

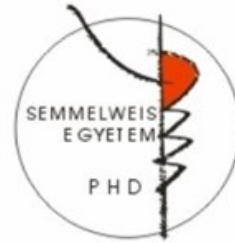
Genetikai tényezők, intrahepatikus és
intrapancreatikus lipidakkumuláció jelentősége
metabolikus kórképekben

Doktori Tézisek

Dr. Nádasi Ákos

Semmelweis Egyetem

Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Firneisz Gábor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos Bírálók: Dr. Putz Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kis János Tibor, Ph.D., főorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Gerő László, D.Sc., professor emeritus

Tagok: Dr. Békési Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Szaleczky Erika, Ph.D., szakorvos

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	3
II. Célkitűzések	4
III. Módszerek	5
Genotípus alapú visszahívásos (GBR) vizsgálati felépítés, résztvevők	5
Fenotípezés	5
<i>Klinikai adatok, klinikai laboratóriumi vizsgálatok, inzulin rezisztencia és szekréciós indexek meghatározása</i>	<i>5</i>
<i>Máj és hasnyálmirigy lipidtartalom meghatározás</i>	<i>5</i>
Statisztikai módszerek	6
IV. Eredmények	7
A vizsgált populáció	7
A <i>PNPLA3</i> rs738409 előfordulása magyar populációban	7
A HTGC összefüggései	7
A <i>PNPLA3</i> rs738409 génvariáns hatásai	7
A <i>PNPLA3</i> rs738409 genotípus hatása a máj és a hasnyálmirigy lipidfelhalmozás közötti összefüggésre	8
A PTGC összefüggései	8
A vizsgált génvariánsok hatása a hasnyálmirigy lipidtartalom és inzulinszekréció kapcsolatára	9
V. Következtetések	10
VI. Saját publikációk	12
A disszertációhoz kapcsolódó publikációk	12
A disszertációtól független publikációk	12

Rövidítések jegyzéke

AUC: görbe alatti terület

BMI (Body Mass Index): testtömegindex

DI: diszpozíciós index

GBR: genotípus alapú célzott visszahívás

GDM: terhességi cukorbetegség

FIB-4 (Fibrosis-4)

HbA_{1c}: glykált hemoglobin

HDL (high density lipoprotein): nagy sűrűségű lipoprotein

HOMA (Homeostasis Model Assessment):

HSD11B1: 11β-Hydroxysteroid dehydrogenáz 1

HTGC: máj lipidtartalom

IR: inzulin rezisztencia

ISSI-2 (insulin secretion-sensitivity index-2)

NAFLD: nem alkoholos zsírmájbetegség

MR: mágneses rezonancia

NFS: NAFLD fibrosis pont

OGTT: orális glükóz tolerancia teszt

PDFF (proton density fat fraction): proton sűrűséghez képesti lipidtartalom/lipidarány

PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain containing 3): Patatinszerű foszfolipáz domént tartalmazó protein-3

PTGC: hasnyálmirigy lipidtartalom

SNV: egyponos génvariáns

T2DM: 2-es típusú cukorbetegség

TCF7L2 (transcription factor 7 like 2)

TyG: Triglicerid Glükóz index

WFS-1 (wolframin ER transzmembrán glycoprotein)

I. Bevezetés

A 2-es típusú cukorbetegség (T2DM) és a nem alkoholos zsírmájbetegség (NAFLD) egymással, továbbá az elhízással és a dyslipidaemiával szoros kapcsolatban lévő, gyakori, népegészségügyi jelentőségű metabolikus kórképek közé tartoznak. A NAFLD és a T2DM kialakulását komplex genetikai háttér jellemzi. Az emelkedett (hepatikus) inzulin rezisztencia (IR) mindkét kórképben alapvető jelentőségű, és az éhomi glukagonszint emelkedése is jellemző. A gesztációs diabetes mellitus (GDM) a T2DM megelőző kórállapotának tekinthető.

A hasnyálmirigy elzsírosodás az elmúlt években előkerülő kórállapot, ami összefügg az elhízással, a T2DM-mel és felvetik szerepét a β -sejt diszfunkció kialakulásában is, a NAFLD-vel való kapcsolata azonban az irodalomban ellentmondásos.

A NAFLD kialakulásában és a betegség progressziójában a *PNPLA3* rs738409 génvariáns *G*-allél hatása kiemelkedő. A T2DM kialakulásában mai napig a *TCF7L2* rs7903146 variáns jelenti a legnagyobb genetikai kockázatot. A *WFS-1* rs1801214 a T2DM kialakulásával, a *HSD11B1* rs4844880 pedig a visceralis zsírszövet térfogatával asszociált.

II. Célkitűzések

Vizsgálatunk általános célkitűzése:

A máj és hasnyálmirigy lipidtartalom-növekedés, genetikai tényezők, a T2DM továbbá glükóanyagcsere és a metabolikus betegség szempontjából fontos anyagcsere-jellemzők közötti összefüggések vizsgálata.

Részletes célkitűzések:

- 1) A máj és hasnyálmirigy lipiddepozíciói kapcsolatának vizsgálata a zsírmáj kialakulására kockázatot jelentő *PNPLA3* rs738409 függvényében.
 - a) Az intrahepatikus lipidtartalom nem invazív kvantitatív meghatározása.
 - b) Az intrapancreaticus lipidtartalom nem invazív kvantitatív meghatározása.
- 2) A máj- és hasnyálmirigy lipidakkumulációk kapcsolatának vizsgálatát anyagcsereparaméterekkel összehasonlítani.
 - a) Rutin klinikai jellemzők (éhomei plazma glükóz, és lipid anyagcserére jellemző paraméterek, májenzimek, további anyagcsere paraméterek) meghatározása).
 - b) 75g OGTT során glükóz, inzulin és glukagon értékek , továbbá a T2DM kialakulásában résztvevő kórfolyamatok (inzulinrezisztencia, β -sejt diszfunkció) jellemzésére alkalmas éhomei és dinamikus indexek meghatározása.
- 3) A zsírmáj szempontjából legjelentősebb genetikai kockázati tényező, a *PNPLA3* rs738409 variáns hatásának a vizsgálata az intrahepatikus lipidakkumuláció és az anyagcseretényezők kapcsolatára.
- 4) A hasnyálmirigy lipidtartalom továbbá *TCF7L2*, *WFS-1* és *HSD11B1* variánsoknak a T2DM-hez vezető folyamatokra gyakorolt együttes hatásainak vizsgálata.

III. Módszerek

Genotípus alapú visszahívásos (GBR) vizsgálati felépítés, résztvevők

A megelőzően elvégzett, nemzetközi GDM-genetikai vizsgálat adatbázisa (>600 magyar anya 77 SNV genotípezálási eredménye) lehetővé tette a *PNPLA3* rs738409 génvariáns genotípusán alapuló célzott visszahívást 3-5 évvel az index terhességet követően. *CC* (n=323) és *GG* (n=22) homozigóták közül 102 személy megkeresésére került sor a korábbi vizsgálat résztvevői közül, végül jelen vizsgálatban a fenotípezáláson 27 *CC* és 12 *GG* genotípusú nő vett részt. Emellett a korábbi terhesség alatti GDM jelenlétére is igazítva történtek a behívások (22 esetben GDM a kórelőzményben).

Fenotípezálás

Klinikai adatok, klinikai laboratóriumi vizsgálatok, inzulin rezisztencia és szekréciós indexek meghatározása

Első megjelenéskor a GDM terhességi anamnézis, a szénhidrát anyagcserezavarra vonatkozó adatok (korábbi reklasszifikációs OGTT, gyógyszereszedés) és antropometriai adatok kerültek rögzítésre. Minden résztvevő esetén elvégezhető volt a standard 75g OGTT. Éhomi vérmintából rutin klinikai laboratóriumi vizsgálatok történtek (ideértve: májenzimek, HbA_{1c}, lipid- és húgysavszintek). Az OGTT során 0', 30' perces mintákból glükóz, inzulin és glukagon szintek, a 120' mintából pedig glükóz és inzulin szintek meghatározása történt. Éhomi IR (HOMA2-IR, TyG) és inzulin szekréciós (HOMA2-B) indexeket, dinamikus inzulin szenzitivitási (Matsuda index) és inzulin szekréciós ($AUC_{\text{inzulin}}/AUC_{\text{glükóz}}$) indexeket, továbbá (DI_{basal} és ISSI-2) diszpozíciós indexeket számoltunk, a korai glukagon választ meghatároztuk. A NAFLD progressziójának megítélése céljából a FIB-4 és NAFLD fibrosis index (NFS) meghatározását is elvégeztük.

Máj és hasnyálmirigy lipidtartalom meghatározás

A máj (HTGC) és a hasnyálmirigy (PTGC) lipidtartalmát 3T-s MR készüléken (módosított Dixon-szerű módszerrel) zsír arányos proton-denzitás hányados (PDFF) formájában határoztuk meg. A NAFLD diagnosztikája az így nyert nagy pontosságú HTGC adatok felhasználásával történt.

Statisztikai módszerek

A behívás alapját jelentő *PNPLA3* rs738409 genotípusa (*CC* vs. *GG*) és GDM terhesség jelenléte alapján képzett csoportokban végeztünk elemzéseket. A *TCF7L2* rs7903146, *WFS-1* rs1801214 és *HSD11B1* rs4844880 variánsok esetén major allél homozigóta vs minor allél hordozó csoportokat képeztünk, továbbá BMI kategóriák szerinti felosztást is alkalmaztunk. Az elemzésekhez Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, Spearman rank order (SRO) tesztekkel használtuk. Lineáris regressziós modell segítségével végeztünk interakció elemzést. Többszörös tesztelésnél az elsőfajú hiba csökkentése céljából a hamis felfedezési arány („false discovery rate”, FDR) kontrolljára Benjamini-Hochberg-féle p-korrekción használtunk. Az elemzések TIBCO Statistica (13.4.0.14, TIBCO Software Inc.) és R (4.0.4, R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria, 2021) szoftverek segítségével készültek. Minden vizsgált génvariánsra teljesült a korábbi vizsgálatban a Hardy-Weinberg equilibrium.

IV. Eredmények

A vizsgált populáció

A vizsgálatban résztvevő nők átlagéletkora 37,2 ($\pm 4,8$) év, BMI értékük 28,2 ($\pm 6,8$) kg/m² volt, kórelőzményükben 22 esetben GDM terhesség (pGDM), 17 esetben normál glükózcseréjű terhesség szerepelt. A vizsgálat során 14 személy esetén igazolódott szénhidrát anyagcserezavar (prediabetes, vagy T2DM) és 14 esetben az MR vizsgálat alapján NAFLD került megállapításra, előrehaladott fibrosis minden esetben kizárható volt. A pGDM csoportban magasabb 120' glükóz (medián: 6,6 vs 5,5 mmol/l, p=0,01) és numerikusan magasabb 120' inzulin (medián: 73,4 vs 43,6 μ U/ml, p=0,06) érték, továbbá numerikusan magasabb NAFLD (40,9% vs 29,4%) és prediabetes/diabetes előfordulási arányt (45,5% vs 23,5%) találtunk.

A *PNPLA3* rs738409 előfordulása magyar populációban

A GDM-genetikai vizsgálat során meghatároztuk a *PNPLA3* rs738409 variáns minor allél frekvenciáját (MAF) meghatározni, MAF=0,22, ami a „1000 Genomes” adatbázis európai populációjával közel egyező. Ezzel új populációgenetikai megfigyelést is tettünk.

A HTGC összefüggései

A HTGC és BMI között szignifikáns ($R=0,68$, $p=2*10^{-6}$), a HTGC és has-csípőkörfogot hányadosa között trendszerű összefüggést igazoltunk ($R=0,32$, $p=0,062$). A HTGC számos vizsgált metabolikus jellemzővel: az OGTT glükóz és inzulinértékeivel, inzulinrezisztencia-indexekkel (HOMA2-IR és TyG), éhomi glukagonszinttel, szérum triglicerid és húgysavszinttel ugyancsak direkt, a Matsuda indexszel, HDL értékkel és a korai glukagon-válasszal negatív korrelációt mutatott.

A *PNPLA3* rs738409 génvariáns hatásai

Az rs738409 *GG* genotípus csoportban magasabb, közel 3-szorosan emelkedett a HTGC a *CC* genotípusúakhoz képest (11,4 vs 3,5%, $p=0,01$). A β -sejt funkciós markerek: HOMA2-B (137,5 vs 108,1, $p=0,04$), $AUC_{\text{Inzulin}}/AUC_{\text{glükóz}}$ (10,5 vs 6,8, $p=0,061$) is magasabbak voltak a *GG* csoportban.

A *PNPLA3* rs738409 genetikai hatásával összefüggésben a BMI HTGC-re vonatkozó módosító (permisszív) hatása is megfigyelhető: 25kg/m² alatti BMI esetén ugyanis a NAFLD-re diagnosztikus PDFF küszöbértéket a kockázati homozigóta genotípus esetén sem lépte át senki.

A *CC* genotípusú személyekben megfigyelhető összefüggések: HTGC – szérumször triglicerid (TG) szoros direkt ($R=0,41$, $p=0,034$), HTGC – HDL esetén ($R=-0,56$, $p=0,006$) és HTGC – korai glukagon válasz között ($-0,43$, $p=0,026$) szoros inverz korreláció volt.

A vizsgált két éhomi inzulin rezisztencia index: HOMA2-IR és TyG kapcsolatát jelentősen befolyásolta a genotípus: csak a *CC* csoportban ($R=0,52$, $p=0,005$) volt közöttük szignifikáns összefüggés, a *GG* genotípusúakban nem. A HOMA2-IR és HTGC között genotípustól független szoros korrelációt találtunk (teljes populáció: $R=0,69$, $p=1,43 \cdot 10^{-6}$), szemben a TyG index és HTGC kapcsolatával, ahol kizárólag a *CC* csoportban volt korreláció a két paraméter között ($R=0,42$, $p=0,028$).

NAFLD esetén új megfigyelésünk, hogy az éhomi glukagonérték *PNPLA3* kockázati genotípustól függetlenül szignifikánsan magasabb ($p=3,9 \cdot 10^{-4}$).

A *PNPLA3* rs738409 genotípus hatása a máj és a hasnyálmirigy lipidfelhalmozás közötti összefüggésre

A HTGC és PTGC szoros kapcsolatát ($R=0,46$, $p=0,004$) az rs738409 genotípus számottevően befolyásolta: a *CC* csoportban megfigyelhető direkt korreláció ($R=0,67$, $p=10^{-4}$), szemben a *GG* genotípusú személyekkel, ahol a két szerv lipidakkumulációjának összefüggése eltűnik.

A PTGC összefüggései

A PTGC a BMI-vel ($R = 0,40$ $p = 0,012$) és derék-csípőkörfogot hányadossal szoros kapcsolatot mutatott ($R = 0,50$ $p = 0,002$).

A cukorbetegség diagnóza és követése szempontjából egyaránt kiemelt jelentőségű HbA_{1c} és a PTGC között terápia naív személyekben szignifikáns korrelációt igazoltunk ($R=0,58$, $p=10^{-4}$). Kiemelendő, hogy a HbA_{1c} más paraméterrel (BMI, W/H, HTGC) nem mutatott szignifikáns összefüggést. A cukorbetegség kialakulásának kockázatával összefüggő vizsgált diszpozíciós indexek és a PTGC között inverz kapcsolatot mutattunk ki (DI_{basal}: $R=-0,33$, $p=0,039$ és ISSI-2: $R=-0,35$, $p=0,028$). Az inzulinrezisztencia meghatározására alkalmazott indexek és a hasnyálmirigy lipidtartalom között direkt összefüggés állt fenn: HOMA2-IR: $R=0,42$, $p=0,008$, TyG index: $R=0,38$, $p=0,018$, a Matsuda indexszel fordított összefüggés: $R=-0,48$, $p=0,002$.

A vizsgált génvariánsok hatása a hasnyálmirigy lipidtartalom és inzulinszekréció kapcsolatára

Habár a teljes vizsgálati populációban nem találtunk összefüggést az inzulinszekréciós indexek és a lipidtartalom között, a *TCF7L2* rs7903146, *WFS1* rs1801214, *HSD11B1* rs4844880 variánsok esetén a betegségre kockázatot nem jelentő genotípusú személyekben a PTGC és HOMA2-B között (rs7903146 *CC* $R=0,51$ $p=0,022$; rs1801214 *CT+CC* $R=0,55$, $p=0,013$, rs4844880 *TA+AA* $R=0,56$, $p=0,016$), továbbá PTGC és $AUC_{\text{inzulin}}/AUC_{\text{glükóz}}$ (rs7903146 *CC* $R=0,39$ $p=0,087$; rs1801214 *CT+CC* $R=0,51$, $p=0,021$, rs4844880 *TA+AA* $R=0,47$, $p=0,048$) között találtunk szignifikáns korrelációt, azonban a kockázatot jelentő genotípusok esetén nem volt semmilyen kapcsolat. Kiemelendő továbbá az indexekre vonatkozó genetikai hatás esetén a PTGC és a *TCF7L2* variáns genotípusának szignifikáns interakciója (HOMA2-B: $p=0,001$, $AUC_{\text{inzulin}}/AUC_{\text{glükóz}}$ $p=0,013$).

V. Következtetések

- 1) A NAFLD kialakulás és a spektrumbetegség progressziója szempontjából legnagyobb genetikai hatásnagysággal rendelkező *PNPLA3* rs738409 variánsral kapcsolatban azt a populációgenetikai megállapítást tettük, hogy a kockázati (*G*) allél frekvenciája régióinkban 0,22, ami közel egyező a más európai populációban mért allélfrekvenciával és ez lehetővé teszi a génvariánsra vonatkozó nemzetközi (európai) ajánlások figyelembevételét hazánkban is.
- 2) A GBR vizsgálati tervnek köszönhetően az összetett (több végpontra célzott) munkánk alapján magyar populációban is megerősítettük a *PNPLA3* rs738409 homozigóta kockázati genotípusnak az intrahepatikus lipidtartalom emelésére (~3-szoros) vonatkozó korábbi nemzetközi adatokat. Ugyanakkor az HTGC emelő genetikai hatás tekintetében is kiemelkedő jelentőségű a BMI szerepe, ugyanis még homozigóta kockázati genotípus esetén sem magasabb a HTGC amennyiben a BMI értéke 25kg/m² alatt marad.
- 3) Arra a következtetésre jutottunk, hogy az éhomi inzulinrezisztencia mértékének meghatározására használható két, a klinikumban jól használható, „helyettesítő” marker, a HOMA2-IR és a TyG index értékei között fennálló szoros kapcsolatot az rs738409 genotípus számottevően befolyásolja: NAFLD kockázati génvariáns homozigóta hordozása esetén az összefüggés szétkapcsolódik. Eredményeink alapján a HOMA2-IR szorosabb kapcsolatban áll a máj zsírtartalommal, a két index jelentése pedig egy adott vizsgálati populációban ennek megfelelően a kockázati allélfrekvenciától nagyfokban függhet.
- 4) A NAFLD-vel asszociált éhomi hyperglukagonaemiára először vizsgáltuk az rs738409 genotípus hatását, eredményeink alapján NAFLD-ben a *PNPLA3* kockázati genotípustól függetlenül áll fenn a relatív hyperglukagonaemia.
- 5) A hasnyálmirigy lipidtartalom MR alapú meghatározását, a máj vizsgálatához hasonlóan, tudományos céllal - tudomásunk szerint – elsőként végeztük el Magyarországon. Elsőként számolunk be arról, hogy az rs738409 genotípus alapvető hatással van a máj és a hasnyálmirigy lipidtartalom közötti összefüggésre, direkt pozitív korreláció csak akkor jelentkezik, ha nincs *PNPLA3*-asszociált NAFLD kockázati genetikai hatás.

6) A HOMA2-B és az $AUC_{\text{inzulin}}/AUC_{\text{glükóz}}$ („helyettesítő” β -sejt) markerek vizsgálata során megállapítottuk, hogy a T2DM kockázati génvariánsok (*TCF7L2* rs7903146, *WFS-1* rs1801214) és a *HSD11B1* rs4844880 a intrapancreaticus lipidtartalommal közösen fejtik ki a β -sejt diszfunkciót előidéző hatásukat. A *TCF7L2* rs7903146 kockázati génvariáns esetében a PTGC és a génvariáns közötti interakciót is ki lehetett mutatni.

7) Fiatal-középkorú női populációban (fiatal anyákban), gyógyszeres (antihiperglykaemiás és lipidcsökkentő) kezelés és nemi „zavaró hatások” nélkül elsőként írtuk le, hogy a hasnyálmirigy lipidtartalom és a HbA_{1c} értéke között direkt korreláció észlelhető. A jelenség a PTGC jelentőségét tükrözheti a cukorbetegség természetes kórlefolásának korai klinikai fázisaiban.

VI. Saját publikációk

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1. **Nádasdi Á**, Gál V, Masszi T, Somogyi A, Firneisz G. PNPLA3 rs738409 risk genotype decouples TyG index from HOMA2-IR and intrahepatic lipid content. *Cardiovascular Diabetology*. 2023 Mar 21;22(1):64. DOI:10.1186/s12933-023-01792-w **IF (2021): 8,949**

2. **Nádasdi Á**, Gál V, Masszi T, Patócs A, Igaz P, Somogyi A, Firneisz G. Combined effect of pancreatic lipid content and gene variants (TCF7L2, WFS1 and 11BHSD1) on B-cell function in Middle Aged Women in a Post Hoc Analysis. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2022 Jul 27;14(1):106. DOI: 10.1186/s13098-022-00876-z **IF (2021): 5,395**

3. Rosta K, Al-Aissa Z, Hadarits O, Harreiter J, **Nádasdi Á**, Kelemen F, Bancher-Todesca D, Komlosi Z, Nemeth L, Rigo J Jr, Sziller I, Somogyi A, Kautzky-Willer A, Firneisz G. Association Study with 77 SNPs Confirms the Robust Role for the rs10830963/G of MTNR1B Variant and Identifies Two Novel Associations in Gestational Diabetes Mellitus Development. *PLOS ONE*. 2017 Jan 10;12(1):e0169781. DOI: 10.1371/journal.pone.0169781 **IF: 2,766**

A disszertációtól független publikációk

1. Firneisz G, Rosta K, Al-Aissa Z, Hadarits O, Harreiter J, **Nádasdi Á**, Bancher-Todesca Dagmar, Németh László, Igaz Péter, Rigó János, Sziller István, Kautzky-Willer Alexandra, Somogyi, Anikó. The MTNR1B rs10830963 Variant in Interaction with Pre-Pregnancy BMI is a Pharmacogenetic Marker for the Initiation of Antenatal Insulin Therapy in Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018 Dec;19(12):3734. DOI: 10.3390/ijms19123734 **IF: 4,183**

2. Firneisz Gábor, Rosta Klára, al-Aissa Zahra, **Nádasdi Ákos**, Hadarits Orsolya, Rigó János, Somogyi Anikó. A melatoninreceptor 1B rs10830963 génvariáns szerepe a terhességi cukorbetegség kialakulásában és kezelésében *Diabetologia Hungarica* 27: 2 pp. 79-90. (2019)