



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ**

**ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PCSK9 ΣΤΟΝ ΟΡΟ**

**ΜΕ ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΣΤΗ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ**

**ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΩΛΕΙΑ ΒΑΡΟΥΣ**

Μεταπτυχιακή διατριβή

**ΓΕΩΡΓΟΥΛΑ ΜΑΡΙΑ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ**

**ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΛΥΜΠΕΡΟΠΟΥΛΟΣ**

Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων

**ΜΩΥΣΗΣ ΕΛΙΣΑΦ**

Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΛΙΑΜΗΣ**

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Ιατρείο Μελέτης των Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων και Παχυσαρκίας της Β΄ Παθολογικής Παν/κής Κλινικής του ΠΓΝ Ιωαννίνων σε συνεργασία με το εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα, επίκουρο καθηγητή παθολογίας κ. Ευάγγελο Λυμπερόπουλο για την βοήθεια και την υπομονή του. Οι πολύτιμες υποδείξεις του, στο ερευνητικό και επιστημονικό πεδίο έκαναν δυνατή την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης. Η συνεργασία μας ήταν εξαιρετική τιμή για εμένα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Μωυσή Ελισάφ, Καθηγητή Παθολογίας, που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετέχω στον παρόν μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών. Η ανταπόκριση του σε οποιαδήποτε δυσκολία ήταν πάντα άμεση και αποτελεσματική.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας κ. Γεώργιο Λιάμη, μέλος της τριμελούς επιτροπής της μεταπτυχιακής διατριβής για την υποστήριξη και την βοήθεια που μου προσέφερε.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τον κ. Τέλη Κωνσταντίνο για τη σημαντική βοήθεια και για το χρόνο που μου αφιέρωσε ώστε να πραγματοποιηθεί σωστά το δύσκολο κομμάτι των πειραμάτων της μελέτης.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Θεοδόση Φιλιππάτο, Ειδικό Παθολόγο, για τη βοήθεια του σε πολλαπλά επίπεδα, κυρίως όμως τον

ευχαριστώ για την φιλία του. Η συμβολή του στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής ήταν καθοριστική.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, το σύζυγό μου και τα παιδιά μου για την ανοχή, την υπομονή, την αμέριστη συμπαράσταση και ηθική υποστήριξη.

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....</b>	<b>7</b>
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....</b>	<b>8</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>9</b>
1.1 Ο ρόλος της παχυσαρκίας και της απώλειας σωματικού βάρους στον καρδιαγγειακό κίνδυνο .....	12
1.2 Η επίδραση της μεσογειακής διατροφής στον καρδιαγγειακό κίνδυνο... .	13
1.3 Η πρωτεΐνη proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9).....	18
1.3.1 Η δομή και η δράση της PCSK9 .....	19
1.3.2 Τα επίπεδα της PCSK9 στο πλάσμα .....	22
1.3.3 Επίδραση της θεραπείας με στατίνες στα επίπεδα της PCSK9 .....	25
1.3.4 Αναστολείς της PCSK9 και φάρμακα .....	26
1.3.5 Η προγνωστική αξία των επιπέδων της PCSK9 για τα καρδιαγγειακά συμβάματα.....	29
1.4 Διατροφή και PCSK9.....	30
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>33</b>
<b>3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....</b>	<b>33</b>
3.1 Σχεδιασμός της μελέτης .....	33
3.2 Βιοηθική.....	33
<b>4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>33</b>
4.1 Προσκόλληση στην Μεσογειακή Διατροφή .....	33
4.1.1 Πληθυσμός της μελέτης .....	34
4.1.2 Μέτρηση ανθρωπομετρικών παραμέτρων .....	36
4.1.3 Αναλυτικές μέθοδοι .....	36

4.1.4 Υπολογισμός του βαθμού προσκόλλησης στην Μεσογειακή Διατροφή .....	38
4.2 Διερεύνηση των επιπέδων της PCSK9 στον ορό .....	41
4.2.1 Προσδιορισμός επιπέδων PCSK9 – Αναλυτική περιγραφή .....	43
4.3 Στατιστική ανάλυση .....	55
<b>5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>57</b>
5.1 Εκτίμηση των επιπέδων της PCSK9 σε υπέρβαρους και παχύσαρκους ασθενείς .....	57
5.1.1 Χαρακτηριστικά του πληθυσμού-Σύγκριση παχύσαρκων και ομάδας ελέγχου .....	57
5.1.2 PCSK9 και Δείκτης MedDiet score .....	60
5.1.3 Επιδράσεις της υποθερμιδικής δίαιτας .....	61
<b>6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>65</b>
<b>ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ .....</b>	<b>69</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>.69</b>
<b>ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ .....</b>	<b>71</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>74</b>

# ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

**Γράφημα 1.** Κύριες αιτίες θανάτου σε παγκόσμιο επίπεδο. Πηγή: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας.

**Γράφημα 2.** Η σύγχρονη πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής. Πηγή: [www.mediterradiet.org](http://www.mediterradiet.org).

**Γράφημα 3.** Ο ρόλος της πρωτεΐνης PCSK9: η παρουσία της ευνοεί την αποδόμηση του LDL υποδοχέα

**Γράφημα 4.** Η λειτουργία και οι ιδιότητες της PCSK9

**Γράφημα 5.** Μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου της PCSK9 (LOF) και μεταλλάξεις που οδηγούν στην αύξηση της λειτουργίας του γονιδίου της PCSK9 (GOF)

**Γράφημα 6.** Μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου της PCSK9 (LOF) οδηγούν σε σημαντικά χαμηλότερα δια βίου επίπεδα LDL-C. Αντίθετα, μεταλλάξεις που οδηγούν στην αύξηση της λειτουργίας του γονιδίου της PCSK9 (GOF) οδηγούν σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα LDL-C

**Γράφημα 7.** Μηχανισμός δράσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων (monoclonal antibodies, mAb) έναντι της proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9).

**Γράφημα 8.** Η παρουσία μονοκλωνικού αντισώματος που δεσμεύει την πρωτεΐνη PCSK9 ευνοεί την ανακύκλωση των LDL υποδοχέων, με αποτέλεσμα την αύξησή τους στην επιφάνεια του ηπατοκυττάρου και μείωση της LDL χοληστερόλης του πλάσματος.

**Γράφημα 9.** Ο δείκτης Μεσογειακής Διατροφής MedDiet Score.

**Γράφημα 10.** Μεταβολές των επιπέδων της proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) κατά την 3μηνια απώλεια βάρους.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<b>LDL</b>	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
<b>HDL</b>	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
<b>PCSK9</b>	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
<b>CHD</b>	Στεφανιαία νόσος
<b>ApoB</b>	Απολιποπρωτεΐνη Β
<b>ApoE</b>	Απολιποπρωτεΐνη Ε
<b>LDLR</b>	LDL υποδοχείς
<b>GOF</b>	Gain-of-function mutations
<b>LOF</b>	Loss-of-function mutations
<b>SREBPs</b>	Sterol regulatory element-binding protein
<b>ARIC</b>	Atherosclerosis Risk in Communities
<b>mAbs</b>	Μονοκλωνικά αντισώματα
<b>ΔΜΣ</b>	Δείκτης μάζας σώματος
<b>MedDiet</b>	Μεσογειακή διατροφή
<b>ΣΒ</b>	Σωματικό βάρος
<b>VLDL</b>	Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας
<b>TC</b>	Ολική χοληστερόλη
<b>TGs</b>	Τριγλυκερίδια
<b>HOMA</b>	Homeostasis model assessment of insulin resistance

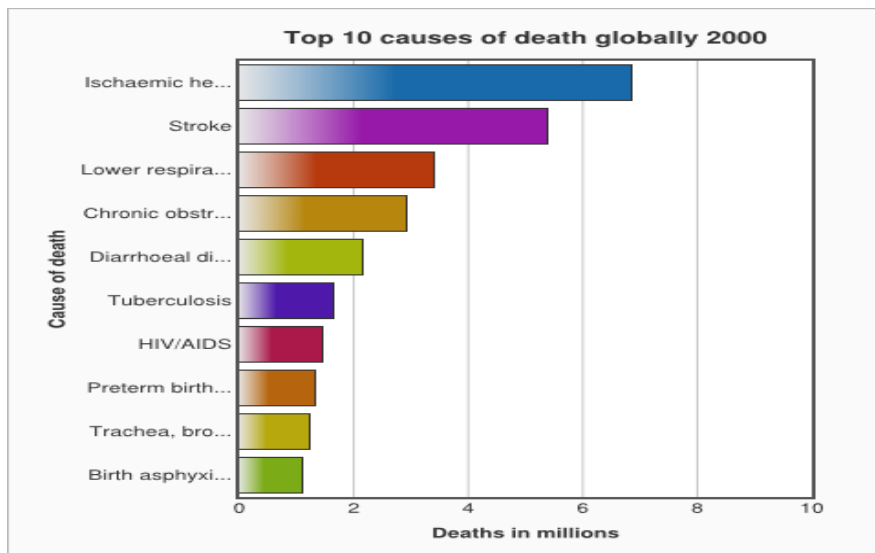
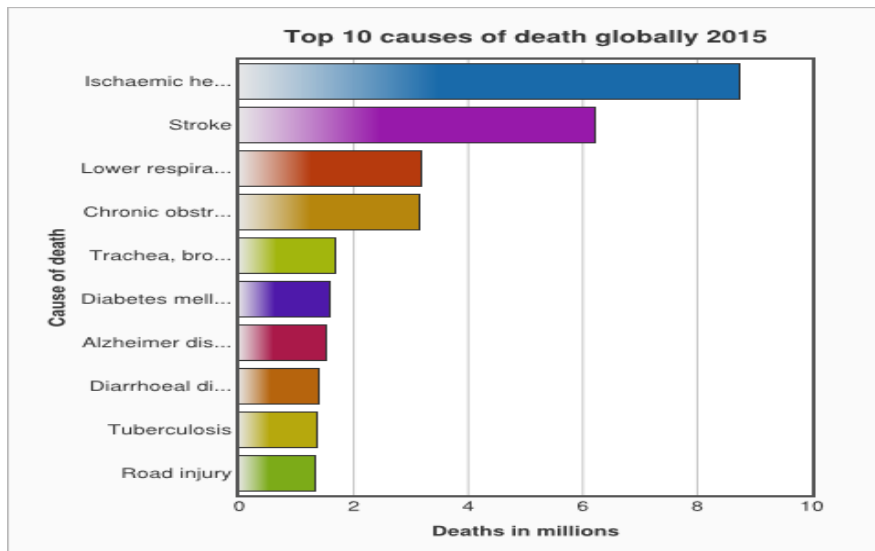


# 1. Εισαγωγή

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν παγκοσμίως την κύρια αιτία θανάτου (Γράφημα 1). Ανάμεσα στους διάφορους παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την εμφάνισή τους, κύρια θέση καταλαμβάνει η υπερχοληστερολαιμία. Τα αυξημένα επίπεδα της χοληστερόλης των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL) του πλάσματος είναι ένας ισχυρός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων και η μείωσή τους αποτελεί βασικό άξονα της στρατηγικής πρόληψης<sup>1</sup>. Μέχρι σήμερα το σημαντικότερο όπλο στην αντιμετώπιση της υπερλιπιδαιμίας είναι οι στατίνες, φάρμακα με εντυπωσιακά αποτελέσματα στη μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων<sup>2</sup>. Ωστόσο, υπάρχουν ασθενείς που δεν μπορούν να ανεχτούν τις στατίνες εξαιτίας ανεπιθύμητων ενεργειών από το μυϊκό σύστημα<sup>3,4,5</sup>. Επιπρόσθετα, οι τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες συνιστούν τη μείωση της LDL χοληστερόλης σε ασθενείς πολύ υψηλού κινδύνου σε επίπεδα <70 mg/dL<sup>6</sup>. Στους ασθενείς αυτούς ο στόχος για την LDL χοληστερόλη σε μεγάλο ποσοστό δεν επιτυγχάνεται με τις στατίνες<sup>7,8</sup>. Επιπρόσθετα, στους ασθενείς με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία η θεραπεία με τις πλέον ισχυρές στατίνες (στατίνες που προκαλούν  $\geq 50\%$  μείωση της LDL χοληστερόλης, όπως η ατορβαστατίνη σε δόση 40 έως 80 mg ημερησίως ή η ροσουβαστατίνη σε δόση 20 ή 40 mg ημερησίως) με ή χωρίς εξετιμίμπη δεν επαρκούν για την επίτευξη του στόχου της LDL χοληστερόλης<sup>8</sup>. Τέλος, σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη ή μεταβολικό σύνδρομο η χορήγηση στατινών δεν μπορεί να τροποποιήσει πλήρως τον υπολειπόμενο καρδιαγγειακό κίνδυνο που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην αθηρωγόνο δυσλιπιδαιμία [υψηλά

επίπεδα τριγλυκεριδίων, μικρά πυκνά αθηρογόνα LDLσωματίδια και χαμηλά επίπεδα υψηλής περιεκτικότητας λιποπρωτεϊνών (HDL) χοληστερόλης]<sup>9</sup>.

Επομένως, είναι αναγκαία η εύρεση επιπρόσθετων τρόπων μείωσης της LDL χοληστερόλης και του καρδιαγγειακού κινδύνου. Τα τελευταία χρόνια συζητείται ιδιαίτερα η επίδραση διατροφικών προτύπων, όπως η μεσογειακή διατροφή, στον καρδιαγγειακό κίνδυνο<sup>10</sup>. Επιπρόσθετα, γίνεται ιδιαίτερη συζήτηση για το ρόλο μίας πρωτεΐνης, της PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9), στο μεταβολισμό των λιπιδίων και τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, ενώ φάρμακα που αναστέλλουν αυτήν την πρωτεΐνη έχουν ήδη εγκριθεί για τη θεραπεία της υπερχοληστερολαιμίας<sup>11</sup>.



**Γράφημα 1.** Κύριες αιτίες θανάτου σε παγκόσμιο επίπεδο. Πηγή: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας.

## **1.1 Ο ρόλος της παχυσαρκίας και της απώλειας σωματικού βάρους στον καρδιαγγειακό κίνδυνο**

Η σχέση της μεσογειακής διατροφής με την παχυσαρκία είναι ένα θέμα που συζητείται εκτενώς και απασχολεί την επιστημονική κοινότητα. Η παχυσαρκία εκθέτει το άτομο σε έναν αριθμό καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου που περιλαμβάνουν την υπέρταση, την υπερχοληστερολαιμία και τη διαταραχή στην ανοχή στη γλυκόζη<sup>12</sup>. Προοπτικές μελέτες μεγάλης διάρκειας έδειξαν ότι η παχυσαρκία αποτελεί ένα σημαντικό και ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα<sup>13</sup>. Η μελέτη Framingham Heart Study κατέταξε το βάρος του σώματος ως τον τρίτο πιο σημαντικό παράγοντα για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου (CHD) στους άνδρες, μετά την ηλικία και τη δυσλιπιδαιμία<sup>13</sup>. Τα παχύσαρκα άτομα εμφανίζουν συχνά αθηρωγόνο δυσλιπιδαιμία, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένα τριγλυκερίδια, ελαττωμένη συγκέντρωση HDL χοληστερόλης και αυξημένα τα επίπεδα μικρών πυκνών LDL σωματιδίων και αποπρωτεΐνης Β (apoB). Αυτό το μεταβολικό προφίλ εμφανίζεται συχνά στα παχύσαρκα άτομα με αυξημένη ενδοκοιλιακή συσσώρευση λίπους και συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο<sup>14</sup>.

Είναι φανερό ότι η αποτελεσματική μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης και η αντιμετώπιση του καρδιαγγειακού κινδύνου απαιτεί τόσο την αναζήτηση νέων φαρμάκων, όσο και την αλλαγή του τρόπου ζωής και κυρίως της διατροφής, αλλά και τον έλεγχο του σωματικού βάρους.

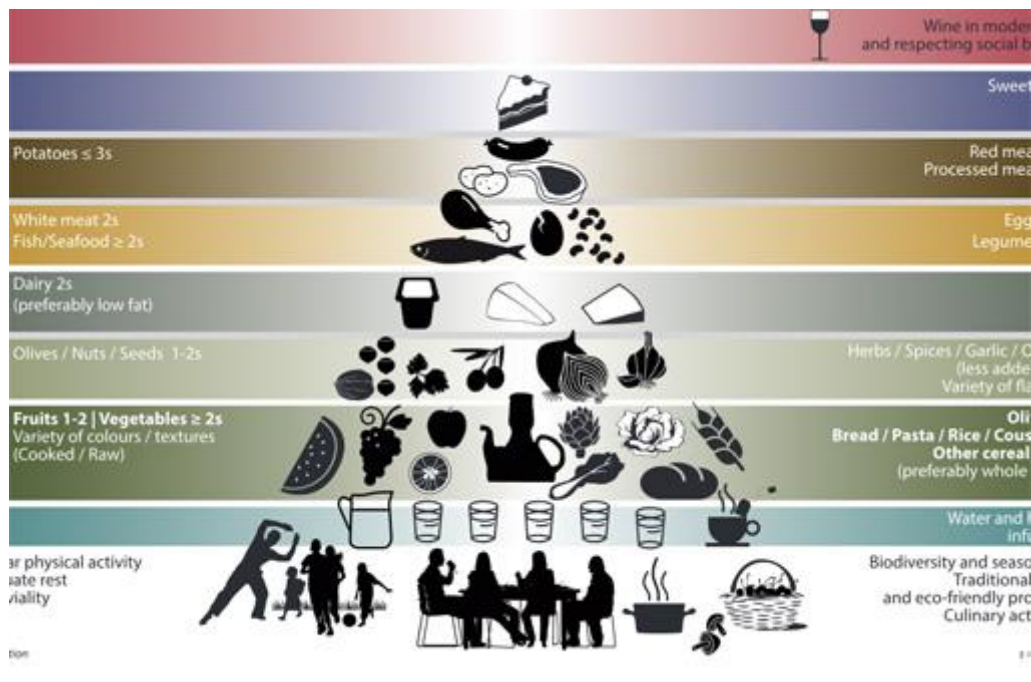
## **1.2 Η επίδραση της μεσογειακής διατροφής στον καρδιαγγειακό κίνδυνο**

Το 2010, η UNESCO συμπεριέλαβε τη Μεσογειακή Διατροφή στον Κατάλογο της Άυλης Πολιτιστικής Κληρονομιάς της Ανθρωπότητας, ύστερα από αίτημα που υπέβαλαν από κοινού οι χώρες Ιταλία, Ελλάδα, Ισπανία και Μαρόκο<sup>15</sup>.

Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί ο προστατευτικός ρόλος της μεσογειακής διατροφής σε διάφορες παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος, σε μεταβολικά νοσήματα και σε διάφορα είδη καρκίνου<sup>16</sup>. Η κατανάλωση οσπρίων, φρέσκων λαχανικών και φρούτων, η μερική αντικατάσταση του κρέατος από φρέσκα ψάρια, η προτίμηση σε λευκό τυρί και η ημερήσια κατανάλωση ελαιολάδου συνιστούν ένα διατροφικό τύπο που χαρακτηρίζει τις μεσογειακές χώρες<sup>16</sup>.

Η παραδοσιακή Μεσογειακή διατροφή έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά (Γράφημα 2):

- Άφθονες φυτικές ίνες (φρούτα, λαχανικά, ψωμί/δημητριακά, πατάτες, όσπρια, καρποί)
- Ελάχιστα επεξεργασμένα προϊόντα
- Γαλακτοκομικά προϊόντα (κυρίως τυρί, γιαούρτι)
- Ψάρια και πουλερικά σε μικρές έως μέτριες ποσότητες
- Κόκκινο κρέας σε μικρές ποσότητες
- Ελαιόλαδο ως κύρια πηγή λιπαρών που περιέχουν μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
- Μέτρια ποσότητα κρασιού



**Γράφημα 2.** Η σύγχρονη πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής. Πηγή: [www.mediterradiet.org](http://www.mediterradiet.org).

Μια από τις πρώτες μελέτες που ανέδειξε τον πιθανό ευεργετικό ρόλο της μεσογειακής διατροφής στον καρδιαγγειακό κίνδυνο ήταν η μελέτη των **Επτά Χωρών** των Keys et al<sup>17</sup>. Στις αρχές της δεκαετίας του 1960 μελετήθηκαν πληθυσμοί 7 χωρών (Ιταλία, Ελλάδα, Γιουγκοσλαβία, Ολλανδία, Φιλανδία, ΗΠΑ και Ιαπωνία) με σκοπό την εκτίμηση της επίπτωσης της στεφανιαίας νόσου. Η νότια Ευρώπη είχε εξαιρετικά χαμηλή συχνότητα εμφάνισης της νόσου. Μάλιστα, από όλους τους υπό μελέτη πληθυσμούς, η Κρήτη εμφάνιζε τη μικρότερη ολική θνητότητα. Ωστόσο, η σημαντικά χαμηλότερη επίπτωση στεφανιαίας νόσου στον Κρητικό πληθυσμό δεν συσχετιζόταν με τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, καθώς οι μέσες τιμές δεν διέφεραν σημαντικά σε σύγκριση με τους άλλους μεσογειακούς πληθυσμούς<sup>17</sup>. Η κρητική διαίτα, η οποία είναι πλούσια σε φρέσκα φρούτα και λαχανικά, ψάρια και κρασί, ιδίως

κόκκινο, χαμηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένο λίπος και χαρακτηρίζεται από καθημερινή χρήση ελαιολάδου συσχετίζεται με σημαντική μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου<sup>18</sup>. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι μία διατροφή πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το ολεϊκό οξύ, που υπάρχει σε αφθονία στο ελαιόλαδο, και χαμηλή σε κορεσμένα λίπη είναι ιδανική για την ελάττωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Η μεσογειακή διατροφή έχει και άλλες καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες, κυρίως εξαιτίας της υψηλής κατανάλωσης δημητριακών, φρούτων και λαχανικών, τα οποία περιέχουν μεταξύ άλλων αντιοξειδωτικές βιταμίνες και πολυφαινόλες <sup>19</sup>.

Το 2001-2002, μια ελληνική μελέτη (**CARDIO2000**) αποτίμησε το ρόλο της μεσογειακής διατροφής στο συνολικό στεφανιαίο κίνδυνο<sup>20</sup>. Στη μελέτη αυτή, που ήταν πανελλαδική και περιέλαβε 848 ασθενείς με πρώτη εκδήλωση στεφανιαίας νόσου και 1078 μάρτυρες βρέθηκε ότι 509 (59%) από τους ασθενείς και 696 (74%) από τους μάρτυρες ακολουθούσαν ένα διατροφικό πρότυπο το οποίο ήταν πλησιέστερα στη μεσογειακή διαίτα. Η ανάλυση κατά γεωγραφική περιοχή προέλευσης έδειξε ότι τόσο οι ασθενείς, όσο και οι μάρτυρες που προέρχονταν από αγροτικές περιοχές ήταν πιο κοντά στο μεσογειακό πρότυπο διατροφής σε σύγκριση με τους ασθενείς και μάρτυρες από τις ημιαστικές ή αστικές περιοχές. Παρατηρήθηκε μη σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο φύλων όσον αφορά την υιοθέτηση της μεσογειακής διατροφής. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ της προσήλωσης ή όχι στο μεσογειακό τύπο διατροφής και του δηλωθέντος ετήσιου οικογενειακού εισοδήματος, καθώς επίσης και του μορφωτικού επιπέδου. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της υιοθέτησης μεσογειακής διαίτας και

καπνιστικών συνηθειών, τόσο μεταξύ των ασθενών όσο και μεταξύ των μαρτύρων της μελέτης<sup>21</sup>.

Όπως φάνηκε από την ανάλυση των δεδομένων της μελέτης, τα άτομα που υιοθετούσαν την παραδοσιακή μεσογειακή διατροφή:

- Ήταν μεγαλύτερης ηλικίας από τα υπόλοιπα (τόσο στο δείγμα των ασθενών όσο και στο δείγμα των μαρτύρων), γεγονός που σημαίνει ότι τα νεότερα άτομα απομακρύνονται από τη διατροφή των προγόνων τους
- Παρουσίαζαν σε μικρότερο ποσοστό (τόσο στο δείγμα των ασθενών, όσο και στο δείγμα των μαρτύρων) κλασικούς παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου όπως:
  - Υπερχοληστερολαιμία
  - Υπέρταση
  - Σακχαρώδη διαβήτη
- Ήταν λιγότερο πιθανό να ακολουθούν καθιστική ζωή, ενώ είχαν και μικρότερο δείκτη μάζας σώματος.

Η υιοθέτηση της μεσογειακής διατροφής βρέθηκε να συνδέεται με μείωση του στεφανιαίου κινδύνου έως και 20%, αφού ελήφθησαν υπόψη οι κλασικοί παράγοντες κινδύνου. Επιπρόσθετα, η υιοθέτηση της μεσογειακής διαίτας σε συνδυασμό με φυσική άσκηση (τουλάχιστον μια φορά την εβδομάδα) φαίνεται να σχετίζεται με ακόμα σημαντικότερη μείωση του στεφανιαίου κινδύνου<sup>22</sup>. Αξίζει να σημειωθεί ότι όσοι από τους ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία ελάμβαναν στατίνες και ακολουθούσαν τη μεσογειακή διαίτα είχαν 43% λιγότερο κίνδυνο σε σύγκριση με εκείνους



που δεν ελάμβαναν στατίνες και δεν ακολουθούσαν διαιτητικές συνήθειες με βάση τις αρχές της παραδοσιακής διατροφής.

Τα ευρήματα από τη Lyon Diet Heart Study υποδεικνύουν τα δυνητικά οφέλη του μεσογειακού τύπου διατροφής σε σύγκριση με άλλες δίαιτες. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι τα άτομα που ακολουθούσαν μεσογειακού τύπου δίαιτα είχαν 50-70% μικρότερο κίνδυνο επανεμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου σε σύγκριση με τα άτομα που ακολουθούσαν δίαιτα παρόμοια με την προτεινόμενη από την Αμερικανική Καρδιολογική εταιρεία<sup>23</sup>. Ωστόσο, η Ελληνικού τύπου μεσογειακή δίαιτα είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένο λίπος, υψηλή σε μονοακόρεστο λίπος, κυρίως από ελαιόλαδο, υψηλή σε σύνθετους υδατάνθρακες, οι οποίοι προσλαμβάνονται από τα όσπρια, καθώς επίσης και ινών από λαχανικά και φρούτα. Το ολικό λίπος μπορεί να είναι υψηλό (40% της ολικά προσλαμβανόμενης ενέργειας), έχει ωστόσο λόγο μονοακόρεστων/κορεσμένων ίσο με 2. Παράλληλα, το καθημερινό τραπέζι των Ελλήνων περιλαμβάνει σημαντικές ποσότητες από ψωμί, ζυμαρικά, όσπρια και λαχανικά, μαγειρεμένα φαγητά, σούπες αλλά και σαλάτες πλούσιες σε ελαιόλαδο. Η πρόσληψη του γάλακτος είναι χαμηλή, αλλά η κατανάλωση τυριού φέτας και γιαουρτιού είναι υψηλή. Επίσης, καταναλώνεται συχνότερα ψάρι σε σύγκριση με κρέας. Τέλος, το κρασί καταναλώνεται σε μέτρια ποσότητα και συνοδεύει σχεδόν κάθε γεύμα.

Σύμφωνα με αρκετούς ερευνητές, τα παραπάνω στοιχεία της διαίτας είναι υπεύθυνα για τον ευεργετικό της ρόλο στην ανθρώπινη υγεία και ειδικότερα στην αθηροσκληρωτική διαδικασία<sup>24</sup>. Όπως διαπιστώθηκε από τη μελέτη CARDIO2000, υπάρχει σαφέστατη σχέση του μεσογειακού τύπου

δίαιτας με χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης παραγόντων κινδύνου για στεφανιαίο νόσο<sup>21</sup>. Αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να εξηγήσει τη σχέση μεταξύ μεσογειακής δίαιτας και καρδιοπροστασίας. Όταν λαμβάνει κανείς υπόψη όλους τους καθιερωμένους παράγοντες στεφανιαίου κινδύνου, καθώς και πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες τότε τα άτομα που ακολουθούν μεσογειακού τύπου δίαιτα εξακολουθούν να έχουν μικρότερο σχετικό κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίου συνδρόμου<sup>21</sup>.

Με βάση τα παραπάνω ευρήματα από κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες, η επιστημονική κοινότητα έχει αναγνωρίσει το σημαντικό ρόλο της Μεσογειακής Διατροφής, τόσο στην πρωτογενή όσο και στη δευτερογενή πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου.<sup>25,26</sup>

### **1.3 Η πρωτεΐνη proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)**

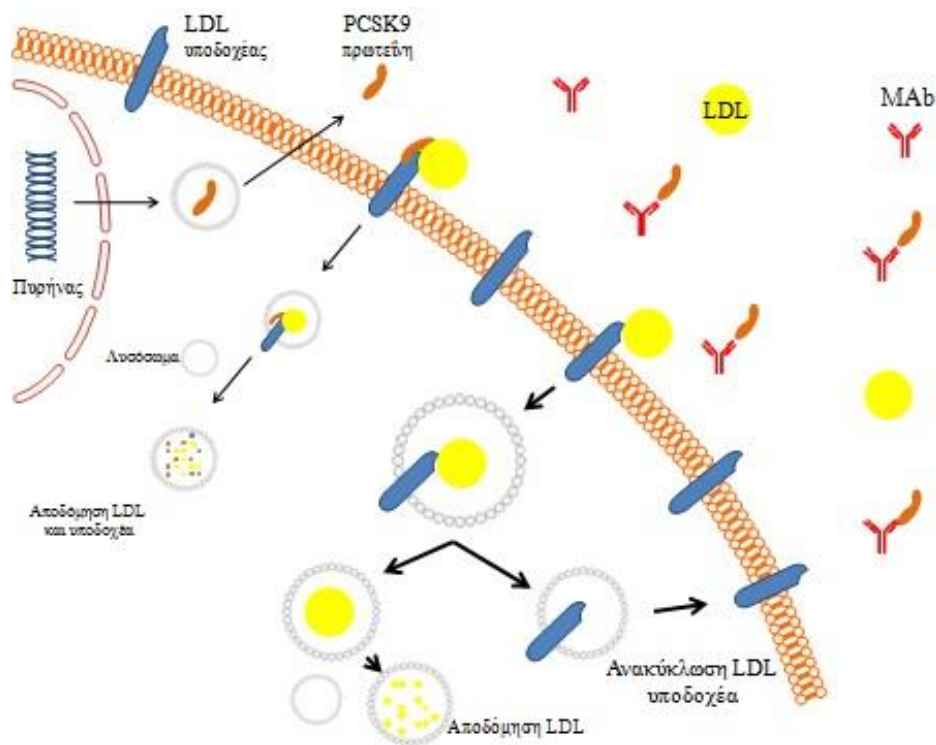
Τα LDL σωματίδια μεταβολίζονται διαμέσου των LDL υποδοχέων, οι οποίοι υπάρχουν στα ηπατοκύτταρα και αναγνωρίζουν την αποπρωτεΐνη Β 100, δηλαδή την πρωτεΐνη που υπάρχει στην επιφάνεια των LDL<sup>27</sup>. Ο αριθμός και η δραστηριότητα των LDL υποδοχέων είναι καθοριστικής σημασίας για τη ρύθμιση της συγκέντρωσης των LDL σωματιδίων στο πλάσμα και εξαρτώνται από τα επίπεδα της ελεύθερης χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα. Γενετικές μεταλλάξεις μειώνουν τη δραστηριότητα των LDL υποδοχέων και ευθύνονται για την εμφάνιση της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας<sup>27</sup>. Το 2003, οι Abifadel et al περιέγραψαν τις μεταλλάξεις ενός γονιδίου που συνθέτει μια πρωτεΐνη και το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1p32<sup>28,29</sup>. Αυτή η παρατήρηση προέκυψε ύστερα

από τη μελέτη μιας οικογένειας στη Γαλλία με το φαινότυπο της αυτοσωματικής επικρατούσας υπερχοληστερολαιμίας στην οποία αποκλείσθηκαν μεταλλάξεις των γονιδίων του LDL υποδοχέα και της ApoB<sup>28</sup>. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου αυτής της πρωτεΐνης που συσχετίζονται με αύξηση της λειτουργικότητάς της εκδηλώνονται φαινοτυπικά ως ετερόζυγος οικογενής υπερχοληστερολαιμία<sup>29</sup>. Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε PCSK9.

### **1.3.1 Η δομή και η δράση της PCSK9**

Η PCSK9 είναι το ένατο μέλος της οικογένειας των proprotein convertases. Οι proprotein convertases είναι πρωτεάσες, οι οποίες έχουν ως κύρια αποστολή την πρωτεολυτική διάσπαση πρόδρομων και ανενεργών πρωτεϊνικών μορίων σε ενεργή μόρια. Τα 8 πρώτα μέλη της οικογένειας αυτής (PC1, PC2, furin, PC4, PC5, PACE4, PC7 και subtilisin kexin isoenzyme-1) δρουν ως πρωτεάσες σε παράγοντες ανάπτυξης, προσκολλητικά μόρια, ορμόνες και υποδοχείς. Σε αντίθεση με αυτές τις πρωτεάσες, η κύρια αποστολή της PCSK9 είναι η ενίσχυση της αποδόμησης με μη ενζυμικό τρόπο στα λυσοσώματα των LDL υποδοχέων<sup>30</sup>. Το παράδοξο είναι ότι το μόνο γνωστό υπόστρωμα της πρωτεολυτικής κατάλυσης που ασκεί η PCSK9 είναι ο ίδιος της ο εαυτός<sup>31</sup>.

Η PCSK9 παράγεται από τα ηπατοκύτταρα, τους νεφρούς, τα μεσεγχυματικά κύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα του ειλεού και του παχέος εντέρου. Αρχικά συντίθεται μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο ως ζυμογόνο, το οποίο αποτελείται από 692 αμινοξέα<sup>31</sup>.



**Γράφημα 3.** Ο ρόλος της πρωτεΐνης PCSK9: η παρουσία της ευνοεί την αποδόμηση του LDL υποδοχέα.

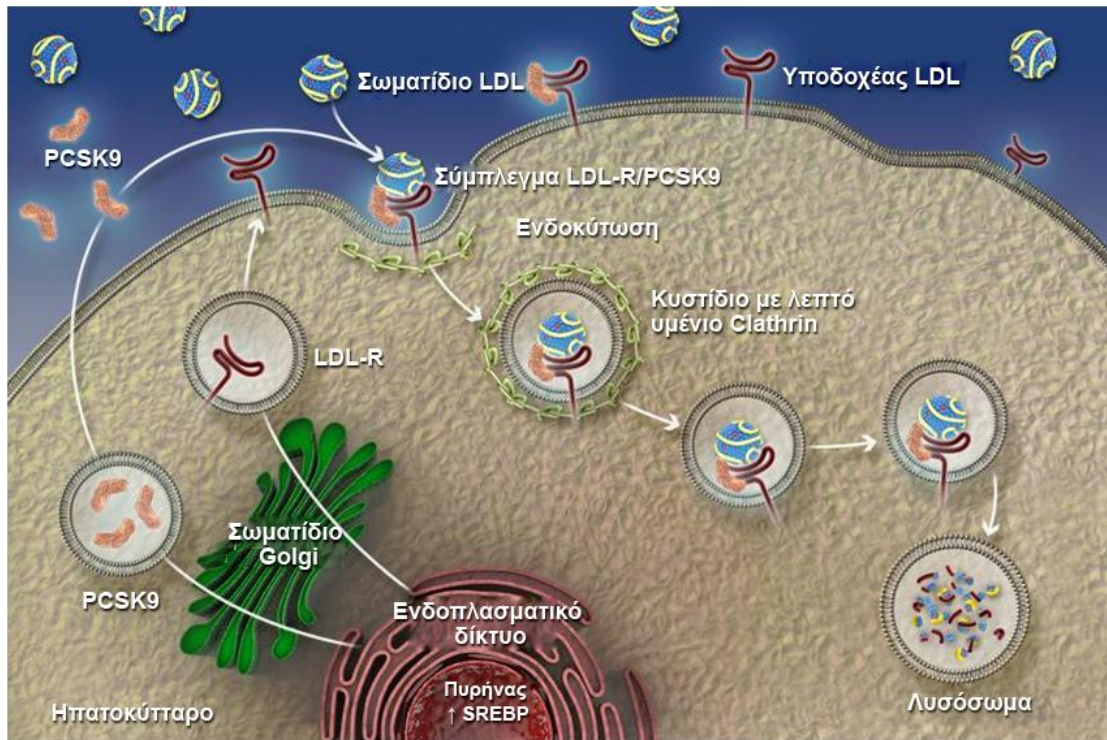
Η PCSK9 εκκρίνεται στην κυκλοφορία σε δυο μορφές: την ώριμη και την άωρη μορφή. Ειδικότερα η άωρη μορφή της PCSK9 (55kDa) αποτελείται από 4 μονάδες: signal peptide (91-30 αμινοξέα), prodomain (31-152 αμινοξέα), catalytic domain (153-452 αμινοξέα) και το πλούσιο σε κυστεΐνη και ιστιδίνη C-terminal domain (CHRD, 453-692 αμινοξέα)<sup>30</sup>. Αρχικά το signal peptide αποσπάται και ακολούθως η PCSK9 αυτοκαταλύεται στη θέση FAQ<sub>152</sub> SIP με αποτέλεσμα να αποδεσμεύεται η «ώριμη» μορφή της PCSK9 που αποτελείται από το catalytic domain και το CHRD (~62 kDa). Αυτή η μορφή της PCSK9 στερείται πρωτεολυτικής ικανότητας γιατί το prodomain καλύπτει γρήγορα το καταλυτικό της τμήμα. Αυτό το βήμα είναι αναγκαίο για την έξοδο της PCSK9 από το ενδοπλασματικό δίκτυο<sup>30</sup>.

Υπάρχουν δυο οδοί διαμέσου των οποίων η PCSK9 επηρεάζει τη δραστηριότητα των LDL υποδοχέων:

1. Η εξωκυττάρια οδός όπου η PCSK9 εκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα, συνδέεται με τους LDL υποδοχείς (LDLR), το σύμπλεγμα PCSK9-LDLR εισέρχεται στα ηπατοκύτταρα με αποτέλεσμα την αποδόμηση των LDLR και

2. Η ενδοκυττάρια οδός, όπου η PCSK9 μαζί με τον LDLR εισέρχονται στα λυσοσώματα με αποτέλεσμα την αποδόμηση των LDLR<sup>32</sup>. Η ύπαρξη της PCSK9 και η λειτουργία της εντάσσεται σε ένα μηχανισμό παλίνδρομης αρνητικής ρύθμισης. Ο LDLR συνδέεται με ένα LDL σωματίδιο, το συνοδεύει ενδοκυττάρια, όπου το LDL σωματίδιο αποδομείται και παρέχει την ενδοκυττάρια χοληστερόλη που είναι χρήσιμη για τη σύνθεση των κυτταρικών μεμβρανών, την παραγωγή των ορμονών των επινεφριδίων και των γονάδων, καθώς και τη σύνθεση της χολής από το ήπαρ, ενώ ο LDLR ανακυκλώνεται στην επιφάνεια του κυττάρου (Γράφημα 4). Αυτή η διαδικασία συμβαίνει περίπου 150 φορές για κάθε LDLR και στη συνέχεια ο υποδοχέας αποδομείται με τη βοήθεια της PCSK9<sup>32</sup>. Εάν δεν υπήρχε αυτή η πρωτεΐνη τα ηπατοκύτταρα θα είχαν τη δυνατότητα να απομακρύνουν σχεδόν όλα τα LDL σωματίδια με αποτέλεσμα την απουσία τους από την κυκλοφορία. Η απουσία ωστόσο των LDL σωματιδίων δεν είναι επιθυμητή γιατί η χοληστερόλη σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι χρήσιμη στον οργανισμό και η πλήρης έλλειψη της δεν είναι συμβατή με τη ζωή (όπως φαίνεται από γενετικά νοσήματα, όπως η οικογενής αβηταλιποπρωτεΐναιμία)<sup>32</sup>.

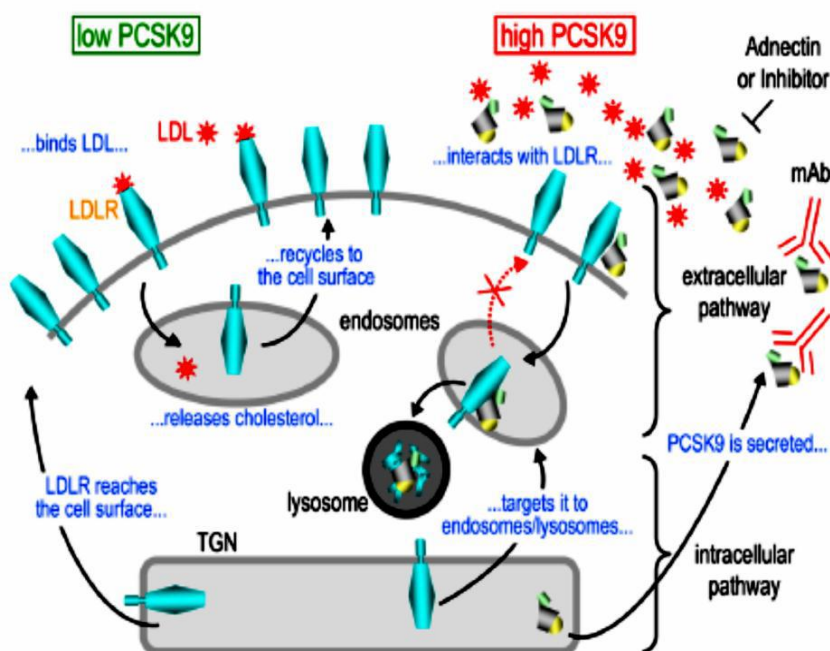
**Γράφημα 4.** Η λειτουργία και οι ιδιότητες της PCSK9.



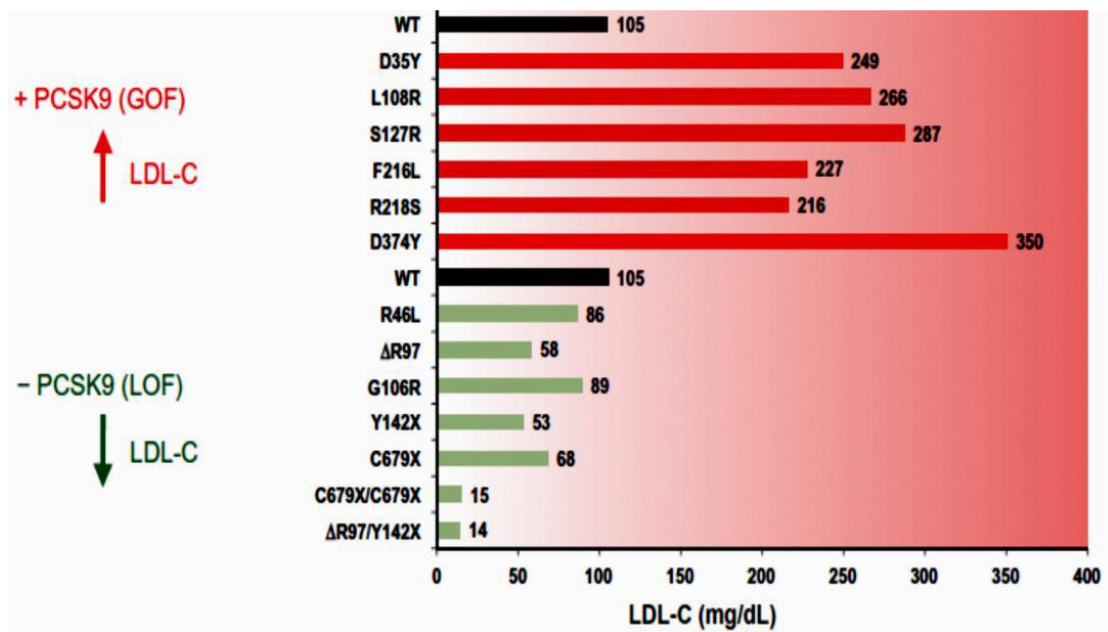
### 1.3.2 Τα επίπεδα της PCSK9 στο πλάσμα

Τα επίπεδα της PCSK9 στο πλάσμα παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση και σε υγιή άτομα κυμαίνονται μεταξύ 33 και 2988 ng/mL<sup>33</sup>. Οι διάμεσες τιμές στις γυναίκες είναι σημαντικά υψηλότερες (517 ng/mL) σε σύγκριση με τα επίπεδα των ανδρών (450 ng/mL) και ιδιαίτερα στις γυναίκες που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση<sup>33</sup>. Ακόμη, η παχυσαρκία και ο διαβήτης συνδέονται με αυξημένα επίπεδα PCSK9<sup>33</sup>. Η χορήγηση στατινών αυξάνει σημαντικά την έκφραση της PCSK9. Ωστόσο, σε αυτούς τους παράγοντες οφείλεται μόνο το 23% της παρατηρούμενης μεταβλητότητας της συγκέντρωσης της PCSK9 στο πλάσμα<sup>33</sup>.

Έχει βρεθεί σημαντικός αριθμός μεταλλάξεων της PCSK9, οι οποίες διακρίνονται σε 2 κατηγορίες: στις μεταλλάξεις που οδηγούν σε αύξηση της λειτουργίας του γονιδίου της PCSK9 (gain-of-function mutations, GOF) και επομένως σχετίζονται με μείωση του αριθμού των LDL υποδοχέων και στις μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου της PCSK9 (loss-of-function mutations, LOF)<sup>34,35</sup> και επομένως σχετίζονται με αύξηση του αριθμού των LDL υποδοχέων. Οι LOF μεταλλάξεις οδηγούν σε σημαντικά χαμηλότερα δια βίου επίπεδα LDL χοληστερόλης (Γράφημα 5 και 6), τα οποία συσχετίζονται με μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων μέχρι και 88%<sup>36,37</sup>. Αντίθετα, οι GOF μεταλλάξεις οδηγούν σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα LDL χοληστερόλης [εικόνα οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας (FH-Γραφήματα 5 και 6)] που συσχετίζονται με σημαντική αύξηση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων εξαιτίας επιτάχυνσης της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης<sup>36</sup>.



**Γράφημα 5.** Μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου της PCSK9 (LOF) και μεταλλάξεις που οδηγούν στην αύξηση της λειτουργίας του γονιδίου της PCSK9 (GOF).



**Γράφημα 6.** Μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου της PCSK9 (LOF) οδηγούν σε σημαντικά χαμηλότερα δια βίου επίπεδα LDL-C. Αντίθετα, μεταλλάξεις που οδηγούν στην αύξηση της λειτουργίας του γονιδίου της PCSK9 (GOF) οδηγούν σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα LDL-C .

Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι η PCSK9 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ομοίωση των LDL σωματιδίων. Οι άνθρωποι με GOF μεταλλάξεις έχουν αυξημένα επίπεδα πλάσματος της LDL χοληστερόλης και σημαντικά αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου κατά τη διάρκεια της ζωής τους<sup>29,35</sup>. Αντίθετα, οι άνθρωποι με LOF μεταλλάξεις έχουν χαμηλά επίπεδα



LDL χοληστερόλης στο πλάσμα και σημαντικά χαμηλότερο κίνδυνο για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου<sup>37</sup>.

### **1.3.3 Επίδραση της θεραπείας με στατίνες στα επίπεδα της PCSK9**

Η θεραπεία με στατίνες ελαττώνει την LDL χοληστερόλη [μείωση της ενδοκυττάριας σύνθεσης χοληστερόλης αναστέλλοντας την αναγωγή του 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο-συνενζύμου Α (HMG-CoA)] αλλά οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της PCSK9 στο πλάσμα<sup>31</sup>. Η αύξηση των επιπέδων της PCSK9 κατά τη θεραπεία με στατίνες οφείλεται στο γεγονός ότι η σύνθεση της PCSK9 ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο από την δραστηριότητα των SREBPs (sterol regulatory element-binding protein), ενός μεταγραφικού παράγοντα που ενεργοποιεί τα γονίδια τόσο του LDL υποδοχέα, όσο και της PCSK9<sup>31</sup>. Χαμηλά ενδοκυττάρια επίπεδα χοληστερόλης στα ηπατικά κύτταρα ενεργοποιούν τις SREBPs, οι οποίες επάγουν τη σύνθεση της PCSK9 αλλά παράλληλα και των LDL υποδοχέων. Κατά συνέπεια οι στατίνες, οι οποίες ελαττώνουν την ενδοκυττάρια σύνθεση και επομένως και την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της χοληστερόλης, διαμέσου της ενεργοποίησης των SREBPs, οδηγούν σε παράλληλη αύξηση σύνθεσης τόσο των LDL υποδοχέων, όσο και της PCSK9, της πρωτεΐνης δηλαδή που αυξάνει την αποδόμηση των LDL υποδοχέων. Αυτός ο μηχανισμός εξηγεί και την μικρή επιπρόσθετη μείωση της LDL χοληστερόλης όταν αυξάνεται η δοσολογία των στατινών <sup>38,39</sup>.

Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η μείωση των επιπέδων PCSK9 μπορεί να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα των στατινών με αποτέλεσμα περαιτέρω μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης.

### **1.3.4 Αναστολείς της PCSK9 και φάρμακα**

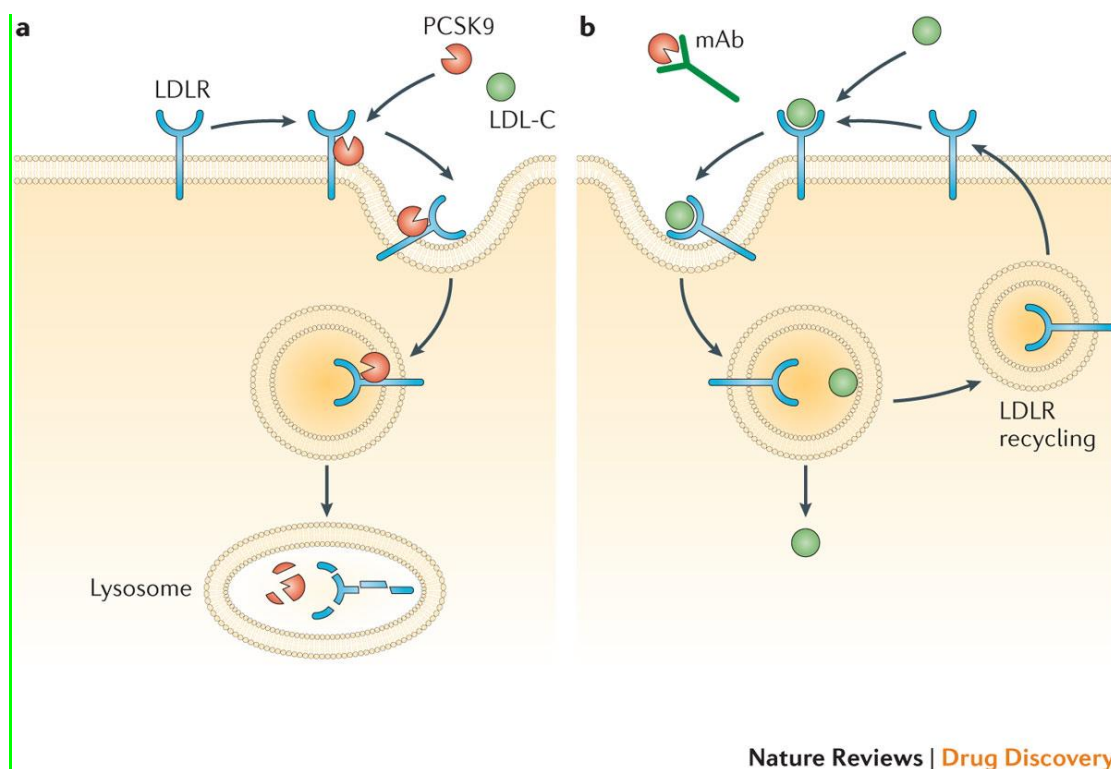
Μελέτες σε ποντίκια και ανθρώπους ανέδειξαν την κλινική σημασία της PCSK9<sup>40</sup>. Σε μια γενετική ανάλυση της μελέτης ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) φάνηκε στο 2% των ατόμων αφρικανικής καταγωγής που έλαβαν μέρος ότι μεταλλάξεις στο μόριο της PCSK9 που μειώνουν τη δραστηριότητα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης συσχετίζονται με μείωση της LDL χοληστερόλης κατά 15-40% <sup>41,42,37</sup>. Στα άτομα φορείς αυτών των μεταλλάξεων παρατηρήθηκε ότι μια μείωση κατά 40 mg/dL της LDL χοληστερόλης οφειλόμενη στις μεταλλάξεις της PCSK9 συσχετίζεται με ελάττωση της στεφανιαίας νόσου κατά 88%, ενώ μείωση της τάξης των 20 mg/dL συσχετίζεται με ελάττωση της στεφανιαίας νόσου κατά 50%<sup>41</sup>.

Στην ίδια μελέτη, μία μετάλλαξη σε καυκάσιους συμμετέχοντες με επιπολασμό 3,2% συσχετιζονταν με μείωση της LDL χοληστερόλης του πλάσματος κατά 21%. Στα άτομα που έφεραν αυτήν την μετάλλαξη παρατηρήθηκε μείωση της στεφανιαίας νόσου κατά 50%<sup>37</sup>. Η ελάττωση του καρδιαγγειακού κινδύνου που συσχετίζεται με τις παραπάνω περιπτώσεις είναι μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται στις μελέτες μείωσης της LDL χοληστερόλης με στατίνες και αυτό πιθανότατα συμβαίνει εξαιτίας της μειωμένης LDL χοληστερόλης στο πλάσμα καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής<sup>37</sup>.

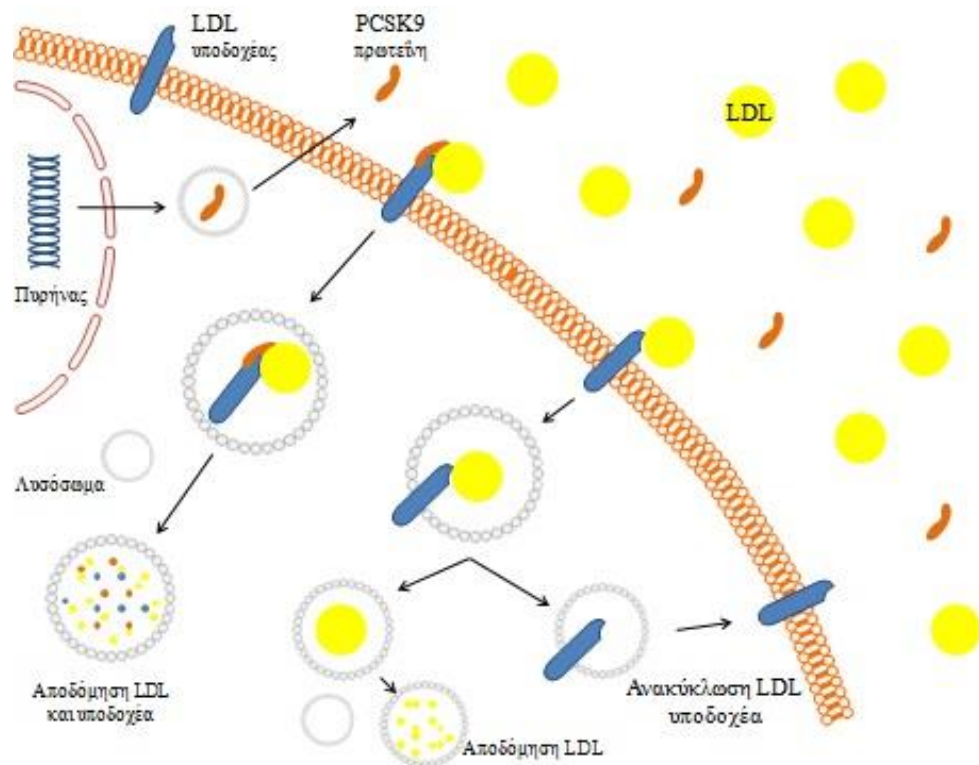
Με βάση τα παραπάνω ευρήματα η φαρμακευτική βιομηχανία ανέπτυξε φάρμακα που στοχεύουν στην αναστολή της PCSK9. Αυτός ο

στόχος μπορεί να επιτευχθεί με αρκετούς τρόπους, όπως gene silencing siRNA και anti-sense oligonucleotides (ASOs). Ωστόσο, η έρευνα έχει κυρίως επικεντρωθεί στα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) που αναστέλλουν την PCSK9<sup>43</sup> (Γραφήματα 7 και 8). Τα μονοκλωνικά αντισώματα που αναστέλλουν την PCSK9 χορηγούνται υποδόρια κάθε 15 ή 30 ημέρες. Πρόσφατα έχουν λάβει έγκριση στην Αμερική και την Ευρώπη δύο τέτοια μονοκλωνικά αντισώματα: το enolocumab (AMGEN) και το alirocumab (SANOFI-REGENERON).

Παράδειγμα για την αποτελεσματικότητα αυτών των φαρμάκων αποτελεί η μελέτη RUTHERFORD-2 σε ασθενείς με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία που ελάμβαναν αγωγή με στατίνη ή/και εζετιμίμη. Η μελέτη έδειξε ότι το μονοκλωνικό αντίσωμα enolocumab σε δοσολογία 140 mg κάθε 2 εβδομάδες ή 420 mg μία φορά τον μήνα μείωσε την LDL χοληστερόλη κατά 60% συγκριτικά με το εικονικό φάρμακο.



**Γράφημα 7.** Μηχανισμός δράσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων (monoclonal antibodies, mAb) έναντι της proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). Η εξωκυττάρια PCSK9 συνδέεται στον υποδοχέα των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoprotein receptor, LDLR) και επάγει την αποδόμησή του στο λυσόσωμα (a). Η αναστολή της PCSK9 με μονοκλωνικό αντίσωμα αυξάνει τη διάρκεια ζωής των LDLRs, οι οποίοι απομακρύνουν τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας από την κυκλοφορία.



**Γράφημα 8.** Η παρουσία μονοκλωνικού αντισώματος που δεσμεύει την πρωτεΐνη PCSK9 ευνοεί την ανακύκλωση των LDL υποδοχέων, με αποτέλεσμα την αύξησή τους στην επιφάνεια του ηπατοκυττάρου και τη μείωση της LDL χοληστερόλης του πλάσματος.

### **1.3.5 Η προγνωστική αξία των επιπέδων της PCSK9 για τα καρδιαγγειακά συμβάματα**

Η συγκέντρωση της PCSK9 στον ορό πιθανά συσχετίζεται με τον μελλοντικό κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, ακόμη και σε άτομα με ρυθμισμένους παράγοντες κινδύνου<sup>44</sup>. Πολλοί παράγοντες συσχετίζονται με τα επίπεδα της PCSK9 στον ορό. Παραδείγματα αποτελούν η LDL χοληστερόλη, η HDL χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια, η απολιποπρωτεΐνη Β (apoB), η ινσουλίνη, η γλυκόζη, το ινωδογόνο, η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), το κάπνισμα, η ηλικία και ο Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ)<sup>45</sup>. Τα υπάρχοντα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι ισχυρότερες συσχετίσεις υπάρχουν με την LDL χοληστερόλη, την apoB και τα τριγλυκερίδια. Μερικοί ερευνητές έχοντας ως δεδομένο ότι η PCSK9 ρυθμίζει την LDL χοληστερόλη διαμέσου των LDL υποδοχέων προσπάθησαν να αποδείξουν ότι η συγκέντρωση της PCSK9 στον ορό μπορεί να προβλέψει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Σε μια προοπτική μελέτη κοορτής 4.232 αντρών και γυναικών από την Σουηδία μέσης ηλικίας 60 ετών εξετάστηκε αν τα επίπεδα της PCSK9 στον ορό μπορούν να έχουν προγνωστική αξία στην εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων<sup>44</sup>. Η μελέτη έδειξε ότι τα επίπεδα της PCSK9 στον ορό συσχετίζονται με την επίπτωση της καρδιαγγειακής νόσου ακόμη και μετά από προσαρμογή ως προς τους εδραιωμένους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου<sup>44</sup>. Αντίθετα, σε μια άλλη πρόσφατη μελέτη ασθενών-μαρτύρων σε 358 γυναίκες με καρδιαγγειακή νόσο και 358 μάρτυρες δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της PCSK9 στο πλάσμα και καρδιαγγειακών συμβαμάτων<sup>46</sup>. Επιπρόσθετα, σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, τα αρχικά υψηλά επίπεδα της

PCSK9 στο πλάσμα δεν συσχετίζονταν με τη θνησιμότητα στον ένα χρόνο της μελέτης<sup>47</sup>.

## **1.4 Διατροφή και PCSK9**

Από τις αρχές του 20ού αιώνα το ενδιαφέρον για τη διατροφή και τη δημόσια υγεία έχει στραφεί από τα προβλήματα των διατροφικών ανεπαρκειών στα προβλήματα διατροφικής υπερεπάρκειας και ανισορροπίας στη λήψη των τροφίμων και στην ιδέα της ιδανικής διατροφής, αυτής δηλαδή που μπορεί να προλαμβάνει την εκδήλωση χρόνιων νοσημάτων. Η σχέση μεταξύ διατροφής και χρόνιων παθήσεων, όπως της καρδιαγγειακής νόσου, έχει γίνει πλέον σαφής. Παραδοσιακά διατροφικά πρότυπα όπως είναι η μεσογειακή διατροφή (MedDiet) έχουν συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων<sup>48</sup>. Ασκώντας ευνοϊκή επίδραση σε πολλούς παράγοντες κινδύνου, όπως τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, αυτού του τύπου η διατροφή συστήνεται ως άριστη επιλογή πρόληψης των καρδιαγγειακών παθήσεων<sup>49</sup>.

Με την είσοδο της PCSK9 στο προσκήνιο και έχοντας υπόψη τον σημαντικό ρόλο που παίζει στην ομοιοστασία της χοληστερόλης οι ερευνητές στρέφονται προς διάφορες κατευθύνσεις που θα βοηθήσουν να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς που συνδέουν την PCSK9 με τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Μια από αυτές είναι η αναζήτηση της συσχέτισης των επιπέδων της PCSK9 με την μεσογειακή διατροφή και την απώλεια βάρους.

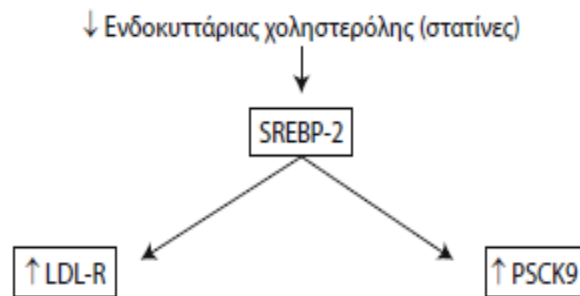
Τα υπάρχοντα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η υψηλή περιεκτικότητα της μεσογειακής διατροφής σε φυτοστερόλη μπορεί να μειώνει την

συγκέντρωση της LDL χοληστερόλης στο πλάσμα αναστέλλοντας την απορρόφηση της από το έντερο<sup>50</sup>. Αντίθετα, η απώλεια βάρους έχει συσχετιστεί με μειωμένη σύνθεση χοληστερόλης<sup>51</sup>.

Πειραματόζωα με έλλειψη της PCSK9 φαίνεται ότι συσσωρεύουν κοιλιακό λίπος, ένα εύρημα που επισημαίνει ότι η PCSK9 πιθανά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αδιπογένεση<sup>52</sup>. Η PCSK9 είναι πιθανό να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του λίπους αφού έχει ως αποτέλεσμα εκτός από την αύξηση της LDL χοληστερόλης και τη μείωση της εισόδου τριγλυκεριδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό<sup>30</sup>.

Σε κάποιες μελέτες φαίνεται ότι η διατροφή ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση της PCSK9<sup>53</sup>. Έτσι, σε κυτταρικές μελέτες το mRNA της PCSK9 επηρεάζεται από τα επίπεδα των στερολών διαμέσου του μεταγραφικού παράγοντα SREBP-2 (sterol regulatory element-binding-protein) που ενεργοποιεί τα γονίδια τόσο του LDL υποδοχέα, όσο και της PCSK9<sup>54,55</sup> (Σχήμα 3). Αφαιρώντας τις στερόλες από τα κύτταρα HepG2, η έκφραση της PCSK9 σταδιακά αυξανόταν (μέσα σε 12 ώρες), αλλά αυτή η επίδραση εξασθενούσε μετά το πέρας του 24ωρου. Σύμφωνα με τον Costet et al<sup>56</sup> αυτό το φαινόμενο εξηγείται διαμέσου της αλληλεπίδρασης του SREBP1 και SREBP2 με το SRE (sterol regulatory element). Επιπρόσθετα, σε ποντίκια μια βραχυπρόθεσμη δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη αυξάνει τα επίπεδα της PCSK9<sup>57</sup>. Ωστόσο, η δίαιτα με υψηλά λιπαρά δεν επηρέασε την PCSK9 στο πλάσμα σε αυτά τα πειραματόζωα<sup>57</sup>. Σε μία άλλη μελέτη η συγκέντρωση της PCSK9 στο πλάσμα μειώθηκε το ίδιο (12-13%) με τη

μεσογειακή διατροφή<sup>58</sup> ή με δίαιτα πλούσια σε φυτικά ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA)<sup>59</sup>.



**Σχήμα 3.** Έκφραση τόσο της PCSK9 όσο και των LDL υποδοχέων (LDL-R) μέσω του SREBP-2.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα είναι εμφανές ότι απαιτείται περαιτέρω μελέτη για την κατανόηση του ρόλου της μεσογειακής διατροφής και της απώλειας σωματικού βάρους στα επίπεδα της PCSK9 του ορού.



## **2. ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η εκτίμηση της επίδρασης της προσκόλλησης στην μεσογειακή διαίτα και της απώλειας σωματικού βάρους στα επίπεδα της PCSK9 στον ορό.

## **3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

### **3.1 Σχεδιασμός της μελέτης**

Πιλοτική μελέτη στο ιατρείο Διαταραχών των Λιπιδίων και Παχυσαρκίας της Β΄ Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής του ΠΓΝ Ιωαννίνων.

### **3.2 Βιοηθική**

Όλοι οι συμμετέχοντες αφού ενημερώθηκαν λεπτομερώς για τους σκοπούς και τις διαδικασίες της μελέτης υπέγραψαν το έντυπο συμφωνητικό συγκατάθεσης. Η μελέτη έλαβε την έγκριση της Επιστημονικής Επιτροπής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, ενώ τηρήθηκαν οι προϋποθέσεις της διακήρυξης του Ελσίνκι (WMA, 2000)<sup>60</sup>.

## **4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **4.1 Προσκόλληση στην Μεσογειακή Διατροφή**

### 4.1.1 Πληθυσμός της μελέτης

Τον πληθυσμό της μελέτης για την διερεύνηση της συσχέτισης των επιπέδων της PCSK9 στον ορό με τον βαθμό προσκόλλησης στην μεσογειακή διατροφή και την απώλεια βάρους αποτέλεσαν διαδοχικοί ασθενείς του τακτικού Εξωτερικού Ιατρείου των διαταραχών των Λιπιδίων και Παχυσαρκίας της Β΄ Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, οι οποίοι προσήλθαν στο ιατρείο με σκοπό την απώλεια βάρους ή την διερεύνηση του λιπιδαιμικού τους προφίλ.

Στη μελέτη συμμετείχαν ασθενείς με ΔΜΣ > 30 kg/m<sup>2</sup>.

Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν:

1. Δυσλειτουργία του ήπατος (αμινοτρανσφεράσες >3 φορές από τα ανώτερα φυσιολογικά όρια ή/και ιστορικό χρόνιας ηπατικής βλάβης, όπως κίρρωση του ήπατος ή μη αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος
2. Χρόνια νεφρική νόσος (eGFR <60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>)
3. Διαβήτης (γλυκόζη νηστείας >126 mg/dL
4. Υποθυρεοειδισμός (TSH >5.0 μU/mL) ή άλλη νόσος του ενδοκρινικού συστήματος
5. Λήψη οποιουδήποτε φαρμάκου που επηρεάζει τα επίπεδα των λιπιδίων.
6. Πρόσφατη απώλεια βάρους
7. Ηλικία <18 ετών
8. Εγκυμοσύνη

Στην πρώτη επίσκεψη ελήφθη πλήρες ιατρικό ιστορικό και δείγμα αίματος, ενώ έγινε κλινική εξέταση και καταγράφηκαν αναλυτικά οι αυξομειώσεις του σωματικού βάρους, πιθανές εκούσιες προσπάθειες

απώλειας βάρους κατά το παρελθόν, καθώς και οι διατροφικές συνήθειες των ασθενών με τη μορφή απλής συνέντευξης.

Στην μελέτη συμμετείχε και μια ομάδα ελέγχου υγιών εθελοντών αποτελούμενη από 15 υγιή άτομα με φυσιολογικό ΣΒ ( $\Delta\text{ΜΣ} < 25 \text{ kg/m}^2$ ), τα οποία δεν ελάμβαναν καμία φαρμακευτική αγωγή.

Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 ομάδες. Στην ομάδα Α εκτιμήθηκε ο βαθμός προσκόλλησης στην Μεσογειακή διατροφή χρησιμοποιώντας το δείκτη MedDiet Score και συσχετίσθηκε με τα επίπεδα της PCSK9 στον ορό.

Στην ομάδα Β εκτιμήθηκε η επίδραση της απώλειας βάρους στα επίπεδα της PCSK9 του ορού. Κατά την έναρξη της μελέτης ο διαιτολόγος χορήγησε υποθερμιδική διαίτα με βάση τις βασικές ενεργειακές ανάγκες και την εκτίμηση της σωματικής δραστηριότητας του κάθε ασθενή, η οποία απέδιδε 500-700 θερμίδες λιγότερες από τις ημερήσιες ανάγκες. Η διαίτα που χορηγήθηκε περιείχε υδατάνθρακες  $52.5 \pm 4.1\%$ , λιπαρά οξέα  $28.5 \pm 3.2\%$  (μονοακόρεστα  $15.3 \pm 1.7\%$ , πολυακόρεστα  $7.1 \pm 1.4\%$  και κορεσμένα λιπαρά οξέα  $6.0 \pm 1.1\%$ ) και πρωτεΐνη  $19.0 \pm 1.4\%$ . Στους ασθενείς δόθηκαν παράλληλα με τις διατροφικές οδηγίες και συμβουλές για καθημερινή σωματική άσκηση διάρκειας 30-60 λεπτών. Η συμμόρφωση των ασθενών στις διαιτητικές οδηγίες ελέγχονταν με διεξοδική συζήτηση και με 24ωρα ημερολόγια διατροφής. Ο διαιτολόγος μία φορά το μήνα έδινε συμβουλές και οδηγίες που βασίζονταν στα διατροφικά ημερολόγια των ασθενών για τη βελτίωση της διατροφής τους. Στο τέλος του τριμήνου παρακολούθησης ελήφθη δείγμα αίματος και έγινε επανέλεγχος των σωματομετρικών χαρακτηριστικών για την καταγραφή της μεταβολής τους.

### **4.1.2 Μέτρηση ανθρωπομετρικών παραμέτρων**

Το σωματικό βάρος μετρήθηκε σε χιλιόγραμμα με ακρίβεια ενός δεκαδικού ψηφίου χρησιμοποιώντας το βαθμονομημένο ζυγό Tanita BF600 χωρίς παπούτσια και με ελαφρά ρούχα. Το ύψος μετρήθηκε σε όρθια θέση με ακρίβεια 1 εκατοστού με επιτοίχιο αναστημόμετρο Seca 206 χωρίς παπούτσια. Ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) υπολογίστηκε για κάθε ασθενή ως το πηλίκο του βάρους σε χιλιόγραμμα προς το τετράγωνο του ύψους σε μέτρα με ακρίβεια ενός δεκαδικού ψηφίου.

Η περίμετρος μέσης μετρήθηκε με ταινία μέτρησης περιφέρειας Seca 201 με ακρίβεια εκατοστού και ενός δεκαδικού ψηφίου στο ύψος της μέσης απόστασης μεταξύ του κατώτερου άκρου των πλευρών και της λαγόνιας ακρολοφίας. Ο εξεταζόμενος βρισκόταν σε όρθια θέση σε εκπνοή και η ταινία οριζόντια ρυθμισμένη στο μήκος που να μη πιέζει τον υποκείμενο ιστό.

Η αρτηριακή πίεση μετρήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Υπέρτασης με ηλεκτρονικό πιεσόμετρο Microlife BP 100A. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροκαρδιογράφημα με ηλεκτρονικό καρδιογράφο 12 απαγωγών.

### **4.1.3 Αναλυτικές μέθοδοι**

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν μετά από 12ωρη νηστεία. Ο διαχωρισμός του ορού έγινε μετά από φυγοκέντρηση στις 3.000 στροφές για 15 λεπτά και καταψύχθηκαν στους -80°C.

Ο προσδιορισμός των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού έγινε σε αυτόματο αναλυτή OLYMPUSAU 640 (Olympus Diagnostica, Hamburg,

Germany). Η ολική χοληστερόλη (TCHOL) και τα τριγλυκερίδια (TGs) του ορού προσδιορίστηκαν με ενζυματικές μεθόδους. Για τον προσδιορισμό της TCHOL αρχικά το ποσοστό της χοληστερόλης που είναι εστεροποιημένο υδρολύεται σε ελεύθερη χοληστερόλη και λιπαρά οξέα και στη συνέχεια η TCHOL μετατρέπεται σε χολεστερόνη και υπεροξειδίο, το οποίο μετράται ποσοτικά με το σχηματισμό χρωμογόνου στα 510nm. Για την μέτρηση των TGs γίνεται καταρχήν υδρόλυση των TGs σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα και στη συνέχεια ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκερόλης σε 3 στάδια. Ο προσδιορισμός της HDL-C έγινε με ενζυματική μέθοδο (όπως η TCHOL) μετά από δέσμευση των LDL, VLDL και των χυλομικρών με αντισώματα κατά των β-λιποπρωτεϊνών.

Η τιμή της LDL χοληστερόλης υπολογίστηκε από τον τύπο του Friedewald:

$$\text{LDL-C} = \text{TC} - (\text{HDL-C} + \text{TGs}/5)$$

σε δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν μετά από 12ωρη νηστεία και η τιμή των TGs ήταν <400 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις της LDL-C ατόμων με TGs>400 mg/dL δεν προσδιορίστηκαν.

Ο προσδιορισμός των τιμών των απολιποπρωτεϊνών A<sub>1</sub>, B και E και της Lp(a) στον ορό έγινε με ανοσονεφελόμετρία σε νεφελόμετρο PROSPECT (DadeBehring, Liederbach, Germany) χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα για κάθε απολιποπρωτεΐνη.

Η ινσουλίνη προσδιορίστηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο με φθορίζον προϊόν η οποία χρησιμοποιεί την τεχνική των μικροσωματιδίων (Microparticle Enzyme Immunoassay, ABBOTT GmbH Diagnostika,

Wiesbaden-Delkenheim, Germany). Ο δείκτης HOMA υπολογίσθηκε ως εξής:

$HOMA = \text{ινσουλίνη νηστείας (mU/L)} * \text{γλυκόζη νηστείας (mg/dL)} / 405$ .

#### **4.1.4 Υπολογισμός του βαθμού προσκόλλησης στην Μεσογειακή Διατροφή**

Με τους διατροφικούς δείκτες μπορούμε να αξιολογήσουμε το βαθμό συσχέτισης ανάμεσα στην ποιότητα διατροφής και την εμφάνιση χρόνιων παθήσεων. Με τον δείκτη MedDiet Score μπορεί να αξιολογηθεί ο βαθμός προσκόλλησης στο παραδοσιακό πρότυπο της μεσογειακής διατροφής.<sup>61</sup>

Για την δημιουργία του MedDiet Score χρησιμοποιήθηκαν 11 παράγοντες, οι οποίοι αποτελούν τα βασικά συστατικά της Μεσογειακής Διατροφής: τα μη επεξεργασμένα δημητριακά και τα προϊόντα τους, οι πατάτες, τα φρούτα, τα λαχανικά, τα όσπρια, τα ψάρια και τα θαλασσινά, το κόκκινο κρέας και τα παράγωγα του κρέατος, τα πουλερικά, τα πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα, το ελαιόλαδο και το αλκοόλ. Σύμφωνα με την πυραμίδα της μεσογειακής διατροφής για κάποιες ομάδες τροφίμων προτείνεται η καθημερινή κατανάλωση τους, για κάποιες άλλες η εβδομαδιαία και για κάποιες η μηνιαία κατανάλωση τους. Καταγράφεται η συχνότητα κατανάλωσής των παραπάνω ομάδων και τους αποδίδονται βαθμοί που ξεκινούν από 0 έως 5. Σκορ 0 δίνεται σε όσους αναφέρουν μηδενική κατανάλωση, σκορ 1 δίνεται σε όσους δηλώνουν εβδομαδιαία κατανάλωση 1-4 φορές, σκορ 2 για εβδομαδιαία κατανάλωση 5-8 φορές, σκορ 3 για 9-12 φορές, σκορ 4 για 3-18 φορές και τέλος σκορ 5 σε όσους δηλώνουν εβδομαδιαία κατανάλωση πάνω από 18 φορές. Στην περίπτωση

της κατανάλωσης προϊόντων που σύμφωνα με το πρότυπο της Μεσογειακής διατροφής δεν πρέπει να καταναλώνονται συχνά, όπως είναι το κρέας και τα προϊόντα του, ισχύει η αντίστροφη βαθμολόγηση. Δηλαδή σε όσους αναφέρουν σπάνια ή μηδενική κατανάλωση δίνεται σκορ 5 και σκορ 0 όταν η κατανάλωση είναι καθημερινή. Για την κατανάλωση κρασιού ο τρόπος βαθμολόγησης έχει ως εξής: σκορ 5 δίνεται για την κατανάλωση 1-2 ποτήρια κρασί την ημέρα (<300 mL), σκορ 0 για μηδενική κατανάλωση ή όταν ξεπερνά τα επτά ποτήρια κρασί ημερησίως (>700 mL). Σκορ 4 μέχρι 1 δίνεται για κατανάλωση 3,4,5, 6 ή 7 ποτηριών κρασιού την ημέρα (Γράφημα 9).

Το σκορ Μεσογειακής Διατροφής (MedDietScore)						
Πόσο συχνά καταναλώνετε:	Συχνότητα κατανάλωσης					
	Κανονικές μερίδες ανά εβδομάδα/όπως ορίζονται					
Ολικής άλεσης Δημητριακά	Ποτέ	1-6	7-12	13-18	19-31	>32
	0	1	2	3	4	5
Πατάτες	Ποτέ	<1	1-2	3	4	>4
	0	1	2	3	4	5
Φρούτα	Ποτέ	1-4	5-8	9-15	16-21	>22
	0	1	2	3	4	5
Λαχανικά (ωμά ή μαγειρεμένα)	Ποτέ	1-6	7-12	13-20	21-32	>33
	0	1	2	3	4	5
Όσπρια	Ποτέ	<1	1-2	3-4	5-6	>6
	0	1	2	3	4	5
Ψάρια και Θαλασσινά	Ποτέ	<1	1-2	3-4	5-6	>6
	0	1	2	3	4	5
Κόκκινο κρέας και παράγωγα κρέατος	≤1	2-3	4-5	6-7	8-10	>10
	5	4	3	2	1	0
Πουλερικά	≤3	4-5	5-6	7-8	9-10	>10
	5	4	3	2	1	0
Πλήρη γαλακτοκομικά (τυρί, γιαούρτι, γάλα)	≤10	11-15	16-20	21-28	29-30	>30
	5	4	3	2	1	0
Χρήση ελαιόλαδου στο μαγείρεμα (φορές/εβδομάδα)	Ποτέ	Σπάνια	<1	1-3	3-5	Καθημερινά
	0	1	2	3	4	5
Αλκοολούχα ποτά (mL/ημέρα, 100mL=12g αιθανόλης)	<300	300	400	500	600	>700 ή 0
	5	4	3	2	1	0

### Γράφημα 9. Ο δείκτης Μεσογειακής Διατροφής MedDietScore.

Αθροίζοντας τους βαθμούς που αποδόθηκαν και στις 11 συνιστώσες προκύπτει ένα συνολικό σκορ που κυμαίνεται μεταξύ 0 έως 55. Συγκεκριμένα σκορ που συγκεντρώνει 0-20 βαθμούς υποδηλώνει χαμηλή υιοθέτηση και μεγαλύτερη προσκόλληση στην δυτικού τύπου διατροφή, 21-35 μέτρια υιοθέτηση, ενώ σκορ που συγκεντρώνει 36-55 βαθμούς υποδηλώνει υψηλή υιοθέτηση της Μεσογειακής Διατροφής.



Κατά την έναρξη της μελέτης οι ασθενείς της ομάδας Α με την καθοδήγηση του εκπαιδευμένου διαιτολόγου συμπλήρωσαν το ερωτηματολόγιο συμμόρφωσης στη μεσογειακή διατροφή MedDietScore. Το συνολικό σκορ του κάθε ασθενούς χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του βαθμού προσκόλλησης στη Μεσογειακή διατροφή.

## **4.2 Διερεύνηση των επιπέδων της PCSK9**

### **στον ορό**

Ο προσδιορισμός των επιπέδων PCSK9 στο πλάσμα βασίζεται στην ποσοτική ενζυμική ανοσολογική τεχνική τύπου σάντουιτς<sup>62</sup>. Για τον καθορισμό της PCSK9 στο ανθρώπινο πλάσμα χρησιμοποιήθηκε Quantikine ELISA Human Proprotein Convertase 9/PCSK9 (R & D Systems, Inc.), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την ανθρώπινη PCSK9 έχει προ-επιστρωθεί πάνω σε ένα μικρό πλακάκι (έτοιμο προς χρήση). Πενήντα (50) μL από τα πρότυπα και τα δείγματα ασθενών μπαίνουν με πιπέτα εντός των φρεατίων και η πλάκα επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, όπου κάθε παρούσα PCSK9 δεσμεύεται από το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Στη συνέχεια, το κάθε φρεάτιο αναρροφάται και πλένεται 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα καθαρισμού (400 μL/φρεάτιο). Μετά την έκπλυση των μη συνδεδεμένων συζυγών ουσιών προστίθεται ένα ένζυμο-συνδεδεμένο πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την ανθρώπινη PCSK9 στα φρεάτια (200 μL ανά φρεάτιο) και το πλακίδιο επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, η πλάκα πλένεται για να απομακρυνθεί οποιοδήποτε μη

συνδεδεμένο αντιδραστήριο αντισώματος-ενζύμου και 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος υποστρώματος προστίθεται στα πηγάδια. Το σύστημα επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η εμφάνιση χρώματος γίνεται σε αναλογία με την ποσότητα της δεσμευμένης PCSK9 στο αρχικό στάδιο. Η ανάπτυξη του χρώματος διακόπτεται (μπλε) με την προσθήκη διαλύματος τερματισμού 50  $\mu\text{L}$  και η ένταση του κίτρινου χρώματος μετράται χρησιμοποιώντας έναν αναγνώστη μικροπλάκας που έχει οριστεί σε 450 nm. Μια προκαθορισμένη καμπύλη βαθμονόμησης διαμορφώνεται συνδυάζοντας την απορρόφηση που επιτυγχάνεται για κάθε προκαθορισμένο σημείο στον άξονα των  $y$  με την αποτύπωση (consecration) της ανθρώπινης PCSK9 σε ng/mL στον άξονα των  $x$ . Τα δεδομένα πιθανόν να γραμμικοποιηθούν χαράσσοντας μια καμπύλη από την καταγραφή των συγκεντρώσεων της PCSK9 έναντι της καταγραφής των O.D. και η καταλληλότερη γραμμή μπορεί να προσδιοριστεί με ανάλυση παλινδρόμησης. Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη δόση (MDD) της ανθρώπινης PCSK9 κυμαίνεται από 0,030-0,219 ng/mL και η μέση MDD είναι 0,096 ng/mL. Ο ενδο- και δι-αναλυτικός συντελεστής διακύμανσης (CV) είναι 6,1 και 5,9% αντίστοιχα.

## 4.2.1 Προσδιορισμός επιπέδων PCSK9 – Αναλυτική περιγραφή

### ΥΛΙΚΑ & ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Φυλάσσουμε το κλειστό κιτ στους 2-8 °C. Δεν το χρησιμοποιούμε μετά την ημερομηνία λήξης.

ΜΕΡΟΣ	ΜΕΡΟΣ#	ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ#	ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ#	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ/ΑΝΟΙΧΤΟΥ/ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ
		DPC 900	SPC900		
<b>Human pcsk9 Microplate</b>	893354	1 πλάκα	6 πλάκες	Μικροπλάκες πολυστιρενίου 96 θέσεων (12 λωρίδες 8 πηγαδιών) επικαλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για PCSK9	Επιστροφή αχρησιμοποίητων πηγαδιών στην αλουμινένια συσκευασία που περιέχει το αποξηραντικό πακέτο. Ξανασφραγίζουμε κατά μήκος ολόκληρου του άκρου του φερμουάρ-σφραγίδα. Μπορούν να αποθηκευτούν για 1 μήνα στους 2-8 ° C. *
<b>Human PCSK9 Standard</b>	893356	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη PCSK9 σε ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνης με συντηρητικά, λυοφιλοποιήθηκε. Ανατρέχουμε στην ετικέτα του φιαλιδίου για τον όγκο ανασύστασης.	Υποπολλαπλασιάζουμε και αποθηκεύουμε έως και 1 μήνα σε θερμοκρασία ≤-20 ° C. *
<b>Human PCSK9 σύζευξη</b>	893355	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	21 mL/ πολυκλωνικού αντισώματος ειδικό για σύζευξη PCSK9 χρένου υπεροξειδάσης με συντηρητικά.	
<b>Δοκιμασία αραίωσης με 3 RDI-9</b>	895167	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	11 mL/ ρυθμιστικού δ-τος με συντηρητικά	

Καλιμπράρισμα αραίωσης RD5P	895151	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	21 mL μιας βάσης συμπυκνωμένου ρυθμιστικού δ-τος πρωτεΐνης με συντηρητικά. Χρησιμοποιείται αραιό 1: 5 σε αυτή τη δοκιμασία.	Μπορεί να αποθηκευτεί για 1 μήνα στους 2-8 ° C
Πυκνό ρυθμιστικό δ- μα πλύσης	895003	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	21 mL από 25-πλάσια συμπυκνωμένο διάλυμα ρυθμισμένου επιφανειοδραστικού με συντηρητικό. Μπορεί να κιτρινίζουν με την πάροδο του χρόνου.	
Χρώμα αντιδραστηρίου Α	895000	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	12 mL σταθεροποιημένο υπεροξείδιο του υδρογόνου	
Χρώμα αντιδραστηρίου Β	895001	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	12 mL σταθεροποιημένο χρωμογόνο (τετραμεθυλοβενζιδίνη)	
Δ-μα διακοπής	895032	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	6 mL 2N θειικού οξέος	
Σφράγισμα πλακών	N/A	4 λωρίδες	24 λωρίδες	Κολλητικές ταινίες	

## ΑΛΛΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ

- Αναγνώστης μικροπλάκας με δυνατότητα μέτρησης της απορρόφησης στα 450 nm, με τη διόρθωση μήκους κύματος να ορίζεται στα 540 nm ή 570 nm.
- Σιφώνια και ρύγχη πιπετών.

- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.
- Μπουκάλι Squirt, πολλαπλής διανομής, ή αυτοματοποιημένη συσκευή πλύσης μικροπλάκας.
- 100 mL και 500 mL βαθμονομημένους ογκομετρικούς κυλίνδρους.
- Δοκιμαστικοί σωλήνες για την αραίωση των προτύπων και των δειγμάτων.
- Controls για PCSK9 σε ανθρώπους

## **ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ LYSATE**

- Ρυθμιστικό διάλυμα Lysis 1 (R & D Systems, Κατάλογος # 890713).

## **ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ**

Το διάλυμα διακοπής που παρέχεται με αυτό το kit είναι ένα διάλυμα οξέος. Ορισμένα στοιχεία σε αυτό το kit περιέχουν ProClin® η οποία μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση του δέρματος. Αποφεύγουμε την εισπνοή σταγονιδίων. Το χρώμα του αντιδραστηρίου Β μπορεί να ερεθίσει το δέρμα, τα μάτια και το αναπνευστικό. Αποφεύγουμε την εισπνοή αναθυμιάσεων. Φοράμε προστατευτικά γάντια, ρούχα, στα μάτια, και το πρόσωπο. Πλένουμε καλά τα χέρια μετά το χειρισμό.

## **ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ & ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ**

Η συλλογή δειγμάτων και οι συνθήκες αποθήκευσης που αναφέρονται παρακάτω προορίζονται ως γενικές κατευθύνσεις. Η σταθερότητα του δείγματος δεν έχει αξιολογηθεί.

**Υπερκείμενα Καλλιέργειας κυττάρων** - Διαχωρισμός σωματιδίων με φυγοκέντρηση και δοκιμή αμέσως ή ομαλή διαίρεση δειγμάτων και αποθήκευση στους  $\leq -20$  °C. Αποφεύγουμε επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης-απόψυξης.

**Προϊόντα κυτταρόλυσης** - Πριν από την δοκιμασία, τα κύτταρα πρέπει να λύνονται σύμφωνα με τις οδηγίες της διαδικασίας κυτταρόλυσης.

**Ορός** - Χρησιμοποιούμε ένα σωλήνα διαχωρισμού ορού (SST) και αφήνουμε τα δείγματα να πήξουν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου πριν από την φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 1000 χ g. Απομακρύνουμε τον ορό και προσδιορίζουμε αμέσως ή αποθηκεύουμε τα δείγματα στους  $\leq -20$  °C. Αποφεύγουμε επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης-απόψυξης.

**Πλάσμα** - Συλλέγουμε πλάσμα χρησιμοποιώντας EDTA ή ηπαρίνη ως αντιπηκτικό. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 1000 χ g εντός 30 λεπτών από τη συλλογή. Εφαρμόζουμε τη δοκιμασία αμέσως ή αποθηκεύουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία  $\leq -20$  °C. Αποφεύγουμε επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης-απόψυξης. Σημείωση: κιτρικό πλάσμα δεν έχει επικυρωθεί για χρήση σε αυτή τη δοκιμασία.

## **ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Ορός και δείγματα πλάσματος απαιτούν μια 20-πλάσια αραιώση. Μία προτεινόμενη αραιώση 20-φορές είναι 20 μL δείγματος + 380 μL βαθμονομητή Διαλύτη RD5P (αραιωμένο 1: 5) \*.

## **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΛΥΣΗΣ**

Χρησιμοποιούμε την ακόλουθη διαδικασία για την προετοιμασία των δειγμάτων κυτταρικού λύματος.

1. Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε  $5 \times 10^6$  κύτταρα/mL σε 10 mL του Cell Lysis Buffer 1.
2. Επώαση με περιοδικό στροβιλισμό για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 12000 rpm για να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα.
4. Χωρίζουμε σε κλάσματα το υπερκείμενο λύσης και αποθήκευση σε θερμοκρασία  $\leq -20$  ° C μέχρι να είναι έτοιμο για χρήση.

## **ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ**

**Φέρνουμε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.**

**Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης** - Εάν κρύσταλλοι έχουν σχηματιστεί στο συμπύκνωμα, θέρμανση σε θερμοκρασία δωματίου και αναμιγνύουμε ήπια έως ότου οι κρύσταλλοι έχουν διαλυθεί πλήρως. Προσθέτουμε 20 mL συμπύκνωμα ρυθμιστικού πλύσης σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό για την παρασκευή 500 mL ρυθμιστικού πλύσης.

**Διάλυμα Υποστρώματος** - Χρώμα Αντιδραστηρίου A και B θα πρέπει να αναμιχθούν μαζί σε ίσους όγκους μέσα σε 15 λεπτά χρήσης. Προστατεύουμε από το φως. 200  $\mu$ L του προκύπτοντος μίγματος απαιτείται ανά φρεάτιο.

**Βαθμονομημένο Αραιωτικό RD5P (αραιωμένο 1: 5)** - Προσθέτουμε 20 mL βαθμονομημένο Αραιωτικό RD5P συμπυκνώνεται σε 80 mL απιονισμένου νερού για την παρασκευή 100 ml βαθμονομημένου αραιωτικού RD5P (αραιωμένο 1:5).

**Πρότυπο Ανθρώπινης PCSK9 - Ανατρέχουμε στην ετικέτα του φιαλιδίου για τον όγκο ανασύστασης.** Η ανασύσταση του PCSK9 Πρότυπο Ανθρώπων με βαθμονομητή αραιωτικό RD5P (αραίωση 1:5). Αυτή η ανασύσταση παράγει ένα μητρικό διάλυμα 40 ng/mL. Αναμιγνύουμε το πρότυπο για να διασφαλιστεί η πλήρης ανασύσταση και αφήνουμε το πρότυπο να καθίσει για τουλάχιστον 15 λεπτά με ήπια ανακίνηση πριν από την αραίωση. Με πιπέτα 250 µL βαθμονομητή αραιωτικό RD5P (αραίωση 1:5) σε κάθε σωλήνα. Χρησιμοποιούμε το μητρικό διάλυμα για να παραχθεί μια σειρά αραίωσης (παρακάτω). Ανακατεύουμε κάθε σωληνάριο επιμελώς πριν από την επόμενη μεταφορά. Το μη αραιωμένο PCSK9 πρότυπο (40 ng/mL) χρησιμεύει ως υψηλό επίπεδο. Το Βαθμονομημένο Αραιωτικό RD5P (αραιωμένο 1:5) χρησιμεύει ως το μηδέν πρότυπο (0 ng/mL).

## **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ**

Αφήνουμε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Συνιστάται όλα τα δείγματα, οι μάρτυρες και τα πρότυπα να αναλυθούν εις διπλούν.

**1.** Ετοιμάζουμε όλα τα αντιδραστήρια, εργασιακά πρότυπα, και τα δείγματα σύμφωνα με τις οδηγίες στις προηγούμενες ενότητες.



**2.** Αφαιρούμε την περίσσεια λωρίδων μικροπλάκας από το πλαίσιο της πλάκας, τα επιστρέφουμε στην αλουμινένια συσκευασία που περιέχει το αποξηραντικό πακέτο, και σφραγίζουμε πάλι.

**3.** Προσθέτουμε 100  $\mu\text{L}$  Assay Diluent RD1-9 σε κάθε φρεάτιο. Η δοκιμασία με αραιωτικό RD1-9 μπορεί να περιέχει ένα ίζημα. Θέρμανση σε θερμοκρασία δωματίου, και ελαφρά ανάμιξη για να διαλυθεί. Αν το ίζημα δεν διαλύεται εντελώς, ανακατεύουμε καλά κατά τη χρήση.

**4.** Προσθέστε 50  $\mu\text{L}$  του πρότυπου, control ή δείγματος \* ανά πηγάδι. Καλύπτουμε με την αυτοκόλλητη ταινία που παρέχεται. Επωάζουμε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

**5.** Αναρροφούμε κάθε φρεάτιο και πλένουμε, επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία τρεις φορές για ένα σύνολο τεσσάρων πλύσεων. Πλένουμε γεμίζοντας κάθε πηγαδάκι με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (400  $\mu\text{L}$ ), χρησιμοποιώντας ένα μπουκάλι squirt, πολλαπλής διανομής, ή autowasher. Η πλήρης αφαίρεση του υγρού σε κάθε στάδιο είναι απαραίτητη για την καλή απόδοση. Μετά την τελευταία πλύση, αφαιρούμε το Wash Buffer που απομένει από αναρρόφηση ή μετάγγιση. Αντιστρέφουμε την πλάκα και στεγνώνουμε σε καθαρό χαρτί κουζίνας.

**6.** Προσθέτουμε 200  $\mu\text{L}$  της ανθρώπινης PCSK9 συζεύγματος σε κάθε φρεάτιο. Καλύπτουμε με μια νέα αυτοκόλλητη ταινία. Επωάζουμε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

**7.** Επαναλαμβάνουμε το βήμα αναρρόφηση/πλύση όπως στο βήμα 5.

**8.** Προσθέτουμε 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος υποστρώματος σε κάθε πηγαδάκι. Επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προστατεύουμε από το φως.

**9.** Προσθέτουμε 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος παύσης σε κάθε πηγαδάκι. Το χρώμα στα φρεάτια πρέπει να αλλάξει από μπλε σε κίτρινο. Αν το χρώμα στα πηγαδάκια είναι πράσινο ή η αλλαγή χρώματος δεν εμφανίζεται ομοιόμορφα, αγγίζουμε απαλά την πλάκα για να εξασφαλιστεί η πλήρης ανάμιξη.

**10.** Προσδιορίζουμε την οπτική πυκνότητα κάθε φρεατίου εντός 30 λεπτών χρησιμοποιώντας αναγνώστη μικροπλάκας που έχει οριστεί σε 450 nm. Εάν η διόρθωση μήκος κύματος είναι διαθέσιμη, να οριστεί σε 540 nm ή 570 nm. Εάν διόρθωση μήκους κύματος δεν είναι διαθέσιμη, αφαιρούμε αναγνώσεις στα 540 nm ή 570 nm από τις αναγνώσεις στα 450 nm. Αυτή η αφαίρεση θα διορθώσει τις οπτικές ατέλειες στην πλάκα. Αναγνώσεις που γίνονται απευθείας στα 450 nm χωρίς διόρθωση μπορεί να είναι υψηλότερες και λιγότερο ακριβής.

## **ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Υπολογίζουμε το μέσο όρο των δύο μετρήσεων για κάθε πρότυπο, τον control, και το δείγμα και αφαιρούμε το μέσο όρο μηδέν πρότυπο οπτικής πυκνότητας (Ο.Π.).

Δημιουργούμε μία πρότυπη καμπύλη βάζοντας τα δεδομένα με τη χρήση του λογισμικού ηλεκτρονικών υπολογιστών ικανά να παράγουν τεσσάρων παραμέτρων λογιστικής (4-PL) καμπύλη προσαρμογής. Ως εναλλακτική λύση, να κατασκευάσει μια πρότυπη καμπύλη με τεταγμένη τη μέση

απορρόφηση για κάθε πρότυπο στον  $\gamma$ -άξονα έναντι της συγκέντρωσης στον άξονα  $x$  και να χαράξουμε μια καλύτερη προσαρμογή της καμπύλης μέσω των σημείων στο γράφημα. Τα δεδομένα μπορούν να γραμμικοποιηθούν με γραφική παράσταση του λογαρίθμου της ανθρώπινης συγκεντρώσεων PCSK9 έναντι του λογαρίθμου της Ο.Π. και το καταλληλότερο μπορεί να προσδιοριστεί με ανάλυση παλινδρόμησης. Αυτή η διαδικασία θα παράγει επαρκή αλλά λιγότερο ακριβή σύμπτωση των δεδομένων. Εάν τα δείγματα έχουν αραιωθεί πριν από τη δοκιμασία, η συγκέντρωση που διαβάζεται από την πρότυπη καμπύλη πρέπει να πολλαπλασιαστεί με το συντελεστή αραιώσης.

## **ΤΥΠΙΚΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ**

Αυτή η πρότυπη καμπύλη παρέχεται μόνο για επίδειξη. Μια πρότυπη καμπύλη πρέπει να δημιουργηθεί για κάθε σειρά δειγμάτων που προσδιορίστηκαν.

## **ΑΚΡΙΒΕΙΑ**

**Ακρίβεια ενδοδοκιμασίας** (ακρίβεια εντός μιας δοκιμασίας) Τρία δείγματα γνωστής συγκέντρωσης ελέγχθηκαν είκοσι φορές σε μία πλάκα για την εκτίμηση της ακρίβειας ενδο-προσδιορισμού.

**Ακρίβεια δια-δοκιμασίας** (ακρίβεια μεταξύ των προσδιορισμών)

Τρία δείγματα γνωστής συγκέντρωσης ελέγχθηκαν σε σαράντα ξεχωριστές δοκιμασίες για την αξιολόγηση της ακρίβειας δια-δοκιμασίας. Οι ανιχνεύσεις πραγματοποιήθηκαν από τουλάχιστον τρεις τεχνικούς χρησιμοποιώντας δύο παρτίδες των συστατικών.

Ακρίβεια ενδο-δοκιμασίας				Ακρίβεια δια-δοκιμασίας		
Δείγμα	1	2	3	1	2	3
<b>N</b>	20	20	20	40	40	40
<b>Mean(ng/mL)</b>	4.82	14.0	27.7	4.64	14.5	27.9
<b>Standard deviation</b>	0.196	0.795	1.81	0.276	0.629	1.13
<b>CV (%)</b>	4.1	5.7	6.5	5.9	4.3	4.1

## ΑΝΑΚΤΗΣΗ

Η ανάκτηση της ανθρώπινης PCSK9 που εμπλουτίστηκε με τα επίπεδα σε όλη την κλίμακα της δοκιμασίας αξιολογήθηκε.

Τύπος δείγματος	Μέσος όρος % Recovery	Range
<b>Cell culture media (n=4)</b>	107	100-111%

## ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ

Προκειμένου να εκτιμηθεί η γραμμικότητα της δοκιμασίας, δείγματα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ανθρώπινης PCSK9 αραιώθηκαν με βαθμονομητή αραιωτικό για την παραγωγή δειγμάτων με τιμές εντός της δυναμικής περιοχής του προσδιορισμού.

		Cell culture samples (n=2)	Serum* (n=4)	EDTA Plasma* (n=4)	Heparin Plasma* (n=4)
1:2	Average% of Expected	100	105	104	104
	Range (%)	99-102	103-107	102-106	102-107
1:4	Average% of Expected	103	106	105	104
	Range (%)	101-104	104-108	101-108	100-109
1:8	Average% of Expected	107	106	105	107
	Range (%)	105-109	102-110	99-115	102-113
1:16	Average% of Expected	112	104	103	106
	Range (%)	110-114	96-109	97-109	102-110

## ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Σαράντα δοκιμασίες αξιολογήθηκαν και η ελάχιστη ανιχνεύσιμη δόση (MDD) ανθρώπινης PCSK9 κυμαίνονταν από 0.030-0.219 ng/mL. Η μέση MDD ήταν 0,096 ng/mL.

Η MDD προσδιορίστηκε με την προσθήκη δύο τυπικών αποκλίσεων προς τη μέση τιμή οπτικής πυκνότητας των είκοσι μηδέν πρότυπο επαναλήψεων και τον υπολογισμό της αντίστοιχης συγκέντρωσης.

## ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ

Αυτή η ανοσολογική δοκιμή έχει βαθμονομηθεί έναντι μιας υψηλής καθαρότητας NS0-έκφρασης ανασυνδυασμένη ανθρώπινη PCSK9 παράγεται σε R & D Systems.

## ΤΙΜΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

**Ορός/πλάσμα** - Δείγματα από προφανώς υγιείς εθελοντές αξιολογήθηκαν για την παρουσία ανθρώπινης PCSK9 σε αυτή τη δοκιμασία. Δεν ήταν διαθέσιμα ιατρικά ιστορικά για τους δότες που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη μελέτη.

<b>Τύπος δείγματος</b>	Mean (ng/mL)	Range (ng/mL)	Standard Deviation (ng/mL)
Serum (n=37)	313	177-460	71.5
EDTA plasma (n=37)	308	160-521	73.3
Heparin plasma (n=37)	315	159-547	81.7

**Cell Culture υπερκείμενα** - HepG2 κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος καλλιεργήθηκαν σε  $\alpha$ MEM συμπληρωμένο με 10% ορό εμβρύου μόσχου, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/mL πενικιλίνη, και 100  $\mu$ g/mL θειική στρεπτομυκίνη. Ένα κλάσμα του υπερκειμένου κυτταρικής καλλιέργειας απομακρύνθηκε, δοκιμάστηκαν για την ανθρώπινη PCSK9, και μετρήθηκαν 47,2 ng/mL.

**Τα προϊόντα κυτταρόλυσης** - κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2 παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στο ΟβΙΙ Διαδικασία κυτταρόλυσης. Ένα κλάσμα του κυτταρικού λύματος

απομακρύνθηκε, δοκιμάστηκαν για την ανθρώπινη PCSK9, και μετρήθηκαν 4,74 ng/mg ολικής πρωτεΐνης.

## **ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ**

Αυτή η δοκιμασία αναγνωρίζει την ελεύθερη και την LDL-R δεσμευμένη PCSK9, καθώς και την ανασυνδυσασμένη ανθρώπινη PCSK9. Οι παράγοντες που αναφέρονται παρακάτω παρασκευάστηκαν στα 400 ng/mL σε Calibrator αραιωτικό και αναλύθηκαν για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Οι προετοιμασίες των ακόλουθων παραγόντων στα 400 ng/mL σε ένα mid-range ανασυνδυσασμένη ανθρώπινη έλεγχο PCSK9 αναλύθηκαν για παρεμβολές. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ή παρεμβολές.

## **4.3 Στατιστική ανάλυση**

Αρχικά υποθέτουμε ότι οι ασθενείς με παχυσαρκία εμφανίζουν σημαντική διαφορά στα επίπεδα της PCSK9 στον ορό σε σχέση με τα άτομα φυσιολογικού βάρους. Δευτερεύουσα υπόθεση ήταν ότι η βραχυπρόθεσμη απώλεια βάρους μπορεί να επηρεάσει την συγκέντρωση της PCSK9 στον ορό. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (SD). Το τεστ Kolmogorov-Smirnov χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της κανονικότητας των κατανομών. Οι διαφορές στις παραμέτρους μεταξύ διαφορετικών ομάδων εκτιμήθηκαν με τη χρησιμοποίηση του t-test για ανεξάρτητα δείγματα ή του Mann-Whitney U test για κανονικές και μη κανονικές μεταβλητές, αντίστοιχα. Οι διαφορές στα ποσοστά εκτιμήθηκαν με το τεστ  $\chi^2$ . Οι συσχετίσεις μεταξύ των μεταβλητών της μελέτης εκτιμήθηκαν με τη χρησιμοποίηση του Pearson-correlation coefficient (r) ή του Spearman's

rank order correlation (rho) για τις κανονικές και μη-κανονικές μεταβλητές, αντίστοιχα. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε το  $p < 0,05$ . Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με προσωπικό υπολογιστή και τη χρήση του λογισμικού SPSS21.0 (SPSSInc).



## **5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **5.1 Εκτίμηση των επιπέδων της PCSK9 σε υπέρβαρους και παχύσαρκους ασθενείς**

#### **5.1.1 Χαρακτηριστικά του πληθυσμού-Σύγκριση παχύσαρκων και ομάδας ελέγχου**

Για την μελέτη της εκτίμησης των επιπέδων της PCSK9 συμπεριελήφθησαν συνολικά 55 άτομα που προσήλθαν στο Εξωτερικό Ιατρείο Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων και Παχυσαρκίας: 20 άτομα συνιστούσαν την ομάδα ελέγχου και 35 την ομάδα των παχύσαρκων ασθενών. Τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά φαίνονται στους Πίνακες 5.1 & 5.2.

Από τα 35 άτομα της ομάδας των παχύσαρκων ασθενών οι 11 ήταν άνδρες και οι 24 γυναίκες. Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν  $43\pm 11$  έτη. Η μέση τιμή του ΔΜΣ ήταν  $39,7\pm 7,8$  kg/m<sup>2</sup> και της περιμέτρου μέσης  $124\pm 19$  cm.

Όσον αφορά την ομάδα ελέγχου, από τους 20 ασθενείς οι 6 ήταν άνδρες και οι 14 γυναίκες. Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν  $35\pm 6$  έτη. Η μέση τιμή του ΔΜΣ ήταν  $22,7\pm 2,0$  kg/m<sup>2</sup> και της περιμέτρου μέσης  $84\pm 9$  cm.

**Πίνακας 5.1** Κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

<b>Παράμετρος</b>	<b>Παχύσαρκοι ασθενείς (n=35)</b>	<b>Ομάδα ελέγχου (n=20)</b>	<b>P</b>
<b>Φύλο (♂/♀)</b>	11/24	6/14	NS
<b>Ηλικία (έτη)</b>	43±11	35±6	0,01
<b>Σωματικό Βάρος (kg)</b>	114,7±31,9	64,1±10,5	<0,001
<b>ΔΜΣ (kg/m<sup>2</sup>)</b>	39,7±7,8	22,7±2,0	<0,001
<b>Περίμετρος μέσης (cm)</b>	124±19	84±9	<0,001
<b>MedDietscore</b>	17±3	25±4	<0,001

ΔΜΣ: δείκτης μάζας σώματος

**Πίνακας 5.2** Βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

<b>Παράμετρος</b>	<b>Παχύσαρκοι ασθενείς (n=35)</b>	<b>Ομάδα ελέγχου (n=20)</b>	<b>P</b>
<b>Ολική χοληστερόλη (mg/dL)</b>	212 ± 29	172 ± 27	<0,001
<b>Τριγλυκερίδια (mg/dL)</b>	125 ± 60	67 ± 32	<0,001
<b>HDL χοληστερόλη (mg/dL)</b>	53 ± 12	57 ± 11	0,04
<b>LDL χοληστερόλη (mg/dL)</b>	134 ± 24	102 ± 21	<0,001
<b>Απολιποπρωτεΐνη A1 (mg/dL)</b>	143 ± 23	159 ± 23	0,048
<b>Απολιποπρωτεΐνη B (mg/dL)</b>	89 ± 17	65 ± 15	<0,001
<b>Απολιποπρωτεΐνη E (mg/L)</b>	43 ± 9	37 ± 15	NS
<b>Γλυκόζη (mg/dL)</b>	92 ± 10	80 ± 8	<0,001
<b>Ινσουλίνη (μU/mL)</b>	13,2 ± 7,5	5,5 ± 2,1	<0,001
<b>Δείκτης HOMA</b>	3,0 ± 1,6	1,1 ± 0,5	<0,001
<b>PCSK9 (ng/mL)</b>	229±65	156±43	<0,001

HDL: λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας, LDL: λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας, HOMA: homeostasis model assessment, PCSK9: proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

Εξορισμού οι παχύσαρκοι ασθενείς είχαν υψηλότερο βάρος και ΔΜΣ, καθώς και μεγαλύτερη περίμετρο μέσης. Η σύγκριση μεταξύ των 2 ομάδων έδειξε ότι η ομάδα των ασθενών χαρακτηρίζονταν από χαμηλότερο MedDiet σκορ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 5.1).

Στον βιοχημικό έλεγχο εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 ομάδων: οι παχύσαρκοι ασθενείς είχαν υψηλότερες τιμές ολικής χοληστερόλης, TGs, LDL χοληστερόλης και ApoB σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επιπρόσθετα, οι παχύσαρκοι ασθενείς είχαν υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης, ινσουλίνης καθώς και υψηλότερο δείκτη HOMA, ενώ τα επίπεδα HDL χοληστερόλης και απολιποπρωτεΐνης A<sub>1</sub> ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση πάντα με την ομάδα ελέγχου.

### **5.1.2 PCSK9 και Δείκτης MedDiet score**

Όπως προαναφέρθηκε σχετικά με τον δείκτη MedDiet score παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ομάδων με τους παχύσαρκους ασθενείς να συγκεντρώνουν μικρότερο σκορ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 3.1). Αντίθετα, τα επίπεδα της PCSK9 στον ορό ήταν υψηλότερα στους παχύσαρκους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 3.2). Η διαφορά παρέμεινε σημαντική ακόμη και μετά από προσαρμογή των αποτελεσμάτων ως προς την ηλικία, την LDL

χοληστερόλη, τα TGs, την HDL χοληστερόλη, την απολιποπρωτεΐνη A<sub>1</sub>, την απολιποπρωτεΐνη B, την απολιποπρωτεΐνη E, την γλυκόζη, την ινσουλίνη και τον δείκτη HOMA ( $p=0.018$ ). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση των τιμών της PCSK9 στον ορό με τον δείκτη MedDiet score σε καμία από τις ομάδες της μελέτης

Δεδομένου της σημαντικής διαφοράς ηλικίας ανάμεσα στις 2 ομάδες, πραγματοποιήθηκαν συσχετισμοί στο συνολικό δείγμα προσαρμόζοντας ως προς την ηλικία. Έτσι, μετά από διόρθωση για την ηλικία παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων PCSK9 και του ΔΜΣ ( $r = 0,36$ ,  $p = 0,02$ ), του σωματικού βάρους ( $r = 0,35$ ,  $p = 0,03$ ) και της περιφέρειας μέσης ( $r = 0,36$ ,  $p = 0,04$ ). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων PCSK9 και της βαθμολογίας MedDiet ( $r = -0,32$ ,  $p = 0,045$ ) μετά από διόρθωση για την ηλικία. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της PCSK9 και των παραμέτρων του μεταβολισμού των λιπιδίων/λιποπρωτεϊνών ή του μεταβολισμού των υδατανθράκων.

### **5.1.3 Επιδράσεις της υποθερμιδικής διαίτας**

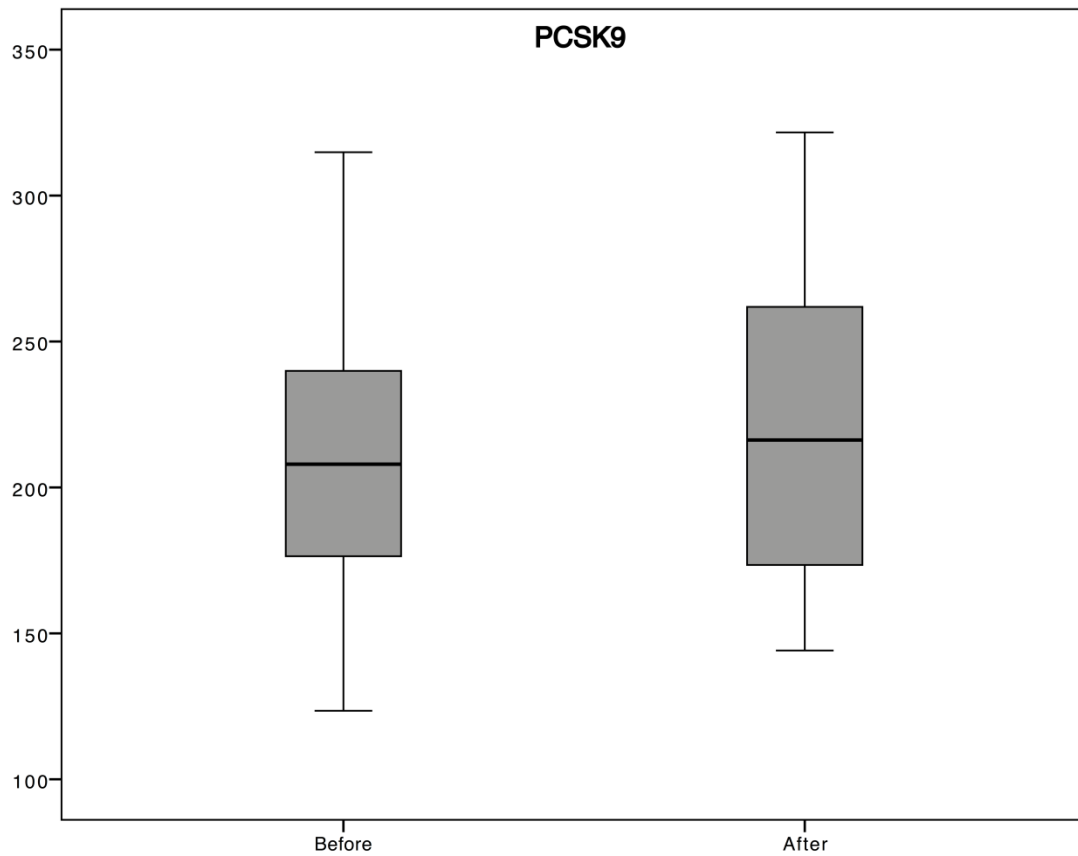
Στο τέλος των 3 μηνών παρακολούθησης παρατηρήθηκε σημαντική απώλεια βάρους και μεταβολή του δείκτη μάζας σώματος στους παχύσαρκους ασθενείς με συνοδό σημαντική μείωση των επιπέδων των TGs, της ApoE και του δείκτη HOMA.

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή της PCSK9 κατά την διάρκεια της διαιτητικής παρέμβασης. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση

μεταξύ των μεταβολών του βάρους, των TGs ή του δείκτη HOMA με τις μεταβολές της PCSK9 (πίνακας 5.3).

**Πίνακας 5.3** Σύγκριση των ανθρωπομετρικών και βιοχημικών παραμέτρων στον ορό πριν και μετά την απώλεια βάρους σε παχύσαρκους ασθενείς (n=35)

<b>Παράμετρος</b>	<b>Αρχική τιμή</b>	<b>3 μήνες μετά</b>	<b>P</b>
<b>Βάρος (Kg)</b>	109 ± 22	104 ± 23	<0,001
<b>ΔΜΣ (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	38 ± 5	36 ± 5	<0,001
<b>Ολική χοληστερόλη (mg/dL)</b>	211±32	204±32	NS
<b>Τριγλυκερίδια(mg/dL)</b>	126±59	91±33	<0,01
<b>HDL χοληστερόλη (mg/dL)</b>	51±12	50±11	NS
<b>LDL χοληστερόλη (mg/dL)</b>	135±26	136±26	NS
<b>Απολιποπρωτεΐνη A1(mg/dL)</b>	139 ± 21	129 ± 20	NS
<b>Απολιποπρωτεΐνη B (mg/dL)</b>	92±17	84±21	NS
<b>Απολιποπρωτεΐνη E (mg/L)</b>	43±6	38±9	0,05
<b>Γλυκόζη (mg/dL)</b>	96±10	93±8	NS
<b>Ινσουλίνη (μU/mL)</b>	12,9±3.6	10,0±3.2	NS
<b>Δείκτης HOMA</b>	3,16 ± 0,9	2,3 ± 0,7	0.07
<b>PCSK9 (ng/mL)</b>	207 ±54	218±57	NS



**Γράφημα 10.** Μεταβολές των επιπέδων της proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) κατά τη διάρκεια του τριμήνου προγράμματος απώλειας βάρους. Οι τιμές δίνονται σε ng/mL.



## 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παχυσαρκία είναι μια νόσος που τα τελευταία χρόνια έχει λάβει παγκόσμια επιδημικές διαστάσεις. Πρόκειται για νόσο σύνθετης αιτιολογίας, στην οποία το γενετικό υπόβαθρο και το περιβάλλον συνδυάζονται με περίπλοκους μηχανισμούς που δεν είναι απόλυτα κατανοητοί με αποτέλεσμα την εμφάνιση συγκεκριμένων φαινοτύπων, με κοινό χαρακτηριστικό το αυξημένο σωματικό βάρος<sup>63</sup>.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης της προσκόλλησης στην μεσογειακή διατροφή και της οξείας απώλειας σωματικού βάρους στα επίπεδα της PCSK9 στον ορό. Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που εξέτασε τα αποτελέσματα μιας βραχυπρόθεσμης απώλειας βάρους στη συγκέντρωση της PCSK9 στο ορό. Τα κύρια ευρήματα της μελέτης ήταν ότι οι ασθενείς είχαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα PCSK9 στον ορό σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογικό βάρος και ότι η βραχυπρόθεσμη απώλεια βάρους δεν μετέβαλε σημαντικά τη συγκέντρωση αυτής της πρωτεΐνης στον ορό.

Η PCSK9 σχετίζεται με αυξημένη αποδόμηση των LDL υποδοχέων και με αυξημένα επίπεδα της LDL χοληστερόλης στον ορό<sup>64</sup>. Προηγούμενες μελέτες στον γενικό πληθυσμό έχουν δείξει μεταβλητότητα των συγκεντρώσεων PCSK9 στο ορό έως και 100 φορές<sup>33</sup>.

Η μελέτη της μεταβλητότητας των επιπέδων της PCSK9 στον ορό δείχνει ότι πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη συγκέντρωση αυτής της πρωτεΐνης, οδηγώντας πιθανά σε σημαντική συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου<sup>44,47</sup>.

Παρατηρήσαμε μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης PCSK9 σε ασθενείς με παχυσαρκία, η οποία παρέμεινε σημαντική ακόμη και μετά από προσαρμογή των αποτελεσμάτων ως προς την ηλικία, τα επίπεδα λιπιδίων/λιποπρωτεϊνών και τους δείκτες μεταβολισμού των υδατανθράκων. Η προσθήκη του ΔΜΣ στην ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών είχε ως αποτέλεσμα η διαφορά της PCSK9 στον ορό μεταξύ των ατόμων με παχυσαρκία και της ομάδας ελέγχου να είναι μη σημαντική, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παχυσαρκία είναι ένας παράγοντας που συσχετίζεται ανεξάρτητα με αυξημένα επίπεδα της PCSK9 στους παχύσαρκους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται και από την σημαντική συσχέτιση, ύστερα από διόρθωση για την ηλικία, της αρχικής συγκέντρωσης PCSK9 στον ορό με τον ΔΜΣ.

Η παχυσαρκία συσχετίζεται με αλλαγές σε πολλές μεταβολικές οδούς και συνδέεται με μεταβολές στην παραγωγή και κυκλοφορία κυτταροκινών που ονομάζονται αδιποκίνες<sup>65-71</sup>. Είναι πιθανό ότι η μεταβολή των αδιποκινών που παρατηρούνται στην παχυσαρκία θα μπορούσε να μεταβάλει τα επίπεδα της PCSK9, όπως επίσης η πιθανή επίδραση της μεταβολής της συσσώρευσης λίπους στο ήπαρ<sup>72</sup>. Ωστόσο, αυτές οι επιδράσεις δεν εξετάσθηκε στην παρούσα μελέτη και πρέπει να αποτελέσουν αντικείμενο μελλοντικής έρευνας.

Προηγούμενες αναφορές έδειξαν σχετικά μικρή συσχέτιση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης με τα επίπεδα της PCSK9 στον ορό ( $r = 0,24$ ) στον γενικό πληθυσμό που εξηγούσε λιγότερο από το 8% της διακύμανσης των επιπέδων LDL χοληστερόλης<sup>33</sup>. Σε παχύσαρκους

ασθενείς, η συγκέντρωση της PCSK9 στον ορό συσχετίζεται σημαντικά με τη συγκέντρωση της LDL χοληστερόλης, αλλά όχι με την έκκριση των VLDL-TGs ή τον ρυθμό κάθαρσης τους<sup>69</sup>. Επιπρόσθετα, δεν έχουν αναφερθεί ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων της PCSK9 και των TGs, της ινσουλίνης και της γλυκόζης<sup>33,73</sup>.

Στην παρούσα μελέτη δεν διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση μετά από διόρθωση για την ηλικία μεταξύ της συγκέντρωσης PCSK9 στον ορό και της LDL χοληστερόλης ή άλλων παραμέτρων του μεταβολισμού των λιπιδίων και υδατανθράκων, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο μικρό δείγμα. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν 2 κλάσματα της κυκλοφορούσας PCSK9: ένα ελεύθερο που είναι περισσότερο ενεργό και ένα που διασπάται από φουρίνη που είναι πιθανά ανενεργό<sup>74</sup>. Στην παρούσα μελέτη μετρήθηκαν τα ολικά επίπεδα της PCSK9 στον ορό (που περιέχει και τα δύο κλάσματα της PCSK9), γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την μικρή συσχέτιση της PCSK9 στον ορό με τη συγκέντρωση της LDL χοληστερόλης. Παρόμοια, σε μια πρόσφατη μελέτη δεν αναφέρθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων PCSK9 και της LDLχοληστερόλης<sup>75</sup>, ενώ μια άλλη μελέτη έδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης PCSK9 και της LDL χοληστερόλης μόνο στους άνδρες<sup>76</sup>.

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της PCSK9 στον ορό μετά από πρόγραμμα απώλειας βάρους 3 μηνών. Μια προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι ένα πρόγραμμα απώλειας βάρους διάρκειας 20 εβδομάδων στα πλαίσια της μεσογειακής διατροφής

δεν άλλαξε σημαντικά τα επίπεδα της PCSK9 στον ορό σε άνδρες με μεταβολικό σύνδρομο.<sup>58</sup>

Έτσι, φαίνεται ότι μία απώλεια βάρους της τάξης των 5 Kg per se δεν μεταβάλλει τα επίπεδα κυκλοφορίας της PCSK9. Αντίθετα, οι διατροφικές συνήθειες μπορεί να επηρεάζουν τη συγκέντρωση της PCSK9 στον ορό. Για παράδειγμα, σε ποντίκια, το mRNA της PCSK9 μειώνεται κατά 73% μετά από 24 ώρες νηστείας και αποκαθίσταται μετά από πρόσληψη υψηλών ποσοτήτων υδατανθράκων<sup>56</sup>.

Οι συγκεντρώσεις της PCSK9 στον ορό αυξάνονται μετά βραχυπρόθεσμη διαίτα υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη<sup>57</sup>. Επιπλέον, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η μεσογειακή διατροφή μειώνει τα επίπεδα PCSK9<sup>58</sup>. Η μεσογειακή διατροφή είναι ένα πρότυπο διατροφής που συνδέεται με τη μείωση της εμφάνισης διαβήτη και καρδιαγγειακής νόσου<sup>77</sup>. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων PCSK9 και της προσκόλλησης στη μεσογειακή διατροφή (όπως αυτή εκτιμάται με το δείκτη MedDiet) και έτσι υποστηρίζουν την άποψη ότι η μεσογειακή διαίτα συνδέεται με μειωμένα επίπεδα PCSK9. Στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε διαίτα χαμηλών λιπαρών και η επίδραση των αλλαγών στη σύνθεση διατροφής στα επίπεδα PCSK9 στον ορό δεν μπορούσε να αξιολογηθεί. Έτσι, οι μελλοντικές μελέτες πρέπει να αξιολογήσουν διαφορετικές διαιτητικές συνθέσεις με ή χωρίς απώλεια βάρους προκειμένου να διασαφηνιστούν τα αποτελέσματά τους στην κυκλοφορούσα συγκέντρωση της PCSK9.

## **ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ**

Αυτή η πιλοτική μελέτη έχει ορισμένους περιορισμούς. Περιελάβαμε ένα σχετικό μικρό δείγμα ατόμων, γεγονός που πιθανά να συνέβαλε στην μη ανάδειξη σημαντικών συσχετισμών και δεν επέτρεψε έρευνες υποομάδων. Η διαφορά ηλικίας μεταξύ της ομάδας των ασθενών με την ομάδα ελέγχου ήταν σημαντική αν και έγινε προσπάθεια για διόρθωση ως προς την ηλικία. Επιπρόσθετα, αυτή η μελέτη δεν αξιολόγησε την επίδραση της απώλειας βάρους με διαφορετικές διαιτητικές συνθέσεις στα επίπεδα της PCSK9.

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η PCSK9 στον ορό είναι αυξημένη σε άτομα με παχυσαρκία σε σύγκριση με άτομα φυσιολογικού σωματικού βάρους και δεν μεταβάλλεται σημαντικά μετά από βραχυπρόθεσμη απώλεια βάρους με δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας λιπών.

# **Effects of increased body weight and short-term weight loss on serum PCSK9 levels – A pilot study**

## **Manuscript submitted for publication**

Filippatos TD<sup>1</sup>, Georgoula M<sup>1</sup>, Liberopoulos E<sup>1</sup>, Tellis C<sup>2</sup>, Tselepis D<sup>2</sup>, Bairaktari E<sup>3</sup>, Elisaf MS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Ioannina, Ioannina, Greece<sup>2</sup>Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, Ioannina, Greece<sup>3</sup>Laboratory of Clinical Chemistry, School of Medicine, University of Ioannina, Ioannina, Greece

### **ABSTRACT**

**Background:** Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is associated with low-density lipoproteins (LDL) catabolism but its serum concentration is not uniformly associated with cardiovascular disease in clinical studies. Obesity is linked with increased cardiovascular risk.

**Aim and Methods:** Aim of this pilot study was to assess possible differences in plasma PCSK9 levels (determined with a quantitative sandwich enzyme immunoassay) between otherwise healthy drug-naïve obese subjects (n= 35, age 43±11y) and healthy individuals with normal body weight (n=20, age 35±6y). Additionally, PCSK9 levels were

determined at baseline and after a 3-month weight-loss program in a randomly assigned subgroup of the obese subjects (n=15).

**Results:** Obese subjects were older and had significantly increased body mass index (BMI), waist circumference, total cholesterol, triglycerides, LDL cholesterol (LDL-C), apolipoprotein B and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA) index levels, as well as significantly decreased high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) concentration, compared with normal-weight subjects. Plasma PCSK9 levels were significantly increased in obese subjects compared with normal-weight individuals, even after adjustment for age, LDL-C, triglycerides, HDL-C, apolipoprotein A1, apolipoprotein B, apolipoprotein E, glucose, insulin and HOMA index levels ( $p=0.018$ ). Obese subjects experienced a significant weight loss (from  $109\pm 22$  to  $104\pm 23$  kg,  $p<0.01$ ) after the 3-month diet, which was associated with improvement in triglyceride and apolipoprotein E levels. Plasma PCSK9 levels did not significantly change after the 3-month weight-loss program.

**Conclusions:** Plasma PCSK9 levels are increased in obese subjects compared with normal-weight individuals. Short-term weight loss does not change significantly plasma PCSK9 levels.

**KEYWORDS:** proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; obesity; weight loss; triglycerides; apolipoprotein

1. 15ο Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο
2. 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο του Ινστιτούτου Μελέτης Έρευνας & Εκπαίδευσης για το Σακχαρώδη Διαβήτη και τα Μεταβολικά Νοσήματα

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ:** Η proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) εμπλέκεται στον καταβολισμό των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL). Σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της PCSK9 στον ορό σε παχύσαρκους ασθενείς και η εκτίμηση της επίδρασης μιας βραχυπρόθεσμης απώλειας σωματικού βάρους.

**ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:** Παχύσαρκοι ασθενείς [δείκτης μάζας σώματος (BMI)  $>30 \text{ kg/m}^2$ ] χωρίς ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου ή λήψη φαρμάκων ( $n=35$ , ηλικία  $43\pm 11$  γ) και υγιή άτομα φυσιολογικού σωματικού βάρους ( $n=20$ , ηλικία  $35\pm 6$  γ,  $\text{BMI}<25 \text{ kg/m}^2$ ) συμμετείχαν στη μελέτη. Σε ένα τυχαία επιλεγμένο δείγμα από την ομάδα των παχύσαρκων ασθενών ( $n=15$ ) δόθηκε υποθερμιδική διαίτα για 3 μήνες. Η PCSK9 στον ορό προσδιορίστηκε με ενζυμική μέθοδο ανοσοπροσδιορισμού.



**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Οι παχύσαρκοι ασθενείς είχαν μεγαλύτερη ηλικία και είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σωματικού βάρους, BMI, ολικής χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, απολιποπρωτεΐνης Β και δείκτη ομοιοστασίας των υδατανθράκων HOMA, καθώς και χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (HDL) σε σύγκριση με τα άτομα φυσιολογικού σωματικού βάρους (όλα  $p < 0.05$ ). Τα επίπεδα της PCSK9 ήταν σημαντικά υψηλότερα στα παχύσαρκα άτομα σε σύγκριση με τα άτομα φυσιολογικού σωματικού βάρους ( $229 \pm 65$  έναντι  $156 \pm 43$  ng/mL, αντίστοιχα,  $p < 0.01$ ), ακόμη και μετά από προσαρμογή των αποτελεσμάτων ως προς την ηλικία και τα επίπεδα της απολιποπρωτεΐνης Β και του δείκτη HOMA. Η υποθερμιδική διαίτα για 3 μήνες προκάλεσε σημαντική μείωση του σωματικού βάρους, των τριγλυκεριδίων και του δείκτη HOMA, χωρίς ωστόσο να συσχετισθεί με σημαντική μεταβολή των επιπέδων της PCSK9 στον ορό.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Η PCSK9 στον ορό είναι αυξημένη σε παχύσαρκους ασθενείς σε σύγκριση με άτομα φυσιολογικού σωματικού βάρους. Η βραχυπρόθεσμη απώλεια σωματικού βάρους δεν επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα της PCSK9 στον ορό.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Gu HM and Zhang DW. Hypercholesterolemia low density lipoprotein receptor and protein convertase subtilisin/kexin – type 9. *J Biomed Res*, 2015; 29(5):356-361.
2. Baigent C., et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*, 2005; 366: 1267-1278.
3. Joy TR., Hegele RA. Narrative review: statin-related myopathy. *Ann Intern Med*, 2009; 150: 858-868.
4. Matteucci., Giampietro O. Statin intolerance: Why and what to do-with a focus on diabetic people. *Curr Med Chem*, 2013; 20:1397-1408.
5. Harper CR., Jacobson TA. The broad spectrum of statin myopathy: from myalgia to rhabdomyolysis. *Curr opin Lipido,l* 2007; 18:401-408.
6. Catapano AL., et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur Heart J*, 2016; 37 (39): 2999-3058.
7. Liberopoulos E., et al. Prevalence and risk distribution of residual dyslipidemia in statin-treated patients in Greece. *Angiology*, 2012; 63(3): p. 184-93.
8. EUROASPIRE IV: Adverse lifestyle trends counter improvements in CV risk factor management. Available from: <http://www.escardio.org/about/press/press-releases/esc13-amsterdam/Pages/adverse-lifestyle-trends-counter-improvements-CV-risk-factor-management.aspx>. Assesed on 8 December 2013.
9. Aquiar C., et al. A review of the evidence on reducing macrovascular risk in patients with atherogenic dyslipidaemia: A report from an expert consensus meeting on the role of fenofibrate-statin combination therapy. *Atheroscler Suppl*, 2015; 19:1-12.

10. WORLD HEART ORGANIZATION STUDY GROUP. Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases. World Heart Organization, Technical Report Series, Geneva, Switzerland, 1990:797.
11. Achimastos A., et al. Expert consensus on the rational use of PCSK9 inhibitors. *Hormones*, 2016; 15.
12. Di Angelantonio E., et al. Body mass-index and all-cause mortality: individual – participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet*, 2016; 388(10046):776-786.
13. Hubert HB., et al. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983, 67:968-977.
14. Despres JP., et al. Regional distribution of body fat, plasma, lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis*, 1990; 10:497-511.
15. <http://www.unesco.org>.
16. Assman G., et al. International Consensus Statement on olive oil and the Mediterranean diet: implications for health in Europe. *Eur J Cancer Prev*, 1997; 6:418-421.
17. Keys A., et al. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation*, 1970; 41 (Suppl 4):1-211
18. Kafatos A., et al. Mediterranean diet of Crete: foods and nutrient content. *J Am Diet Assoc*, 2000; 100:1487-1493.
19. Trichopoulou A. Traditional Greek diet and coronary heart disease. *J Cardiovasc Risk*, 1994; 1:9-15.
20. Pitsavos C., et al. The benefits from Mediterranean diet on the risk of developing acute coronary syndromes in hypercholesterolemic subjects: A case control study (CARDIO2000). *Coron Artery Dis*, 2002; 13:295-300.

21. Panagiotakos DB., et al. Risk stratification of coronary heart disease in Greece:Final results from CARDIO2000 epidemiological study. *Prev Med*, 2002; 35:548-556.
22. Pitsavos C., et al. The effect of the combination of Mediterranean diet and leisure time physical activity on the risk of developing acute coronary syndromes in hypertensive subjects. *J Hum Hypertens*, 2002; 16:517-524.
23. Kris-Etherton P., et al. Lyon Diet Heart Study. Benefits of a Mediterranean-Style, National Education Program/AHA Step I Dietary Pattern on Cardiovascular Disease. *Circulation*, 2001; 103:1823-1825.
24. de Lorgeril M., et al. Mediterranean diet, traditional risk factors and rate of cardiovascular complications after myocardial infarction. Final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*, 1999; 99:779-785.
25. Trichopoulou., et al. Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece. *Arch Intern Med*, 2005; 25;165: 929-935
26. Covas., et al. Olive oil and cardiovascular health. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009; 54: 477–482.
27. Goldstein JL., Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009; 29(4):431-438.
28. Varret M., et al. A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. *Am J Hum Genet*, 1999; 64(5): 1378-87.
29. Abifadel M., et al. Mutations in PCSK9 causes autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*, 2003; 34(2): 154-6.
30. Seidah NG., et al. PCSK9: a key modulator of Cardiovascular health. *Circ Res*, 2014; 114:1022-36.
31. Hong- Mei G and Da-wei Z. Hypercholesterolaemia, low density lipoprotein receptor and protein convertase subtilisin/Kexin-type 9. *J Biomed Res*, 2015; 29(5):356-361.
32. Peterson AS., et al. PCSK9 function and physiology. *J Lipid Res*, 2008; 49:1595-9.

33. Lakoski SG., Lagace TA., Cohen JC., Horton JD., Hobbs HH. Genetic and metabolic determinants of plasma pcsk9 levels. *J Clin Endocrin Metab*, 2009; 94:2537-2543.
34. Cameron J., et al. Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum Mol Genet*, 2006; 15(9):1551-8.
35. Abifadel M., et al. Mutations and polymorphisms in the PCSK9 gene in cholesterol metabolism and disease. *Hum Mutat*, 2009; 30:520-9.
36. Mayne J., et al. Novel loss-of-function PCSK9 variant is associated with low plasma LDL cholesterol in a French-Canadian Family and with impaired processing and secretion in cell culture. *Clin Chem*, 2011; 57:1415-23.
37. Cohen JC., et al. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*, 2006; 354(12): 1264-72.
38. Kosenco T., et al. Low density lipoprotein binds to proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 (PCSK9) in human plasma and inhibits PCSK9-mediated low density lipoprotein receptor degradation. *J Biol Chem*, 2013; 288:8279-88.
39. Tavori H., et al. On the function and homeostasis of PCSK9: Reciprocal interaction with LDLR and additional lipid effects. *Atherosclerosis*, 2015; 238:264-270.
40. Rashid S., et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005; 102(15): p. 5374-9.
41. The ARIC Investigators. The Atherosclerosis risk in communities (ARIC)Study: design and objectives. *Am J Epidemiol*, 1989; 129:687-702.
42. Cohen J., et al. LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet*, 2005; 37: 161-5.
43. Catapano AL. and N. Papadopoulos. The safety of therapeutic monoclonal antibodies: implications for cardiovascular disease and targeting the PCSK9 pathway. *Atherosclerosis*, 2013; 228(1): p. 18-28

44. Leander K., et al. Circulating PCSK9 predicts future risk of cardiovascular events independently of established risk factors. *Circulation*, 2016; 133(13):1230-9.
45. Chernogubova E., et al. Common and low-frequency genetic variants in the pcsk9 locus influence circulating pcsk9 levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012; 32:1526-1534.
46. Ridker M., et al. Plasma proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 levels and the risk of first cardiovascular events. *Eur Heart J*, 2016; 37: 554-560.
47. Gencer B., et al. Prognostic value of PCSK9 levels in patients with acute coronary syndromes. *Eur Heart J*, 2016; 37:546-553.
48. World heart organization study group. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. World Heart organization Technical report series, Geneva, Switzerland,1990:797.
49. Trichopoulos D., Lagiou P. Dietary patterns and mortality. *Br J Nutr*, 2001; 85:33-34.
50. Rudkowska I.& Jones PJ. Functional foods for the prevention and treatment of cardiovascular diseases: cholesterol and beyond. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2007; 5:477-490.
51. Santosa S., et al. Physiological and therapeutic factors affecting cholesterol metabolism: does a reciprocal relationship between cholesterol absorption and synthesis really exist? *Life Sci*, 2007; 80:505-514.
52. Li S, Li JJ. PCSK9: A key factor modulating atherosclerosis. *J Athero scler Thromb*, 2015; 22:221–230
53. Cui CJ., et al. PCSK9 and its modulation. *Clin Chim Acta*, 2015; 440:79-86.
54. Urban D., Poss J., Bohm M., et al. Targeting the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 for the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 2013; 62:1401–1408.

55. Lagace TA. PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Curr Opin Lipidol*, 2014; 25:387– 393.
56. Costet P., et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem*, 2006; 281:6211-8.
57. Cariou B., et al. Plasma PCSK9 concentrations during an oral fat load and after short term high-fat, high-fat high-protein and high-fructose diets. *Nutr Metab (Lond)*, 2013. 8;10(1):4.
58. Richard C., et al. Effect of the Mediterranean diet with and without weight loss on surrogate markers of cholesterol homeostasis in men with the metabolic syndrome. *Br J Nutr*, 2012; 107:705-711.
59. Bjermo H., et al. Effects of n-6 PUFAs compared with SFAs on liver fat, lipoproteins, and inflammation in abdominal obesity: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 2012; 95(5):1003-1012.
60. WMA, 2000. Declaration of Helsinki- Ethical Principles for Medical Research involving Human Subjects. [http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html.pdf?print-media-type&footer-right=\[page\]/\[topage\]](http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html.pdf?print-media-type&footer-right=[page]/[topage]). Accessed 15/2/2016.
61. Panagiotakos DB., et al. Dietary patterns: a Mediterranean diet score and its relation to clinical and biological markers of cardiovascular disease risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2006;16(8):559-68.
62. Human Proprotein Convertase 9/pcsk9 Quantikine ELISA Kit. R&D Systems. Accessed at 07-06-2017.
63. Ng M., Fleming T., Robinson M., et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 2014; 384: 766-81.

64. Horton JD., Cohen JC., Hobbs HH. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci*, 2007; 32: 71-7.
65. Klop B., Elte JW., Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*, 2013; 5: 1218-40.
66. Seifalian AM., Filippatos TD., Joshi J., Mikhailidis DP. Obesity and arterial compliance alterations. *Curr Vasc Pharmacol*, 2010; 8: 155-68.
67. Esser N., Legrand-Poels S., Piette J., Scheen AJ., Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014; 105: 141-50.
68. Filippatos TD., Randeve HS., Derdemezis CS., Elisaf MS., Mikhailidis DP. Visfatin/PBEF and atherosclerosis-related diseases. *Curr Vasc Pharmacol*, 2010; 8: 12-28.
69. Sullivan S., Fabbrini E., Horton JD., Korenblat K., Patterson BW., Klein S. Lack of a relationship between plasma PCSK9 concentrations and hepatic lipoprotein kinetics in obese people. *Transl Res*, 2011; 158: 302-6.
70. Li S., Xu RX., Zhang Y., et al. Relation of resistin to proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 levels in coronary artery disease patients with different nutritional status. *J Endocrinol Invest*, 2015; 38: 1291-9.
71. Kwakernaak AJ., Lambert G., Muller Kobold AC., Dullaart RP. Adiposity blunts the positive relationship of thyrotropin with proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 levels in euthyroid subjects. *Thyroid*, 2013; 23: 166-72.
72. Ruscica M., Ferri N., Macchi C., et al. Liver fat accumulation is associated with circulating PCSK9. *Ann Med*, 2016; 48: 384-91.
73. Ibarretxe D., Girona J., Plana N., et al. Circulating PCSK9 in patients with type 2 diabetes and related metabolic disorders. *Clin Investig Arterioscler*, 2016; 28: 71-8.



74. Lipari MT., et al. Furin-cleaved proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is active and modulates low density lipoprotein receptor and serum cholesterol levels. *J Biol Chem*, 2012; 287(52):43482-91.
75. Tecson KM., Panettiere-Kennedy KS., Won JI., Garg P., Olugbode O., McCullough PA. Relation between proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and directly measured low-density lipoprotein cholesterol. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2017; 30: 16-20.
76. Mayne J., Raymond A., Chaplin A., et al. Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007; 361: 451-6.
77. Filippatos TD., Panagiotakos DB., Georgousopoulou EN., et al. Mediterranean Diet and 10-year (2002-2012) Incidence of Diabetes and Cardiovascular Disease in Participants with Prediabetes: The ATTICA study. *Rev Diabet Stud*, 2016; 13: 226-35.