnych (IMT) i markerów sztywności naczyń - prędkość fali tętna u osób młodych, pozwalających na ocenę ryzyka sercowo-naczyniowego. U 36 młodych pacjentów w wieku poniżej < 35 lat z rozpoznaniem RH w oparciu o kryteria Simon Broome Register zbadano czynniki ryzyka pogrubienia kompleksu IMT i porównano je z grupą 49 krewnych bez RH, którzy stanowili grupę kontrolną. Badanie wykazało, że chorzy z RH cechowali się wyższymi wartościami IMT w porównaniu z krewnymi bez RH (0.60 ± 0.19 vs. 0.53 ± 0.07 mm, $p < 0.05$). U osób z RH częściej niż u kontroli obserwowano również występowanie blaszek miażdżycowych ($p=0.012$). Nadciśnienie tętnicze występowało u 27.8% pacjentów z RH i 16.3% osób z grupy kontrolnej. Obserwowano związek wartości ciśnienia tętniczego krwi z wiekiem oraz parametrami otyłości brzusznej. Sztywność naczyń, oceniana za pomocą pomiaru prędkości fali tętna pomiędzy tętnicą szyjną i udową korelowała z wiekiem i ciśnieniem tętniczym. Nie obserwowano natomiast związku IMT ze stężeniem badanych parametrów oceny lipidów, wartościami ciśnienia tętniczego krwi czy parametrami nadwagi. Wyniki tego badania wykazały większą częstość występowania nadciśnienia tętniczego w grupie chorych z RH niż bez tej choroby oraz jego istotny związek z wskaźnikami otyłości brzusznej i sztywnością naczyń. Na podstawie wyników tej pracy sugeruje się, że intensywne leczenie hipolipemiczne oraz terapia przeciwnadciśnieniowa i zmniejszenie otyłości brzusznej, składowych zespołu metabolicznego, są kluczową strategią w zapobieganiu miażdżycy i sztywności naczyń u młodych osób z RH. (Kard. Pol. 2013).

Dalsze badania genetyczne, w których uczestniczyłam we współpracy z UCL London, dotyczyły poligenowego dziedziczenia RH. Badanie w kierunku podłoża molekularnego hipercholesterolemii ukierunkowane na określenie optymalnej liczby SNPów na stężenie LDL-C wykazało, że punktacja w oparciu o 6 SNPów LDL-C była tak samo skuteczna, jak w oparciu o 12 SNPów. Meta-analiza oparta o polimorfizmy w genach CELSR2 (cadherin, EGF LAG 7-pass G-type receptor 2), APOB (apolipoproteina B), ABCG5/8 [ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5/8], genu receptora LDL i genu APO E wykazała w kohorcie osób z negatywnym wynikiem w kierunku badania mutacji wyższą punktację w porównaniu do populacji ogólnej. W konkluzji wyniki punktacji oparte o skalę 6 SNPów różnicują pacjentów z FH od populacji ogólnej i szacuje się, że u około 88% pacjentów bez wykrytej mutacji przyczyna hipercholesterolemii jest najprawdopodobniej poligenowa (Clin Chem. 2015).

5. Związek stężenia homocysteiny w surowicy ze stężeniem lipidów

Zwiększone stężenie homocysteiny oraz zwiększone stężenie CRP wiąże się ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym. U pacjentów z cukrzycą typu 2, u których ryzyko sercowo-naczyniowe jest wysokie, stwierdziliśmy związek pomiędzy homocysteiną a WHR i kreatyniną u mężczyzn oraz kreatyniną, HbA1c i LDL-C u kobiet. Stężenie CRP w surowicy korelowało z BMI, fibrynogenem i HDL-C u mężczyzn, natomiast u kobiet z BMI, WHR, parametrami wyrównania cukrzycy i LDL-C. Badanie powiązań pomiędzy stężeniem homocysteiny, CRP i wymienionymi parametrami wskazuje potencjalne możliwości modyfikacji ryzyka sercowo-naczyniowego przez wpływ na stężenie lipidów i masę ciała (Przeg. Lek. 2003).

Podwyższone stężenie homocysteiny jest czynnikiem ryzyka sercowo-naczyniowego, ale także powikłań u kobiet ciężarnych. W badaniu kobiet z cukrzycą ciężarnych stwierdzono, że stężenie homocysteiny koreluje ze stężeniem folianów i witaminy B12 w surowicy, natomiast u kobiet bez cukrzycy ze wskaźnikiem insulinooporności oraz wskaźnikiem funkcji nerek. Badania te wskazują ważną rolę witaminy B w regulacji stężenia homocysteiny u kobiet z cukrzycą ciężarnych (Arch Gynecol Obstet. 2008).

6. Badania podłoża genetycznego cukrzycy typu 2.

Cukrzyca typu 2 ma podłoże wielogenowe. Wariant aminokwasowy Pro12Ala genu PPARgamma2 wiąże się z cukrzycą typu 2 w wielu populacjach. Częstość polimorfizmu była podobna w badanej populacji jak i w innych kaukaskich populacjach. Jednak w naszym badaniu case-control nie potwierdziliśmy, że allel Pro wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju cukrzycy typu 2. Badanie to pogłębiło wiedzę na temat podłoża molekularnego cukrzycy typu 2 (Diabetes Res Clin Pract 2003).

Badanie częstości występowania mutacji C282Y i H63D, związanych z hemochromatozą w populacji osób z cukrzycą typu 2, wykazało wyższą częstość występowania genotypów wild/H63D i H63D/H63D wśród osób z cukrzycą typu 2 rozpoznaną > 49 roku życia i u mężczyzn, co sugeruje rolę tej mutacji w patogenezie cukrzycy o późnym początku i u mężczyzn w badanej populacji (Med Sci Monit. 2003).

7. Czynniki prozapalne, obecność cukrzycy a powikłania po przeszczepie nerki.

Badanie czynników sprzyjających odrzuceniu przeszczepu nerki lub niekorzystnego rokowania po przeszczepie jest ważnym problemem klinicznym. Badanie prognostycznej roli czynników: cytokin pro-zapalnych czy obecności cukrzycy wykazało, że cukrzyca nie odgrywała istotnej roli przy powrocie do dializy czy zgonie, natomiast pacjenci z takimi powikłaniami cechowali się wyższym stężeniem TNF-RII i IL-6. Badanie to wartość poznawczą i wskazuje rolę terapii przeciwzapalnej w zapobieganiu tym powikłaniom (Transplant Proc. 2016).

M. Nalus-Mioda