



**Gdański Uniwersytet Medyczny**

**Wydział Lekarski**

Monika Czaplńska

**Zaburzenia lipidowe w przewlekłej chorobie nerek  
ze szczególnym uwzględnieniem  
znaczenia polimorfizmu genu apolipoproteiny E.**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

**Promotor: dr hab. n. med. Ewa Król**

**Promotor pomocniczy: dr n. farm. Agnieszka Ćwiklińska**

Pracę wykonano w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych  
oraz w Zakładzie Chemii Klinicznej  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2019

**Pracę dedykuję moim Pacjentom**

**Składam serdeczne podziękowania**

**Promotorowi dr hab. n.med. Ewie Król**

**za wielką życzliwość, nieocenioną pomoc merytoryczną  
oraz dzielenie się wiedzą i doświadczeniem  
w trakcie tworzenia pracy doktorskiej**

**Dziękuję**

**Promotorowi Pomocniczemu dr n. farm. Agnieszce Ćwiklińskiej  
za poświęcony czas i owocną współpracę**

**Dziękuję**

**mojemu Mężowi - Michałowi  
za miłość, cierpliwość i wsparcie**

**Dziękuję**

**Rodzicom - Bernadecie i Andrzejowi  
za wychowanie oraz dany mi przykład pracowitości i uczciwości**

## SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	5
WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY.....	6
STRESZCZENIE.....	7
Wprowadzenie.....	7
Cele pracy.....	11
Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy.....	12
Wnioski.....	19
SUMMARY.....	20
Introduction.....	20
The aims of doctoral dissertation.....	23
The overview of publications which are part of dissertation.....	24
Conclusions.....	31
WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA.....	32
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY.....	35

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- ABCA1 - białko błonowe mające kasetę wiążącą ATP typu A1 (ang. *ATP-binding cassette transporter type A1*)
- APO – apolipoproteina (ang. *apolipoprotein*)
- BMI – wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*)
- C – ang. *cholesterol*
- CETP – białko przenoszące estry cholesterolu (ang. *cholesteryl ester transfer protein*)
- CH – cholesterol
- CH-C – cholesterol całkowity
- ChSN – choroba sercowo-naczyniowa
- CKD – ang. *chronic kidney disease*
- CKD-EPI – ang. *chronic kidney disease-epidemiology collaboration*
- CVD – ang. *cardiovascular disease*
- eGFR – wskaźnik przesączania kłębuszkowego (ang. *estimated glomerular filtration rate*)
- FL – fosfolipidy (ang. *phospholipids*)
- HDL – lipoproteiny o wysokiej gęstości (ang. *high density lipoproteins*)
- HMG-CoA – 3-hydroksy-3-metylo-glutarylokoenzym A (ang. *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A*)
- HSPG – proteoglikany zawierające łańcuchy siarczanu heparanu (ang. *heparin sulphateproteoglican*)
- IDL – lipoproteiny o pośredniej gęstości (ang. *intermediate density lipoproteins*)
- LCAT – lecytyna-cholesterol acylotransferaza (ang. *lecithin-cholesterol acyltransferase*)
- LDL – lipoproteiny o niskiej gęstości (ang. *low density lipoproteins*)
- LPL – lipaza lipoproteinowa (ang. *lipoprotein lipase*)
- LRP – białko pokrewne receptorowi LDL (ang. *LDL receptor-related-protein*)
- PChN – przewlekła choroba nerek
- PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)
- RCT – ang. *reverse cholesterol transport*
- SR-B1 – receptor zmiatający klasy B1 (ang. *Scavenger receptor class B type 1*)
- TC – ang. *total cholesterol*
- TG – trójglicerydy (ang. *triglycerides*)
- WHR – stosunek obwodu talii do obwodu bioder (ang. *waist-to-hip ratio*)
- VLDL – lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości (ang. *very low density lipoproteins*)
- ZTCH – zwrotny transport cholesterolu

## WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

1. **Monika Cackowska**, Agnieszka Ćwiklińska, Ewa Król, **Zaburzenia metabolizmu i funkcji lipoprotein o wysokiej gęstości w przewlekłej chorobie nerek**, Nefro. Dial. Pol. 2016; 20:11-15  
[http://www.wple.net/nefrologia/nef\\_numery-2016/a-nefro-1-2016/11-15.pdf](http://www.wple.net/nefrologia/nef_numery-2016/a-nefro-1-2016/11-15.pdf)  
punktacja ministerstwa: 5
2. **Monika Czaplińska**, Agnieszka Ćwiklińska, Monika Sakowicz-Burkiewicz, Ewa Wieczorek, Agnieszka Kuchta, Robert Kowalski, Barbara Kortas-Stempak, Alicja Dębska-Ślizień, Maciej Jankowski, Ewa Król, **Apolipoprotein E gene polymorphism and renal function are associated with apolipoprotein E concentration in patients with chronic kidney disease**, Lipids Health Dis 2019; 18(1):60  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6408819/>  
punktacja IF: 2,663  
punktacja ministerstwa: 25
3. **Monika Czaplińska**, Agnieszka Ćwiklińska, Ewa Wieczorek, Barbara Kortas-Stempak, Agnieszka Kuchta, Maciej Jankowski, Alicja Dębska- Ślizień, Ewa Król, **Korzystny wpływ statyn na stężenie apoB, współczynnika apoB/apoAI oraz cholesterolu nie-HDL jako potencjalnych markerów oceny ryzyka sercowo-naczyniowego u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo**, Nefrol. Dial. Pol. 2018; 22:141-147  
[http://www.wple.net/nefrologia/nef\\_numery-2018/a-nefro-4-2018/141-147.pdf](http://www.wple.net/nefrologia/nef_numery-2018/a-nefro-4-2018/141-147.pdf)  
punktacja ministerstwa: 5
4. Agnieszka Ćwiklińska, **Monika Cackowska**, Ewa Wieczorek, Ewa Król, Robert Kowalski, Agnieszka Kuchta, Barbara Kortas-Stempak, Anna Gliwińska, Kamil Dąbkowski, Justyna Zielińska, Alicja Dębska-Ślizień, Maciej Jankowski, **Progression of chronic kidney disease affects HDL impact on lipoprotein lipase (LPL)-mediated VLDL lipolysis efficiency**, Kidney Blood Press Res 2018; 43:970-978  
<https://www.karger.com/Article/FullText/490686>  
punktacja IF: 3,000  
punktacja ministerstwa: 25

Łączny IF prezentowanych prac: 5,66

## STRESZCZENIE

### Wprowadzenie

Biorąc pod uwagę coraz bardziej powszechne występowanie przewlekłej choroby nerek (PChN) pozwalające zaliczyć ją do chorób cywilizacyjnych oraz mając na uwadze istotną rolę zaburzeń lipidowych w rozwoju miażdżycy, która w PChN jest przyspieszona i przyczynia się do wysokiej śmiertelności z powodu chorób sercowo-naczyniowych (ChSN), badania metabolizmu lipidów w PChN wydają się mieć ogromne znaczenie[1-5].

Zaburzenia gospodarki lipidowej w PChN pojawiają się już w początkowych stadiach choroby i nasilają się wraz ze spadkiem filtracji kłębuszkowej[6]. Najbardziej charakterystyczną nieprawidłowością w tej populacji chorych jest hipertriglicerydemia, która rozwija się głównie w skutek upośledzonego osoczowego katabolizmu lipoprotein bogatych w triglicerydy (TG) - lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) oraz chylomikronów[7]. Zahamowanie metabolizmu tychże lipoprotein jest wywołane przede wszystkim obniżoną aktywnością lipazy lipoproteinowej (LPL) oraz zaburzeniem ich składu, m.in. wzrostem stężenia apolipoproteiny CIII (APOCIII). LPL uczestniczy w hydrolizie TG, w wyniku której powstają wolne kwasy tłuszczowe i glicerol. APOCIII hamuje działanie LPL poprzez hamowanie wiązania enzymu z lipoproteinami bogatymi w TG[8]. Chylomikrony i VLDL, uwalniając TG, zmniejszają swoją objętość, a następnie są przekształcane odpowiednio w cząsteczki resztkowe chylomikronów oraz lipoproteiny o pośredniej (IDL). IDL w osoczu są poddawane dalszej lipolizie pod wpływem lipazy wątrobowej i ulegają przekształceniu do lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), które stanowią główne źródło cholesterolu (CH) dla tkanek obwodowych i wątroby[9]. W wyniku metabolizmu VLDL i IDL poza TG z lipoprotein zostają uwolnione również fosfolipidy (FL) oraz apolipoproteiny A (APOA), które są przenoszone na lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL) i biorą udział w ich dojrzewaniu. Z cząsteczek HDL do VLDL są natomiast przekazywane: apolipoproteina E (APOE) oraz apolipoproteina CII (APOCII) i APOCIII. Ponadto, TG z cząsteczek VLDL są wymieniane na estry cholesterolu z HDL przy udziale osoczowego białka przenoszącego estry cholesterolu (CETP)[10]. U pacjentów z PChN obserwowano zwiększoną aktywność CETP, co prowadzi do obniżenia stężenia cholesterolu-HDL (HDL-CH)[11].

Główną funkcją HDL jest przenoszenie estrów cholesterolu z tkanek obwodowych i ścian naczyń krwionośnych do wątroby, proces ten nazywany jest zwrotnym transportem cholesterolu (ZTCH)[12]. Z uwagi na udział HDL w ZTCH oraz działanie antyoksydacyjne,

przeciwzapalne, przeciwzakrzepowe, fibrynolityczne i wazodylatacyjne (tzw. działanie plejotropowe), lipoproteiny te pełnią w organizmie ważną rolę przeciwmiażdżycową[13]. Na podstawie wyników licznych badań wykazano, iż w PChN dochodzi nie tylko do zmniejszenia stężenia HDL-CH wraz ze spadkiem przesączania kłębuszkowego, ale także do zmian w składzie tych lipoprotein, co prowadzi do zaburzeń ich funkcji [3-4][14-15]. W populacji chorych z upośledzoną funkcją wydalniczą nerek wydajność ZTCH jest zmniejszona[16]. Uważa się, że jest to związane m.in. z zahamowaniem syntezy kluczowych dla tego procesu APOAI i APOE oraz lecytyna-cholesterol acylotransferazy (LCAT) w wątrobie[16]. LCAT jest enzymem biorącym udział w estryfikacji wolnego cholesterolu, co umożliwia jego transport w surowicy[17]. APOAI jest białkiem niezbędnym do syntezy HDL, jego istotna rola polega także na aktywacji LCAT[18]. Dodatkowo, w PChN stwierdzano również upośledzenie działania oksydacyjnego, przeciwzapalnego, wazodylatacyjnego oraz antyagregacyjnego HDL[14].

Zaburzenia lipidowe w PChN są wielokierunkowe, dotyczą wszystkich klas lipoprotein i wzajemnie się nasilają[6][9]. Najdokładniej zostały poznane u osób ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych hemodializą i dializą otrzewnową[4][8]. U pacjentów z PChN leczonych zachowawczo mechanizm powstawania nieprawidłowości w metabolizmie lipidów nie został jednoznacznie określony. Ostatnie badania podkreślają kluczową rolę dysfunkcyjnych cząsteczek HDL w PChN, które inicjują zahamowanie katabolizmu pozostałych lipoprotein, jednakże wymaga to potwierdzenia w dalszych badaniach klinicznych z udziałem dużej liczby chorych[13-14]. Ponadto, zwraca się uwagę nie tylko na zmiany dotyczące głównego składnika HDL, jakim jest APOAI, ale także na zaburzenia APOE, która – jak dowodzą najnowsze badania - pełni kluczową funkcję w metabolizmie lipidów[20][25]. Rola APOE w zaburzeniach lipidowych w PChN w okresie przeddializacyjnym nie została poznana.

APOE występuje we wszystkich klasach lipoprotein osocza poza małymi gęstymi cząsteczkami LDL i odgrywa znaczącą rolę w metabolizmie lipidów[19]. Jako składnik HDL bierze udział we wszystkich etapach ZTCH – APOE łącząc się z białkiem błonowym mającym kasetę wiążącą ATP typu A1 (ABCA1), umożliwia wiązanie się HDL z komórkami tkanek obwodowych; aktywując LCAT, przyspiesza estryfikację CH oraz będąc ligandem dla receptora zmiatającego klasy B1 (SR-B1) i receptora LDL, uczestniczy w przekazywaniu estrów cholesterolu z HDL do hepatocytów. Ponadto, APOE uczestniczy w wychwycie cząstek resztkowych chylomikronów i VLDL z krążącej krwi do wątroby poprzez wiązanie się



z receptorami LDL i białkiem pokrewnym receptorowi LDL (LRP) oraz proteoglikanami zawierającymi łańcuchy siarczanu heparanu (HSPG) na komórkach wątrobowych[20]. APOE jest białkiem polimorficznym występującym najczęściej w 3 izoformach (APOE2, APOE3, APOE4), kodowanych przez 3 allele genu ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ). Odmienna budowa izoform APOE warunkuje różnice w ich zdolności do wiązania się z receptorami oraz niejednakowym powinowactwie do poszczególnych klas lipoprotein, co determinuje ich różny wpływ na powstawanie zaburzeń lipidowych[21].

APOE wykazuje silne działanie przeciwmiażdżycowe potwierdzone w licznych badaniach[22-25]. Jednakże dane na temat bezpośredniego związku pomiędzy stężeniem APOE a ryzykiem rozwoju ChSN pozostają niejednoznaczne[23][26-27]. Paradoksalnie bowiem obserwowano wyższy poziom APOE w surowicy chorych z ChSN. Najnowsze badania wykazują, iż to nie wysokie całkowite stężenie APOE, a jej podwyższona zawartość w lipoproteinach bogatych w APOB (VLDL, IDL, LDL) ściśle korelowała z ryzykiem wystąpienia ChSN[28-29].

W populacji chorych ze schyłkową niewydolnością nerek wymagających leczenia nerkozastępczego metodą hemodializy oceniano wpływ polimorfizmu genu *APOE* na zaburzenia lipidowe[30-31]. Brakuje danych na temat związku między stężeniem APOE, jej dystrybucją pomiędzy lipoproteinami a polimorfizmem genu *APOE* u osób we wcześniejszych stadiach PChN. Wiedza ta pozwoliłaby na dokładniejsze poznanie patomechanizmu zaburzeń lipidowych i przyspieszonego rozwoju miażdżycy wraz z progresją PChN.

Statyny - inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metylo-glutarylokoenzymu A (HMG-CoA) - leki obniżające stężenie cholesterolu-LDL (LDL-CH) w surowicy, mają udowodnioną skuteczność w redukcji ryzyka sercowo-naczyniowego w populacji ogólnej oraz u osób z PChN[32-33]. Zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego pacjenci z PChN w stadium G3 (eGFR 59-31 ml/min/1,73m<sup>2</sup>) należą do grupy wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego, natomiast dla chorych w stadium G4 (eGFR 30-16 ml/min/1,73m<sup>2</sup>) ryzyko to określa się jako bardzo wysokie[34]. Podstawowy profil lipidowy (cholesterol całkowity (CH-C), LDL-CH, TG, HDL-CH) oznaczany rutynowo w populacji ogólnej nie odzwierciedla złożonych zaburzeń lipidowych rozwijających się w PChN. Stężenie LDL-CH nie koreluje z ryzykiem wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego w pacjentów z PChN w przeciwieństwie do populacji osób z prawidłową funkcją nerek[35]. Z tego powodu poszukuje się nowych lipidowych wskaźników dokładniej odzwierciedlających ryzyko ChSN

w tej grupie pacjentów. W populacji ogólnej stężenie APOB, cholesterolu-nie-HDL (nie-HDL-CH) oraz współczynnik APOB/APOAI koreluje z ryzykiem sercowo-naczyniowym, parametry te obniżają się w trakcie leczenia statynami[36]. Nieliczne badania oceniają wpływ inhibitorów reduktazy HMG-CoA na wspomniane parametry u pacjentów z PChN[37].

## Cele pracy

Ocena zaburzeń lipidowych u pacjentów PChN leczonych zachowawczo:

1. Ocena związku między polimorfizmem genu *APOE* a występowaniem zaburzeń lipidowych w przebiegu PChN.
2. Ocena związku między polimorfizmem genu *APOE* a stężeniem APOE w surowicy, jej dystrybucją pomiędzy lipoproteinami osocza i zaburzeniami lipidowymi u nosicieli allelu  $\epsilon 2$ .
3. Ocena związku między polimorfizmem genu *APOE* a stężeniem APOE w surowicy, jej dystrybucją pomiędzy lipoproteinami osocza i zaburzeniami lipidowymi u nosicieli allelu  $\epsilon 3$ .
4. Ocena wpływu statyn na stężenie APOB, nie-HDL-CH oraz współczynnik APOB/APOAI u pacjentów z PChN.
5. Ocena wpływu zaburzeń ilościowych i jakościowych HDL na wydajność lipolizy VLDL i ich rola w patomechanizmie hipertriglicydemii u pacjentów z PChN.

## **Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy**

### **Zaburzenia metabolizmu i funkcji lipoprotein o wysokiej gęstości w przewlekłej chorobie nerek**

W pracy poglądowej szczegółowo opisano zaburzenia ilościowe i jakościowe HDL rozwijające się w PChN, ponieważ wyniki wielu badań wskazują na istotną rolę dysfunkcji HDL w przyspieszonym rozwoju miażdżycy w tej populacji chorych[14][16].

We wstępie artykułu przedstawiono epidemiologię PChN w polskiej populacji, zwrócono uwagę na problem wysokiej śmiertelności chorych z upośledzoną funkcją wydalniczą nerek z powodu ChSN, wymieniono najczęstsze i potwierdzone w licznych badaniach zaburzenia lipidowe w PChN. W dalszej części szczegółowo omówiono budowę cząsteczki HDL, przedstawiono jej skład lipidowy i białkowy oraz funkcje poszczególnych składników. Następnie wyjaśniono, na czym polega ZTCH oraz podkreślono udział składników białkowych HDL na wszystkich etapach tegoż procesu. W kolejnej części pracy - na podstawie najnowszych oryginalnych badań - opisano mechanizm działania przeciwmiażdżycowego HDL niewynikający bezpośrednio z wpływu HDL na gospodarkę lipidową, tj. działanie plejotropowe HDL. Obejmuje ono: działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, antyagregacyjne, fibrynolityczne oraz wazodylatacyjne.

Druga część publikacji dotyczyła zaburzeń HDL, które zostały potwierdzone u pacjentów we wczesnych stadiach PChN i które nasilają się wraz z progresją choroby. Zaburzenia te są związane ze zmianami ilościowymi oraz jakościowymi HDL. W PChN dochodzi bowiem do obniżenia stężenia HDL-CH w surowicy wraz ze spadkiem przesączania kłębuszkowego. Ponadto, cząsteczki HDL u osób z PChN różnią się składem białkowym i lipidowym od HDL osób zdrowych. Nieprawidłowości strukturalne cząsteczek HDL prowadzą do zaburzenia funkcji tychże lipoprotein oraz utraty ich właściwości przeciwmiażdżycowych. Co więcej udowodniono, iż w PChN stają się one cząsteczkami o działaniu promiażdżycowym. W pracy przedstawiono wyniki badań wykazujących mniejszą wydajność ZTCH u pacjentów z PChN, wywołane m.in. obniżeniem stężenia LCAT - enzymu wchodzącego w skład HDL oraz APOAI i APOE – apolipoprotein, które umożliwiają wychwyt CH z komórek tkanek obwodowych do HDL oraz są aktywatorami LCAT. Następnie opisano

mechanizmy upośledzenia działania plejotropowego HDL w PChN oraz nabycia przez te lipoproteiny właściwości prozapalnych, utleniających oraz wazokonstrykcyjnych.

### **Apolipoprotein E gene polymorphism and renal function are associated with apolipoprotein E concentration in patients with chronic kidney disease**

Praca oryginalna po raz pierwszy przedstawia związek pomiędzy polimorfizmem genu *APOE*, stężeniem APOE w surowicy i jej dystrybucją między lipoproteinami a funkcją wydalniczą nerek u pacjentów z PChN leczonych zachowawczo. Jako że APOE ma udowodnione działanie przeciwmiażdżycowe, uznano, iż zaburzenia dotyczące tego polimorficznego białka mogą brać udział w patomechanizmie przyspieszonego rozwoju miażdżycy w populacji pacjentów z PChN[24-25].

We wstępie opisano budowę biochemiczną cząsteczki APOE, miejsce jej syntezy w organizmie oraz klasy lipoprotein osocza, w których skład wchodzi. Następnie przedstawiono rolę APOE w metabolizmie lipidów, co decyduje o jej przeciwmiażdżycowym działaniu. W dalszej kolejności wymieniono powszechnie występujące izoformy APOE (APOE2, APOE3, APOE4) kodowane przez 3 allele genu ( $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4), ich lokalizację w ludzkim genomie oraz różnice w ich budowie, które wpływają na odmienną zdolność wiązania się z receptorami i powinowactwo do poszczególnych klas lipoprotein. Wymieniono również częstości występowania tych izoform APOE w populacji kaukaskiej. Przedstawiono także wyniki badań dotyczących stężenia APOE u osób z ChSN.

Do badania spośród 2470 pacjentów włączono 90 chorych z PChN w stadium G3-G4 ( $eGFR$  59-16 ml/min/1,73m<sup>2</sup>) pozostających pod stałą opieką Poradni Nefrologicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Kryteriami wyłączenia były: cukrzyca, choroby wątroby, aktywna infekcja, białkomocz nerczycowy, czynna choroba nowotworowa, leczenie immunosupresyjne włącznie z glikokortykoterapią, leczenie heparyną z powodu jej działania aktywującego na LPL, leczenie hipolipemizujące poza statynami oraz brak zgody na udział w badaniu (88 chorych).

Badanie zostało zatwierdzone przez Niezależną Komisję Bioetyczną Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, wszyscy uczestnicy podpisali świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu. W trakcie wizyty lekarskiej oraz na podstawie dostępnej dokumentacji medycznej

uzyskano informacje na temat przyjmowanych leków, tradycyjnych czynników ryzyka ChSN (wiek, płeć, palenie tytoniu, nadciśnienie tętnicze, otyłość). W trakcie badania fizykalnego dokonywano pomiaru masy ciała, wzrostu, obwodu talii i bioder oraz trzykrotnie ciśnienia tętniczego. Obliczono wskaźnik Body Mass Index (BMI) oraz Waist-To-Hip Ratio (WHR) celem rozpoznania otyłości.

Krew do badań pobierano rano na czczo. Z surowicy izolowano VLDL metodą ultrawierowania. HDL izolowano z infranantu pozostałego po oddzieleniu VLDL przy użyciu metody precypitacji lipoprotein bogatych w APOB za pomocą heparyny i chlorku manganu. W surowicy oraz w wyizolowanych lipoproteinach VLDL i HDL dokonano pomiaru stężenia lipidów i apolipoprotein. Stężenie lipidów i apolipoprotein w (IDL+LDL) obliczono jako różnicę: [stężenie (składnika) w surowicy – stężenie w VLDL – stężenie w HDL]. Funkcję wydalniczą nerek oszacowano, mierząc stężenie kreatyniny metodą enzymatyczną oraz za pomocą wzoru eGFR CKD-EPI. Genotypowanie *APOE* wykonano, wykorzystując metodę PCR.

Badaną populację podzielono na 3 podgrupy w zależności od genotypu *APOE*: podgrupa E2 (nosiciele  $\epsilon 2\epsilon 3$ ), E3 ( $\epsilon 3\epsilon 3$ ) oraz E4 ( $\epsilon 3\epsilon 4$ ).

W podgrupie E2 całkowite stężenie APOE było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do podgrupy E3 i E4. Podobnie jak w innych badaniach osób z PChN dla całej populacji badanej nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem APOE w surowicy a współczynnikiem eGFR. Poziom APOE w surowicy pozostawał stały, niezależny od funkcji wydalniczej nerek. Jednakże po uwzględnieniu genotypu *APOE* zaobserwowano, iż stałe stężenie APOE w populacji badanej wynikało z różnych zmian jej stężenia w zależności od izoforny APOE oraz filtracji kłębuszkowej. W podgrupie E2 występowała dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem APOE a wskaźnikiem eGFR, natomiast w podgrupie E3 korelacja ta była ujemna – im niższy wskaźnik eGFR, tym poziom APOE był wyższy. Według naszej najlepszej wiedzy jest to pierwsza praca udowadniająca taką zależność.

W dalszej części artykułu opisano zmiany zawartości APOE w poszczególnych klasach lipoprotein w zależności od genotypu *APOE*. U nosicieli allelu  $\epsilon 2$  genu *APOE* wraz z pogarszaniem się funkcji wydalniczej nerek obserwowano ilości APOE w cząsteczkach HDL (APOE-HDL), APOAI, współczynnika APOE-HDL/APOAI, co prowadzi do zahamowania ZTCH. Dodatkowo, dla tej podgrupy stwierdzono redukcję zawartości APOE w cząsteczkach

IDL+LDL przy stałej zawartości APOB w tych lipoproteinach, co świadczy o ich niezmięnionej liczbie w surowicy. Zmiany te skutkują ich zmniejszonym wychwytem z krążącej krwi do wątroby, ponieważ APOE jest ligandem dla receptorów dla LDL i LRP. W konsekwencji wydłuża się czas pozostawania IDL i LDL w surowicy i w ścianach naczyń krwionośnych, co predysponuje do tworzenia się blaszek miażdżycowych. W podgrupie E2 obserwowano również mniejszą zawartość APOE w cząsteczkach VLDL, co spowolnia katabolizm tychże lipoprotein w osoczu, gdyż APOE hamuje LPL. Podsumowując, zmiany dystrybucji APOE u nosicieli allelu  $\epsilon 2$  niekorzystnie wpływają na gospodarkę lipidową i mogą przyspieszać rozwój miażdżycy. U nosicieli allelu  $\epsilon 3$  genu *APOE* wraz z progresją PChN stwierdzono wzrost stężenia APOE w surowicy przede wszystkim wynikający ze zwiększenia zawartości APOE w cząsteczkach nie-HDL, głównie IDL i LDL. W lipoproteinach IDL+LDL obserwowano większą ilość APOE oraz APOB, co świadczyło o ich akumulacji w surowicy. W wielu badaniach wykazano, iż zwiększona zawartość APOE w lipoproteinach zawierających APOB jest związana z wyższym ryzykiem rozwoju ChSN. Na tej podstawie możemy wnioskować, iż zmiany dystrybucji APOE dla podgrupy E3 również negatywnie wpływają na metabolizm lipidów oraz mogą zwiększać prawdopodobieństwo wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych.

Podsumowując, w pracy po raz pierwszy wykazano, iż u pacjentów z PChN stężenie APOE oraz jej dystrybucja pomiędzy lipoproteinami jest związana nie tylko z polimorfizmem genu *APOE*, ale także z funkcją wydalniczą nerek. W oparciu o tę wiedzę, zaburzenia lipidowe w PChN powinny być analizowane z uwzględnieniem polimorfizmu genu *APOE*.

### **Korzystny wpływ statyn na stężenie APOB, współczynnika APOB/APOAI oraz cholesterolu nie-HDL jako potencjalnych markerów oceny ryzyka sercowo-naczyniowego u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo**

Uważa się, że podstawowy profil lipidowy, a zwłaszcza poziom LDL-CH w surowicy, oznaczany rutynowo w populacji ogólnej celem oszacowania ryzyka rozwoju miażdżycy i powikłań sercowo-naczyniowych oraz monitorowania leczenia hipolipemizującego, nie odzwierciedla złożonych zaburzeń lipidowych w PChN. W tej populacji nie obserwuje się liniowej zależności pomiędzy wspomnianymi parametrami a ryzykiem wystąpienia ChSN czy zgonu z jej powodu zwłaszcza w zaawansowanych stadiach PChN[7]. Dotychczas

nie zostały opracowane skale oceniające ryzyko sercowo-naczyniowe dla osób z upośledzoną funkcją wydalniczą nerek. Pacjenci obciążeni PChN w stadium G3 (eGFR 30-59ml/min/1,73m<sup>2</sup>) według Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego zaliczani są do grupy wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego, zaś u chorych w stadium G4 i 5 PChN (eGFR <30ml/min/1,73m<sup>2</sup>) ryzyko to jest bardzo wysokie[34]. Według wytycznych National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDIGO) leczenia dyslipidemii z 2013 roku stężenie LDL-CH bez oceny innych czynników ryzyka ChSN nie jest właściwym parametrem szacującym ryzyko sercowo-naczyniowe oraz rozpoczynania leczenia hipolipemizującego, ponieważ w tej populacji pacjentów nie stwierdzono liniowej zależności pomiędzy poziomem LDL-CH w surowicy a ryzykiem wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego[40]. Poszukuje się nowych markerów pomocnych do oceny ryzyka zgonu z powodu ChSN u osób z PChN.

Celem badania była ocena wpływu przyjmowania statyn na poziom APOAI, APOB, współczynnika APOB/APOAI oraz nie-HDL-CH oraz ocena ich przydatności jako potencjalnych parametrów pomocnych w szacowaniu ryzyka sercowo-naczyniowego w PChN.

Grupa badawcza, kryteria wyłączenia z badania oraz metodologia badania została opisana w streszczeniu publikacji pt. *Apolipoprotein E gene polymorphism and renal function are associated with apolipoprotein E concentration in patients with chronic kidney disease*. Badaną populację podzielono na grupę: nieprzyjmujących (grupa 0, n = 42) oraz przyjmujących (grupa 1, n = 48) statyny. Wskazaniem do włączenia statyny była hipercholesterolemia, hiperlipidemia mieszana bądź rozpoznanie ChSN. Hipercholesterolemię stwierdzono u 57% (n = 51) pacjentów, hipertriglicerydemię u 27% (n = 24), hiperlipidemię mieszaną u 19% chorych (n = 17). Spośród osób leczonych statynami podwyższone stężenie CH-C obserwowano u 35% (n = 17), podwyższone stężenie TG u 27% (n = 13), hiperlipidemię mieszaną u 15% (n = 7) osób. 28 osób przyjmowało atorwastatynę, 14 osób – simwastatynę, 6 osób – rosuwastatynę. Wyodrębnione grupy pacjentów nie różniły się między sobą rozkładem płci, wykształceniem, wskaźnikiem WHR i BMI, częstością występowania nadciśnienia tętniczego, palenia tytoniu, otyłością ani funkcją wydalniczą nerek mierzoną za pomocą stężenia kreatyniny w surowicy i eGFR CKD-EPI. Pacjenci leczeni statyną w porównaniu do osób nieleczonych byli starsi średnio o 5 lat, częściej mieli zdiagnozowaną ChSN oraz PChN w stadium G4.

W analizie statystycznej dla całej populacji badanej wykazano, iż wraz ze spadkiem filtracji kłębuszkowej następuje znamienny wzrost stężenia APOB, współczynnika



APOB/APOAI oraz nie-HDL-CH. Porównując grupy 0 i 1 stwierdzono statystycznie istotnie niższe stężenie CH-C, LDL-CH oraz APOB, współczynnika APOB/APOAI oraz nie-HDL-CH u pacjentów przyjmujących inhibitory reduktazy HMG-CoA.

W przeprowadzonym badaniu stwierdzono wpływ statyn na obniżenie nie tylko stężenia CH-C i LDL-CH, ale także na spadek poziomu APOB, współczynnika APOB/APOAI oraz nie-HDL-CH w surowicy pacjentów z PChN w stadium zaawansowania od G3 do G4. Analizując grupę chorych nieprzyjmujących statynę uznano, iż wśród pacjentów ze współczynnikiem APOB/APOAI > 0,65 dochodzi do istotnych zaburzeń lipidowych w porównaniu do osób z niższym stosunkiem tychże apolipoprotein. Stwierdzono, iż u tych pacjentów stężenie APOB w cząsteczkach IDL+LDL w surowicy jest istotnie statystycznie wyższe. We wcześniejszych badaniach udowodniono, iż również poziom IDL jest niezależnym czynnikiem ryzyka miażdżycy dużych naczyń. Podana wartość współczynnika APOB/APOAI może – w toku dalszych badań – okazać się pomocna w identyfikacji chorych z PChN szczególnie narażonych na przyspieszoną akcelerację miażdżycy.

### **Progression of chronic kidney disease affects HDL impact on lipoprotein lipase (LPL)-mediated VLDL lipolysis efficiency**

Patomechanizm powstawania hipertriglicydemii we wczesnych stadiach PChN jest różnorodny. Jako przyczynę podwyższonego stężenia TG uznaje się m.in. modyfikację składu VLDL – wzrost stężenia APOCIII oraz APOAII, które hamują działanie LPL, spadek poziomu APOCII, która aktywuje LPL oraz obecność osoczowych inhibitorów LPL, do których zalicza się subpopulację prekursorów HDL (pre- $\beta$ -HDL)[38]. Postuluje się, iż w populacji chorych z PChN dysfunkcja HDL może również mieć bezpośredni udział w rozwoju hipertriglicydemii[39]. Praca oryginalna, w której doktorantka była współautorem, zaprojektowana i wykonana w Zakładzie Chemii Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego miała na celu ocenę wpływu HDL na wydajność lipolizy VLDL zależnej od LPL u pacjentów z PChN.

Do badania włączono 36 chorych z PChN w stadium G3 i G4 pozostających pod opieką Poradni Nefrologicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku oraz 17 osób zdrowych. Kryteria wykluczenia były takie same jak w poprzedniej prezentowanej pracy. Badanie zostało zatwierdzone przez Niezależną Komisję Bioetyczną Gdańskiego

Uniwersytetu Medycznego, wszyscy uczestnicy podpisali świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu.

VLDL izolowano z surowicy metodą ultrawierowania. Następnie izolowano HDL z pozostałych po ultrawierowaniu VLDL infranantów metodą obejmującą precypitację lipoprotein zawierających APOB i ultrawierowanie. VLDL inkubowano z LPL w obecności albuminy jako akceptora wolnych kwasów tłuszczowych w dwóch układach - przy braku lub w obecności cząsteczek HDL. Wydajność lipolizy VLDL oceniano, określając odsetek (%) zhydrolizowanych TG.

W badaniu wykazano, iż HDL zwiększają efektywność lipolizy VLDL-TG, ten korzystny efekt zostaje jednak zaburzony w przebiegu progresji PChN. W obydwu grupach badanych stwierdzono, iż w przypadku nieobecności HDL odsetek zhydrolizowanych TG wahał się między 65 a 98% i był zależny od stężenia TG-VLDL. Obecność HDL zwiększała odsetek zhydrolizowanych TG proporcjonalnie do wzrostu stężenia TG-VLDL. Jednakże u pacjentów z PChN odsetek TG uwolnionych z VLDL po podaży HDL był statystycznie niższy niż w populacji osób zdrowych oraz obniżał się wraz ze spadkiem filtracji kłębuszkowej. U pacjentów w stadium G4 PChN stwierdzono, iż obecność HDL nie zwiększała odsetka zhydrolizowanych TG w wyniku lipolizy. Ponadto, zaobserwowano odwrotną zależność między wydajnością lipolizy a zawartością APOE i APOC w cząsteczkach VLDL. Wykazano także, iż wpływ HDL na lipolizę TG-VLDL był niezależny od przyjmowania statyn.

Podsumowując, w pracy udowodniono, iż HDL bezpośrednio zwiększają wydajność lipolizy VLDL przy udziale LPL, co jest zaburzane przez upośledzoną funkcję wydalniczą nerek. Na tej podstawie można wnioskować, że obniżenie stężenia i zmiany składu HDL są związane z rozwojem hipertriglicerydemii w PChN i że zaburzenia te wzajemnie się nasilają wraz z progresją PChN.

## Wnioski

1. Polimorfizm genu *APOE* był związany z występowaniem zaburzeń metabolizmu lipoprotein w przebiegu niewydolności nerek.
2. Obecność allelu  $\epsilon 2$  skutkowała:
  - A) spadkiem stężenia APOE w surowicy wraz z pogarszaniem się funkcji wydalniczej nerek,
  - B) zmianami ilościowymi i jakościowymi w obrębie cząstek HDL, tj. zmniejszeniem stężenia apolipoprotein AI i E oraz zmniejszeniem zawartości APOE w cząstkach HDL (obniżony indeks APOE-HDL/APOAI) wraz z pogarszaniem się funkcji wydalniczej nerek, związanymi z obniżeniem wydajności ZTCH,
  - C) zmianami jakościowymi w obrębie IDL+LDL, tj. zmniejszeniem zawartości APOE w cząstkach wraz z progresją niewydolności nerek, związanym z obniżeniem wątrobowego wychwytu lipoprotein,
  - D) zmianami jakościowymi w obrębie VLDL, tj. zwiększeniem zawartości APOE w cząstkach, związanym z obniżeniem wydajności katabolizmu tych lipoprotein.
3. Obecność allelu  $\epsilon 3$  wiązała się ze:
  - A) wzrostem stężenia APOE w surowicy wraz z progresją PChN,
  - B) wzrostem stężenia APOE i APOB we frakcjach LDL i IDL, wskazującym na akumulację promiażdżycowych cząstek lipoproteinowych w surowicy, wraz z progresją PChN.
4. Terapia statynami wpływała na spadek liczby cząstek promiażdżycowych, zawierających APOB oraz współczynnika APOB/APOAI w porównaniu do chorych nieleczonych inhibitorami HMG CoA.
5. Zaburzenia ilościowe i jakościowe HDL wiązały się z obniżeniem wydajności lipolizy VLDL i mogą być jednym z czynników odgrywających istotną rolę w rozwoju hipertriglicydemii w PChN.

## SUMMARY

### Introduction

Considering increasingly chronic kidney disease (CKD) occurrence and the crucial role of lipid disorders in atherosclerosis development, which is accelerated in CKD and leads to high mortality due to cardiovascular disease (CVD), the research on lipid metabolism in CKD seem to be indispensable[1-5].

Lipids disturbances in CKD appear at early stages of the disease and potentiate along with glomerular filtration decline. Hypertriglyceridemia is the most distinctive lipid abnormality in CKD patients, which arises mainly from impaired catabolism of lipoproteins rich in triglycerides (TG) – very low density lipoproteins (VLDL) and chylomicrons[7]. Inhibited metabolism of these lipoproteins is primarily caused by decreased activity of lipoprotein lipase (LPL) as well as the disorders of their composition including elevated concentration of apolipoprotein CIII (APOCIII). LPL participates in TG hydrolysis, as a result of this process, free fat acids and glycerol are produced. APOCIII arrests LPL activity by impeding the bond of the enzyme and lipoproteins rich in TG[8]. After TG release, the capacity of chylomicrons and VLDL is carved and they are transformed into chylomicrons remnants and intermediate density lipoproteins (IDL) respectively. IDL in serum undergo further lipolysis catabolized by hepatic lipase and transform into low density lipoproteins (LDL), which are the main source of cholesterol (C) for peripheral tissue and liver[9]. As a result of VLDL and IDL metabolism, apart from TG, phospholipids (PL) and apolipoproteins A (APOA) are being released from the lipoproteins and transferred onto high density lipoproteins (HDL) causing their maturation. Apolipoprotein E (APOE), apolipoprotein CII (APOCII), APOCIII are transmitted from HDL to VLDL particles. TG from VLDL are exchanged with cholesterol esters from HDL with the participation of cholesteryl ester transfer protein (CETP)[10]. Increased CETP activity is observed in CKD patients, which causes the reduction of cholesterol-HDL (HDL-C) concentration[11].

The primary function of HDL is carrying cholesterol esters from peripheral tissue and blood vessel walls to the liver, that process is called reverse cholesterol transport (RCT)[12]. Due to HDL participation in RCT as well as their anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-coagulative, fibrinolytic, vasodilatory activity (known as pleiotropic activity), these particles play a crucial anti-atherosclerotic role in the organism[13]. Based on numerous studies it was proven that in CKD not only decreased HDL-C level along with glomerular filtration

drop was observed, but also changes in HDL structure causing their dysfunction[3-4][14-15]. The efficiency of RCT is diminished in the population with impaired kidney function[16]. It is connected with the inhibited production of crucial for RCT APOE and APOA and lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) in the liver[16]. LCAT is an enzyme, which takes part in cholesterol esterification enabling its transport in serum[17]. APOAI is a protein essential for HDL synthesis, its important role also consists in LCAT activation[18]. Additionally, the impairment of anti-oxidative, anti-inflammatory, vasodilatory and fibrinolytic HDL activity was surveyed in CKD[14].

Lipid disorders in CKD are multidirectional, affects all classes of lipoproteins and increase one another[6][9]. The most accurately they were known in patients with end stage renal disease treated by hemodialysis or peritoneal dialysis[4][8]. The mechanism of the development of lipid disorders has not been evaluated in CKD patients treated conservatively so far. The last studies underlined the key role of HDL dysfunction in CKD, which initiates delayed catabolism of other lipoproteins, however it should be proven in further clinical research of large amount of patients[13-14]. Moreover, it has been paid attention not only on the changes of the main HDL component, which is APOAI but also of APOE disturbances, which – as demonstrated in the newest studies – play a crucial role in lipid metabolism[20][25]. The APOE function in lipid disorders in non-dialysed CKD population has not been known.

APOE occurs in all classes of serum lipoproteins except small dense LDL and is a key factor in lipid metabolism[19]. As a HDL component, it participates in all steps of RCT – by attaching with ATP-binding cassette transporter type A1 (ABCA1), APOE facilitates HDL and peripheral tissue cells connection; by activating LCAT, it accelerates C esterification; as a ligand for Scavenger receptor class B type 1 (SRB1) and LDL receptor, it enables the transmission of cholesterol esters from HDL to hepatocytes. Moreover, APOE assists in chylomicrons remnants and VLDL uptake from circulating blood to the liver by binding with LDL receptor and LDL receptor-related-protein (LRP) and heparin sulphateproteoglycan (HSPG) on the liver cells[20]. APOE is a polymorphic protein occurring most often in 3 isoforms (APOE2, APOE3, APOE4) coded by 3 gene alleles ( $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4). Various APOE isoforms structure conditions the differences in the ability to receptors binding and their preference in binding with respective lipoprotein classes, which determines their diverse influence on lipid disorders[21].

APOE demonstrates a potent anti-atherosclerotic activity due to its participation in lipid metabolism which has been proven in many studies[22-25]. However, data about a direct relationship between APOE level and CVD risk stay ambiguous[23][26-27]. Paradoxically, elevated APOE concentration was observed in patients with CVD. Most recent research has demonstrated that not the high total APOE level but increased APOE content in lipoproteins rich in apolipoprotein B (APOB) (VLDL, IDL, LDL) strictly correlated with the risk of incident CVD[28-29].

The impact of *APOE* gene polymorphism on lipid disorders has been evaluated in patients with end stage renal disease requiring hemodialysis[30-31]. There is a lack of data about relationship between APOE concentration, its distribution among lipoproteins and *APOE* gene polymorphism in patients at early stages of CKD. It might be helpful in more accurate understanding of the pathomechanism of lipid disturbances and accelerated atherosclerosis development in CKD non-dialysed population.

Statins - reductase 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A (HMG-CoA) inhibitors - medications decreasing cholesterol-LDL (LDL-C) concentration in serum, own proven efficacy in the reduction of cardiovascular risk in general population and in CKD patients[32-33]. According to Polish Society of Cardiology guidelines people in G3 CKD stage (eGFR 59-31ml/min/1.73m<sup>2</sup>) are at high cardiovascular risk, but for patients in G4 CKD stage (eGFR 30-16 ml/min/1.73m<sup>2</sup>) the risk is very high[34]. The basic lipid profile (total cholesterol (TC), LDL-C, TG, HDL-C) measured routinely in general population does not reflect the composite lipid disturbances developing in CKD. LDL-C level does not correlate with the risk of acute coronary syndrome in CKD patients as opposed to the population with normal kidney function[35]. For that reason, new lipid parameters strictly reflecting CVD risk are searched in CKD patients. APOB, non-HDL-C, APOB/APOAI ratio correlates with the cardiovascular risk in general population, these factors decrease during statin treatment[36]. There are only very few data available on the influence of HMG-CoA reductase inhibitors on these parameters in CKD patients[37].

## **The aims of doctoral dissertation**

The assessment of lipid disorders in CKD patients treated conservatively:

1. The evaluation of relationship between *APOE* gene polymorphism and lipid disturbances occurrence in CKD progression.
2. The assessment of *APOE* gene polymorphism, APOE concentration, its distribution among serum lipoproteins and lipid disturbances in  $\epsilon 2$  allele carriers.
3. The assessment of *APOE* gene polymorphism, APOE concentration, its distribution among serum lipoproteins and lipid disturbances in  $\epsilon 3$  allele carriers.
4. The evaluation of the influence of statin therapy treatment on APOB, non-HDL-C concentration and APOB/APOAI ratio in CKD patients.
5. The assessment of the impact of qualitative and quantitative HDL disorders on the VLDL lipolysis efficiency and their role in the pathomechanism of hypertriglyceridemia development in CKD patients.

## **The overview of publications which are part of dissertation**

### **Disturbances of high density lipoproteins metabolism and function in chronic kidney disease**

In the review article quantitative and qualitative HDL disturbances developing in CKD were described in detail because the crucial role of HDL dysfunction in accelerated atherosclerosis in that population has been demonstrated in many research[14][16].

In the introduction of the article CKD epidemiology in Polish population was presented, the attention was paid on the problem of high mortality due to CVD in patients with impaired kidney function, the most common and proven lipid disorders in CKD was mentioned. In the subsequent part of the publication the structure of HDL particle, its lipid and protein content was described, the functions of the lipoprotein ingredients were explained. Afterwards, the mechanism of RCT was elucidated and the participation of the protein components of HDL in all steps of RCT was emphasized. In the further part of the article the mechanism of anti-atherogenic HDL activity not resulting from the influence of HDL on lipid metabolism, known as pleiotropic activity, was described based on the most recent original data. It includes: anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-coagulative, fibrinolytic and vasodilatory HDL activity.

HDL abnormalities which has been proven in patients at early stages of CKD and deteriorates along with CKD progression were enlightened in the second part of the article. The HDL disturbances are connected with quantitative and qualitative changes of the lipoproteins. The decrease of HDL-C concentration together with glomerular filtration decline is observed in CKD. Furthermore, HDL particles from CKD patients differ in protein and lipid content from HDL deriving from healthy population. Structural HDL disorders lead to their dysfunction and the loss of their anti-atherogenic features. Moreover, it was demonstrated that HDL become proatherogenic particles in CKD. In the article the studies results were presented, which demonstrates lower RCT efficacy in CKD patients resulting from the reduction of LCAT – the enzyme being a part of HDL and APOAI and APOE level – apolipoproteins facilitating C uptake from peripheral tissue cells to HDL and are LCAT activators. Thereafter, the mechanism of the impairment of pleiotropic activity



and the obtainment of proinflammatory, oxidative and vasoconstrictive features by HDL in CKD was described.

### **Apolipoprotein E gene polymorphism and renal function are associated with apolipoprotein E concentration in patients with chronic kidney disease**

The relationship between *APOE* gene polymorphism, APOE concentration, its distribution among serum lipoproteins and kidney function in CKD patients treated conservatively has been presented for the first time in the original article. It was considered that APOE disturbances could participate in the pathomechanism of accelerated atherosclerosis development in CKD population due to its well-known anti-atherosclerotic activity[24-25].

In the introduction the APOE biochemical structure, the localization of its synthesis in a human organism and lipoprotein classes, in which APOE occurs were described. Then, the role of APOE in lipid metabolism, which determines its anti-atherosclerotic function was elaborated. Afterwards, the most common APOE isoforms (APOE2, APOE3, APOE4) coded by 3 gene alleles ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ), their localization in human genome as well as differences in their structure, which lead to various binding ability with receptors and affinity to respective lipoprotein classes were mentioned. The frequency of the APOE isoforms occurrence in the Caucasian population was listed. Studies results concerning APOE concentration in CVD patients were also demonstrated.

90 CKD in G3 and G4 stages patients (eGFR 59-16 ml/min/1.73m<sup>2</sup>) from among 2470 population being under the care of the Outpatient Nephrology Clinic of Medical University of Gdańsk were recruited into the study. The exclusion criteria included: diabetes, liver diseases, infections, nephrotic proteinuria, active neoplasm, immunosuppressive treatment including steroids, heparin treatment due to LPL activation, hypolipidemic medications except statins and the lack of consent for participation in the study (88 patients).

The study was approved by the Independent Bioethics Commission for Research of the Medical University of Gdańsk, all subjects gave a written consent for participation in the study. Demographic data about medications, traditional risk factors of CVD (age, sex, smoking cigarettes, hypertension, obesity) were collected during a medical appointment and based on available medical documentation. Body weight, height, a circumference

of waistline and hips as well as 3-times blood pressure were measured during the physical examination. Body Mass Index (BMI) and Waist-To-Hip Ratio (WHR) were calculated to diagnose obesity.

Blood samples were obtained after an overnight fasting in the morning. VLDL was isolated from blood serum by ultracentrifugation. HDL was isolated from infranatant after VLDL separation by precipitation of lipoproteins rich in APOB using heparin and manganese chloride. In the serum and in isolated VLDL and HDL fractions the concentration of lipids and apolipoproteins were measured. (IDL+LDL)-lipid and apolipoprotein level were calculated as a difference: [concentration (of component) in serum – concentration in VLDL – concentration in HDL]. Kidney function was evaluated by serum creatinine level measured using enzymatic method and eGFR CKD-EPI formula. *APOE* genotyping was performed by PCR.

The study population was categorized into 3 *APOE* subgroups according to *APOE* gene polymorphism: subgroup E2 ( $\epsilon 2\epsilon 3$  carriers), E3 ( $\epsilon 3\epsilon 3$ ) oraz E4 ( $\epsilon 3\epsilon 4$ ).

In the E2 subgroup total *APOE* concentration was statistically significantly higher in comparison to the E3 and E4. There was no correlation between *APOE* level and eGFR ratio for the entire study group similarly to other research of CKD patients. Serum *APOE* concentration was constant and independent of renal dysfunction. However, after adjusting the data for *APOE* genotype it occurred that stable *APOE* level in the examined population resulted from its different changes according to *APOE* isoform and also glomerular filtration. For the E2 subgroup, there was a positive correlation between *APOE* concentration and eGFR value, in contrast, for the E3 subgroup, the correlation was negative – the lower eGFR value, the higher *APOE* level. To the best of our knowledge, this is the first study presenting such a relationship.

In the next part of the article the changes of *APOE* content in all lipoprotein classes depending on *APOE* genotype were described. In  $\epsilon 2$  *APOE* gene allele carriers the decrease of *APOE* amount in HDL particles (*APOE*-HDL), *APOAI* and *APOE*/*APOAI* ratio was observed, which leads to RCT inhibition. Additionally, the reduction of *APOE* and constant *APOB* content in IDL+LDL fractions was detected, which indicates unchanged IDL +LDL number in serum. These abnormalities cause their diminished uptake from circulating blood to liver because *APOE* is a ligand for LDL receptor and LRP. Consequently, the duration of IDL and LDL staying in serum and blood vessel walls is prolonged, which predisposes

to atherogenic plaques formation. For the E2 subgroup, the lower APOE content in VLDL particles was observed, which delays the metabolism of these lipoproteins since APOE suppresses LPL. To sum up, the changes of APOE distribution in  $\epsilon 2$  APOE gene allele carriers adversely influences on lipid metabolism and might accelerate atherosclerosis development. In  $\epsilon 3$  APOE gene allele carriers there was an increase of APOE level along with CKD progression mainly resulting from higher APOE content in non-HDL fractions (especially IDL+LDL). In IDL+LDL there were elevated APOE amount, which is an evidence of their accumulation in serum. In many studies was demonstrated that increased APOE content in lipoproteins containing APOB is connected with higher risk of incident CVD. Based on that data, it was concluded that changes of APOE distribution for the E3 subgroup also negatively impacts on lipid metabolism and may escalate the probability of cardiovascular complications.

In summary, in the study it has been demonstrated for the first time, that APOE concentration and its distribution among lipoproteins is related not only with APOE gene polymorphism but also with renal function. Based on that, lipid disorders in CKD should be analyzed considering APOE genotype.

### **The beneficial influence of statins on APOB concentration, APOB/APOAI ratio and non-HDL-cholesterol as the potential markers of cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease treated conservatively**

The basic lipid profile, especially serum LDL-C, measured in general population routinely to assess the risk of development of atherosclerosis and cardiovascular complications as well as to monitor hypolipidemic treatment does not reflect composite lipid disorders in CKD. There is no linear dependency between these parameters and the risk of incident CVD or death caused due to CVD chiefly in patients with advanced CKD stages[7]. Scales evaluating cardiovascular risk for the population with impaired kidney function have not been worked out so far. Patients in G3 CKD stage (eGFR 30-59ml/min/1.73m<sup>2</sup>) are included to the group of high cardiovascular risk, but for the people in G4 and G5 CKD stage (eGFR <30ml/min/1.73m<sup>2</sup>) the risk is very high according to Polish Society of Cardiology[34]. Serum LDL-C without the assessment of other CVD risk factors is not a proper parameter to evaluate cardiovascular risk and start hypolipidemic therapy in accordance with National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDIGO) guidelines of dyslipidaemia treatment from

2013 year, because there is no linear relationship between LDL-C concentration and the risk of acute coronary syndrome in CKD population[40]. New markers to more accurately assess the probability of death because of CVD in CKD patients are searching.

The aim of the study was the assessment of statin therapy influence on APOAI, APOB, APOB/APOAI ratio and non-HDL-C concentration and the assessment of their utility as potential parameters to evaluate cardiovascular risk in CKD non-dialysed patients..

The study group, exclusion criteria and methodology was described in the summary of the article *Apolipoprotein E gene polymorphism and renal function are associated with apolipoprotein E concentration in patients with chronic kidney disease*. The examined population was divided into: non-taking (group 0, n = 42) and taking (group 1, n = 48) statins. The indication of statin therapy was: hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, mixed hyperlipidemia or diagnosed CVD. Hypercholesterolemia occurred in 57% (n = 51) patients, hypertriglyceridaemia in 27% (n = 24) and mixed hyperlipidemia in 19% (n = 17). The elevated CH-C level was observed in 35% (n = 17) participants, the elevated TG concentration in 27% (n = 13) and mixed hiperlipidemia in 15% (n = 7) among from patients treated by statins. 28 patients took atorvastatin, 14 – simvastatin and 6 – rosuvastatin. The groups of patients (0 and 1) did not differ in sex distribution, education, WHR ratio and BMI index, the frequency of hypertension, smoking cigarettes, obesity or kidney function measured by serum creatinine and eGFR CKD-EPI. Patients during statin therapy was on average 5 years older, more often had diagnosed CVD and CKD stage 4 in comparison to patients not treated by HMG-CoA reductase inhibitors.

For the whole study population it was demonstrated in statistical analysis, that APOB, non-HDL-C concentration and APOB/APOAI ratio increased along with glomerular filtration decline. For patients treated by HMG-CoA reductase inhibitors the level of CH-C, LDL-C and also APOB, non-HDL-C, APOB/APOAI ratio was statistically significantly lower compared with patients non-taking statins.

In the study the influence of statins on the reduction of not only CH-C and LDL-C level was observed but also on the decrease of APOB, non-HDL-C concentration and APOB/APOAI ratio in G3 and G4 CKD stage patients. During the analysis of patients not treated by these medications it occurred that significant lipid disorders appeared in participants with APOB/APOA ratio higher than 0,65 in comparison with patients with the lower ratio of these apolipoproteins. In patients with APOB/APOAI > 0,65 APOB amount in IDL+LDL fractions

was statistically higher. In previous research it has been proven that IDL level is also an independent risk factor of large vessels atherosclerosis. That value of APOB/APOAI ratio might – under way of further studies – become helpful in the identification of CKD patients particularly prone to accelerated atherosclerosis development.

### **Progression of chronic kidney disease affects HDL impact on lipoprotein lipase (LPL)-mediated VLDL lipolysis efficiency**

The pathomechanism of the development of hypertriglyceridemia at early stages of CKD is various. The modification of VLDL composition – increased APOCIII and APOAII level, which suppress LPL activity, reduced APOCII concentration, which activates LPL as well as the presence of serum LPL inhibitors including precursors HDL population (pre- $\beta$ -HDL) are claimed to be the reasons of elevated TG level [38]. It is postulated, that HDL dysfunction could directly participate in hypertriglyceridemia development in CKD population[39]. The original article of which the doctoral student was a co-author, planned and performed in the Department of Clinical Chemistry of Medical University of Gdańsk aimed to assess HDL influence on VLDL lipolysis mediated by LPL in CKD patients.

36 patients in CKD stages G3 and G4, being under the care of the Outpatient Nephrology Clinic of Medical University of Gdańsk and 17 healthy people were included into the study. The exclusion criteria were the same as in the previous presented article. The study was approved by the Independent Bioethics Commission for Research of the Medical University of Gdańsk, all subjects gave a written consent for participation in the study.

VLDL was isolated from the serum by ultracentrifugation. Then, HDL was isolated from infranatant after VLDL separation by precipitation of lipoproteins rich in APOB and ultracentrifugation. VLDL was incubated with LPL from albumines as free fatty acids acceptors in two mixtures – in the absence and presence of HDL. The efficiency of VLDL lipolysis was evaluated by calculation of the percentage (%) of hydrolysed TG.

In the study it was demonstrated that HDL increased the efficiency of VLDL lipolysis, however, this beneficial effect was disturbed by kidney dysfunction. In both groups it was observed that the percentage of hydrolysed TG ranged from 65 to 98% in the HDL absence and was dependent on TG-VLDL concentration. The HDL presence increased that percentage proportionally to the HDL and TG-VLDL level. Nevertheless, the percentage

of hydrolysed TG after HDL adding in CKD patients was statistically lower in comparison to healthy population as well as reduced along with the deterioration of glomerular filtration. In CKD G4 stage patients the presence of HDL did not decreased the percentage of hydrolysed TG during lipolysis. Moreover, the opposite dependence observed among lipolysis efficiency and APOE and APOC content in VLDL particles. It was demonstrated that HDL impact on TG-VLDL lipolysis was independent on statin therapy.

To sum up, we proved that HDL directly increased the efficiency of VLDL lipolysis mediated by LPL dependent TG-VLDL concentration, which is impaired by kidney dysfunction. In conclusion, the reduced concentration and composition changes of HDL are connected with the development of hypertriglyceridemia in CKD and that disturbances advance one another along with CKD progression.

## Conclusions

1. *APOE* gene polymorphism was connected with the disorders of lipoproteins metabolism in CKD.
2. The presence of  $\epsilon 2$  allele resulted in:
  - a) increase of serum APOE concentration along with deterioration of kidney dysfunction
  - b) quantitative and qualitative changes of HDL fractions: reduced APOAI and APOE level and lower APOE content in HDL particles (decreased APOE-HDL/APOAI ratio) along with CKD progression, which leads to lower RCT efficiency
  - c) quantitative changes of IDL+LDL fractions: reduced APOE content in these lipoprotein along with glomerular filtration decline causing their decreased uptake in the liver
  - d) qualitative changes of VLDL fractions: higher APOE content in these lipoprotein causing their decreased catabolism in serum.
3. The presence of  $\epsilon 3$  allele caused:
  - a) increased APOE concentration along with CKD progression
  - b) higher APOE and APOB amount in IDL+LDL fractions with eGFR decline, which evidenced of proatherogenic lipoproteins accumulation in serum
4. Statin therapy impact on the reduction of proatherogenic particles containing APOB as well as the APOB/APOAI ratio in comparison to CKD patients not treated by HMG-CoA reductase inhibitors.
5. The quantitative and qualitative disturbances of HDL was connected with decreased efficacy of VLDL lipolysis and could be one of the factors causing hypertriglyceridemia in CKD.

## WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA

- [1] Krol E, Rutkowski B, Czarniak P, Kraszewska E, Lizakowski S, Szubert R, et al. Early detection of chronic kidney disease: results of the PolNef study. *Am J Nephrol* 2009;29:264–73. doi:10.1159/000158526.
- [2] Rutkowski B, Łososowska R, Krol E, Kisielnicka E, Zdrojewski Z, Szołkiewicz M, et al. Patomechanizm hiperlipoproteinemii w przewlekłej niewydolności nerek. *Pol Merkur Lek* 2003;15:322–5.
- [3] Visconti L, Benvenga S, Lacquaniti A, Cernaro V, Bruzzese A, Conti G, et al. Lipid disorders in patients with renal failure: Role in cardiovascular events and progression of chronic kidney disease. *J Clin Transl Endocrinol* 2016;6:8–14. doi:10.1016/j.jcte.2016.08.002.
- [4] Tsimihodimos V, Dounousi E, Siamopoulos KC. Dyslipidemia in chronic kidney disease: an approach to pathogenesis and treatment. *Am J Nephrol* 2008;28:958–73. doi:10.1159/000144024.
- [5] Liu M, Li X-C, Lu L, Cao Y, Sun R-R, Chen S, et al. Cardiovascular disease and its relationship with chronic kidney disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014;18:2918–26.
- [6] Bulbul MC, Dagele T, Afsar B, Ulusu NN, Kuwabara M, Covic A, et al. Disorders of Lipid Metabolism in Chronic Kidney Disease. *Blood Purif* 2018;46:144–52. doi:10.1159/000488816.
- [7] Phukan RR, Goswami RK. Unusual Dyslipidemia in Patients with Chronic Kidney Diseases. *J Clin Diagn Res* 2017;11:BC01-BC04. doi:10.7860/JCDR/2017/24172.9220.
- [8] Attman PO, Alaupovic P, Gustafson A. Serum apolipoprotein profile of patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 1987;32:368–75.
- [9] Tsimihodimos V, Mitrogianni Z, Elisaf M. Dyslipidemia associated with chronic kidney disease. *Open Cardiovasc Med J* 2011;5:41–8. doi:10.2174/1874192401105010041.
- [10] Yamashita S, Sakai N, Hirano K, Ishigami M, Maruyama T, Nakajima N, et al. Roles of plasma lipid transfer proteins in reverse cholesterol transport. *Front Biosci* 2001;6:D366-87.
- [11] Vaziri ND. Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms, and potential consequences. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F262-72. doi:10.1152/ajprenal.00099.2005.
- [12] Kuliszkievicz-Janus M, Mohamed AS, Abod N. [The biology of HDL lipoprotein and its antisclerotic activity]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2006;60:307–15.
- [13] Rye K-A, Barter PJ. Cardioprotective functions of HDLs. *J Lipid Res* 2014;55:168–79. doi:10.1194/jlr.R039297.
- [14] Vaziri ND, Navab M, Fogelman AM. HDL metabolism and activity in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2010;6:287–96. doi:10.1038/nrneph.2010.36.
- [15] Attman PO, Alaupovic P, Tavella M, Knight-Gibson C. Abnormal lipid and apolipoprotein composition of major lipoprotein density classes in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:63–9.



- [16] Anderson JLC, Gautier T, Nijstad N, Tolle M, Schuchardt M, van der Giet M, et al. High density lipoprotein (HDL) particles from end-stage renal disease patients are defective in promoting reverse cholesterol transport. *Sci Rep* 2017;7:41481. doi:10.1038/srep41481.
- [17] Ossoli A, Simonelli S, Vitali C, Franceschini G, Calabresi L. Role of LCAT in Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2016;23:119–27. doi:10.5551/jat.32854.
- [18] Zannis VI, Fotakis P, Koukos G, Kardassis D, Ehnholm C, Jauhiainen M, et al. HDL biogenesis, remodeling, and catabolism. *Handb Exp Pharmacol* 2015;224:53–111. doi:10.1007/978-3-319-09665-0\_2.
- [19] Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S156-61. doi:10.1194/jlr.R800058-JLR200.
- [20] Phillips MC. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life* 2014;66:616–23. doi:10.1002/iub.1314.
- [21] Nguyen D, Dhanasekaran P, Nickel M, Nakatani R, Saito H, Phillips MC, et al. Molecular basis for the differences in lipid and lipoprotein binding properties of human apolipoproteins E3 and E4. *Biochemistry* 2010;49:10881–9. doi:10.1021/bi1017655.
- [22] Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1006–14. doi:10.1161/01.ATV.0000128849.12617.f4.
- [23] Mahley RW. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *J Mol Med (Berl)* 2016;94:739–46. doi:10.1007/s00109-016-1427-y.
- [24] Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988;8:1–21.
- [25] Greenow K, Pearce NJ, Ramji DP. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)* 2005;83:329–42. doi:10.1007/s00109-004-0631-3.
- [26] Corsetti JP, Gansevoort RT, Bakker SJL, Navis G, Sparks CE, Dullaart RPF. Apolipoprotein E predicts incident cardiovascular disease risk in women but not in men with concurrently high levels of high-density lipoprotein cholesterol and C-reactive protein. *Metabolism* 2012;61:996–1002. doi:10.1016/j.metabol.2011.11.010.
- [27] Mooijaart SP, Berbee JFP, van Heemst D, Havekes LM, de Craen AJM, Slagboom PE, et al. ApoE plasma levels and risk of cardiovascular mortality in old age. *PLoS Med* 2006;3:e176. doi:10.1371/journal.pmed.0030176.
- [28] Corsetti JP, Gansevoort RT, Bakker SJL, Dullaart RPF. Apolipoprotein E levels and apolipoprotein E genotypes in incident cardiovascular disease risk in subjects of the Prevention of Renal and Vascular End-stage disease study. *J Clin Lipidol* 2016;10:842–50. doi:10.1016/j.jacl.2016.03.003.
- [29] Mendivil CO, Rimm EB, Furtado J, Sacks FM. Apolipoprotein E in VLDL and LDL with apolipoprotein C-III is associated with a lower risk of coronary heart disease. *J Am Heart Assoc* 2013;2:e000130. doi:10.1161/JAHA.113.000130.
- [30] Wang Y, Wang N, Lu Y, Yu Q, Zhou L, Xu Q. Detection of Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Blood Lipid Level in Hemodialysis Patients. *J Clin Med Res*

2017;9:695–700. doi:10.14740/jocmr3046e.

- [31] Lahrach H, Essiarab F, Timinouni M, Hatim B, El Khayat S, Er-Rachdi L, et al. Association of apolipoprotein E gene polymorphism with end-stage renal disease and hyperlipidemia in patients on long-term hemodialysis. *Ren Fail* 2014;36:1504–9. doi:10.3109/0886022X.2014.949760.
- [32] Ricci G, Ciccone MM, Giordano P, Cortese F. Statins: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and cost-effectiveness analysis. *Curr Vasc Pharmacol* 2018. doi:10.2174/1570161116666180706144824.
- [33] Huang T-M, Wu V-C, Lin Y-F, Wang J-J, Shiao C-C, Chen L, et al. Effects of Statin Use in Advanced Chronic Kidney Disease Patients. *J Clin Med* 2018;7. doi:10.3390/jcm7090285.
- [34] Zdrojewski T, Jankowski P, Bandosz P, Bartus S, Chwojnicky K, Drygas W, et al. [A new version of cardiovascular risk assessment system and risk charts calibrated for Polish population]. *Kardiol Pol* 2015;73:958–61. doi:10.5603/KP.2015.0182.
- [35] Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, Manns B, Klarenbach S, Pannu N, et al. Association between LDL-C and risk of myocardial infarction in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:979–86. doi:10.1681/ASN.2012080870.
- [36] Bergmann K. Non-HDL Cholesterol and Evaluation of Cardiovascular Disease Risk. *EJIFCC* 2010;21:64–7.
- [37] Cho EY, Myoung C, Park H-S, Kim AJ, Ro H, Chang JH, et al. Efficacy of Statin Treatment in Early-Stage Chronic Kidney Disease. *PLoS One* 2017;12:e0170017. doi:10.1371/journal.pone.0170017.
- [38] Prinsen BHCMT, de Sain-van der Velden MGM, de Koning EJP, Koomans HA, Berger R, Rabelink TJ. Hypertriglyceridemia in patients with chronic renal failure: possible mechanisms. *Kidney Int Suppl* 2003:S121-4. doi:10.1046/j.1523-1755.63.s84.34.x.
- [39] Ramsamy TA, Boucher J, Brown RJ, Yao Z, Sparks DL. HDL regulates the displacement of hepatic lipase from cell surface proteoglycans and the hydrolysis of VLDL triacylglycerol. *J Lipid Res* 2003;44:733–41. doi:10.1194/jlr.M200339-JLR200.
- [40] Wanner C, Tonelli M. KDIGO Clinical Practice Guideline for Lipid Management in CKD: summary of recommendation statements and clinical approach to the patient. *Kidney Int* 2014;85:1303–9. doi:10.1038/ki.2014.31.