

Современные возможности диагностики семейной гиперхолестеринемии до появления клинических проявлений атеросклероза

В.А. Корнева¹, Т.Ю. Кузнецова¹, Т.Ю. Богословская², Р.З. Муртазина^{2,3}, А.В. Дидио^{2,3}, М.П. Серебренническая⁴, В.О. Константинов⁴, М.Ю. Мандельштам^{2,3}, В.Б. Васильев^{2,3}

¹ ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск

² ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

³ ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

⁴ ФГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», Санкт-Петербург

Абстракт

Цель. Проанализировать фенотипические особенности больных определенной семейной гиперхолестеринемией (СГХС) с отсутствием клинических проявлений и инструментальных признаков атеросклероза.

Материалы и методы. Обследовано 277 пациентов СГХС, у 94 из них диагностирована определенная СГХС согласно критериям The Dutch Lipid Clinic Network. Всем обследованным проводили анализ показателей липидного спектра, глюкозы, ЭКГ, холтеровское мониторирование ЭКГ, эхо-КС, триплексное сканирование брахиоцефальных артерий. Оценивались факторы риска (ФР) атеросклероза: избыточная масса тела (при индексе массы тела более 25 кг/м²), курение, артериальная гипертензия, у 81 пациента определен уровень Лп(а). Генетический анализ выполнен у 51 пациента (54,3%), у 21 пациента выявлена мутация в рецепторе липопротеидов низкой плотности (ЛПНП).

Результаты. Пациенты были разделены на две подгруппы: 1-я – 53 человека (56,4%) с установленным диагнозом ИБС; во 2-ю вошел 41 человек (43,6%) с СГХС без ишемической болезни сердца (ИБС) и других клинических проявлений и инструментальных признаков атеросклероза. Выборка пациентов с определенной СГХС без клинических проявлений атеросклероза по нашим данным отличалась следующими характеристиками: это лица со средним возрастом 40,3 года, преимущественно женщины (63%), с изменением липидного спектра в виде значительного повышения холестерина (средний уровень – 10,58 ммоль/л) и ЛПНП (средний – 7,83 ммоль/л), высокого уровня ЛПВП (1,62 ммоль/л), сопоставимой с лицами с СГХС и ИБС частотой встречаемости таких ФР, как курение и избыточная масса тела, меньшей частотой АГ (48% и 81% соответственно). У больных определенной СГХС не выявлено различий в типе мутаций гена рецептора ЛПНП в подгруппах при наличии ИБС и без нее.

Заключение. Обнаружение выраженной дислипидемии требует исключения СГХС даже при отсутствии клинических проявлений атеросклероза, особенно при наличии в семьеотягощенной наследственности по сердечно-сосудистой патологии.

Ключевые слова: семейная гиперхолестеринемия, ишемическая болезнь сердца.

Modern diagnostics abilities of familial hypercholesterolemia before clinical features of atherosclerosis appearance

V. A. Korneva¹, T. Yu. Kuznetsova¹, T. Yu. Bogoslovskaya², R. Z. Murtazina^{2,3}, A. V. Didio^{2,3}, M. P. Serebrenitskaya⁴, V. O. Konstantinov⁴, M. Yu. Mandelshtam^{2,3}, V. B. Vasilyev^{2,3}

¹ Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

² Institute for Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

³ St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

⁴ North-West State Medical University named after I. I. Metchnikov, St. Petersburg, Russia

Abstract

Aim. To analyze phenotypic characteristic of familial hypercholesterolemia (FH) without clinical and instrumental signs of atherosclerosis.

Methods and Materials. 277 patients with familial hypercholesterolemia (94 with certain FH) were examined. For diagnosing FH we had used The Dutch Lipid Clinic Network. For all patients lipid spectrum, glucose level, ECG, Holter monitor, echocardiography, brachiocephalic arteries ultrasound examination were performed. We had studied the frequency of "classical" cardiovascular risk factors occurrence (obesity, arterial hypertension, smoking), types of the low density lipoproteins (LDL) receptors mutations in patients with ischemic heart disease (IHD) and FH, and compared them with FH patients without clinical manifestations of atherosclerosis. In 81 patients with certain FH we had analyzed the level of Lp(a). Genetic analyze was performed in 51 patients (54.3%). In 21 patients mutations of LDL receptor were found.

Results. All group was divided into two subgroups: in the first were 53 FH patients (56.4%) with an established diagnosis of IHD; the second group consisted of 41 people (43.6%) without IHD and other clinical and instrumental signs of atherosclerosis. Patients with a certain FH without clinical manifestations of atherosclerosis had the following characteristics: the average age was 40.3 years, predominantly women (63%), the lipid spectrum was characterized as a significant increase of cholesterol (average level 10.58 mmol/l) and LDL cholesterol (average of 7.83 mmol/l), high level of HDL (1.62 mmol/l), in comparison with FH and IHD group the frequency of such factors, as smoking and body weight was the same, but lower frequency of hypertension (48% and 81% respectively). Patients with certain FH had no differences in the type of mutations of LDL receptor gene in subgroups in the presence of IHD and without it.

Conclusion. Detection of severe dyslipidemia requires the exclusion of FH, even in the absence of clinical manifestations of atherosclerosis, especially in the presence in the family history on cardiovascular disease.

Keywords: familial hypercholesterolemia, ischemic heart disease.

Введение

В «Заключении экспертов» Национального общества по изучению атеросклероза отмечается, что в России значительный процент больных семейной гиперхолестеринемией (СГХС) не диагностируется [1]. В результате данные о распространенности СГХС в России отсутствуют, хотя в некоторых регионах страны, возможно, частота гетерозиготной формы заболевания превышает мировой показатель 1:500. Необходимы алгоритмы обследования больных с целью верификации СГХС и исключения вторичной гиперлипидемии. Наиболее точным указанием на наличие у пациента СГХС является идентификация у него мутации в гене рецептора липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Этот путь, ранее бывший довольно трудоемким, сегодня с внедрением в клиническую практику автоматического секвенирования ДНК и секвенирования ДНК нового поколения становится вполне реальным. Сходные трудности в диагностике СГХС встречают исследователи не только в России, но и в других странах с генетически гетерогенным населением, где диагноз СГХС устанавливается далеко не всем лицам с заболеванием [2]. Своевременная установка диагноза СГХС требует агрессивных режимов профилактики атеросклероза для улучшения прогноза. Наиболее часто диагноз СГХС устанавливается при

появлении первых симптомов атеросклероза, в том числе острых сердечно-сосудистых событий. В то же время встречаются клинические формы СГХС, длительно протекающие без клинических проявлений атеросклероза. У этой категории больных диагноз СГХС особенно труден и адекватная профилактика атеросклероза не проводится.

СГХС – генетическое заболевание, но влияние конкретных генетических мутаций на особенности клинических проявлений СГХС неоднозначно [3, 4]. В течение ряда лет [5, 6] мы изучаем мутации, вызывающие СГХС у жителей Карелии. Нами показано своеобразие спектра мутаций у больных СГХС, проживающих в г. Петрозаводске, характеризующееся тем, что практически в каждой семье обнаруживается своя, уникальная мутация гена рецептора ЛПНП, при этом обычно подобная мутация оказывается неизвестной из других регионов страны и из других популяций мира.

Цель данного исследования – проанализировать фенотипические особенности больных определенной СГХС с отсутствием клинических проявлений и инструментальных признаков атеросклероза.

Материалы и методы

Обследовано 277 пациентов с СГХС, наблюдавшихся на базе кафедры факультетской терапии,

фтизиатрии, инфекционных болезней и эпидемиологии Петрозаводского государственного университета, у 94 из них диагностирована определенная СГХС согласно критериям The Dutch Lipid Clinic (DLC), Нидерланды [7].

Всем обследованным проводили анализ показателей липидного спектра, глюкозы, ЭКГ, холтеровское мониторирование ЭКГ (ХМ ЭКГ), эхокардиографию, триплексное сканирование брахиоцефальных артерий (ТС БЦА) на аппарате Vivid 7. Большинство обследованных были русской национальности, проживали в г. Петрозаводске и Республике Карелия. Диагноз СГХС ставили на основании следующих критериев: уровень общего холестерина (ОХС) более 7,8 ммоль/л, ЛПНП выше 4,9 ммоль/л (в исследование включали пациентов с IIa и IIb типами гиперлипидемий по Фредриксону), наличие сухожильных ксантом у обследуемого или родственников первой степени родства и отсутствие заболеваний, приводящих к развитию вторичной дислипидемии, таких как сахарный диабет, гипотиреоз, нефротический синдром и др. Анализ липидов крови проводили на анализаторе Cobas Integra 400+. Общий холестерин, холестерин ЛПНП, триглицериды (ТГ) определяли энзиматическим колориметрическим методом. Липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) определяли энзиматическим колориметрическим методом без предварительной преципитации (прямым методом).

Оценивались следующие факторы риска (ФР) атеросклероза: избыточная масса тела (при индексе массы тела более 25 кг/м²), курение, артериальная гипертензия (АГ) (повышение артериального давления $\geq 140/90$ мм рт. ст.). Пациенты младше 18 лет в исследование не включались.

Уровень липопротеида (а) (Лп(а))

Концентрация Лп(а) определялась на базе лаборатории «Инвитро» методом иммунотурбидиметрии. Кровь для исследования брали утром через 12 часов после последнего приема пищи. Нормальной считалась концентрация Лп(а) менее 0,3 г/л [8]. Уровень Лп(а) определен у 81 пациента.

Анализ ДНК

Генетический анализ выполнен у 51 пациента (54,3%), у 21 пациента выявлена мутация в рецепторе ЛПНП. В качестве материала для анализа использовали периферическую (венозную) кровь больных из Карелии, которую на льду перевозили в Санкт-Петербург. Для выделения ДНК из лейкоцитов периферической крови использовали метод Кюнцеля и соавторов [9] в модификации Белла [10] для небольших количеств крови. Для получения ДНК, как правило, использовали 700–1000 мкл замороженной крови.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на аппарате «Терцик» («ДНК-технология»,

Москва) в микропробирках объемом 0,5 мл. Для амплификации всех экзонов гена использовали праймеры, синтезированные по опубликованным последовательностям [11, 12].

ПЦР-продукты перед процедурой поиска мутаций подвергали проверочному электрофорезу в вертикальных пластинах полиакриламидного геля (80x100x1 мм). После окончания электрофореза ДНК в геле окрашивали серебром или бромистым этидием и оценивали специфичность реакции и концентрацию продукта. Исходя из этих данных, готовили образец для анализа конформационного полиморфизма одонитевых фрагментов ДНК (SSCP-анализ), который проводили на гелевом секвенаторе ALFExpress-2 (Amersham Biosciences) с применением программы ALFWIN Sequence Analyzer. Для автоматизированного SSCP-анализа использовали праймеры, меченные флуоресцентной меткой Cy5, введенной в 5-концевой нуклеотид праймера при синтезе («Синтол», Москва). Секвенирование образцов выполнено с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Статистическая обработка результатов

Использовались методы описательной статистики: расчет абсолютной и относительной частот ФР, для проверки гипотезы достоверности межгруппового различия долей использовался критерий Стьюдента для независимых выборок с различной дисперсией. Уровень значимости для принятия гипотезы о статистически значимом различии был принят равным 0,05. Статистическая обработка проводилась с помощью программы «Биостат».

Результаты

Обследовано 94 пациента с определенной формой СГХС. Генетический анализ выполнен у 51 пациента (54,3%), у 21 пациента выявлена мутация в рецепторе ЛПНП (у 14 пациентов – без клиники ИБС, у 7 – с ИБС). У 43 пациентов диагноз «определенная форма» был поставлен на основании клинических проявлений: отягощенного сердечно-сосудистого анамнеза, ранних проявлений ИБС, наличия клинических стигм СГХС.

Пациенты были разделены на две подгруппы: в 1-ю включили 53 человека (56,4%) с установленным диагнозом ИБС (средний возраст – $59,0 \pm 1,5$ года; мужчин – 30 человек (56,6%)); во 2-ю вошел 41 человек (43,6%) с СГХС без ИБС и других клинических проявлений и инструментальных признаков атеросклероза (средний возраст оказался меньше, составил $40,3 \pm 2,0$ года, $p < 0,05$; мужчин – 15 человек (36,6%)) (см. табл. 1).

Как представлено в табл. 1, в подгруппе пациентов с ИБС большая часть пациентов была старше 60 лет (50%), в то время как среди пациентов без

Таблица 1. Клинико-биохимические показатели у пациентов с определенной семейной гиперхолестеринемией в подгруппах в зависимости от наличия клинических проявлений атеросклероза

	Пациенты с СГХС и ИБС (n=53)	Пациенты с СГХС без ИБС (n=41)	p
Средний возраст	59,0±1,5	40,3±2,0	<0,000001
Возраст до 40 лет	4 (7,7%)	20 (48,7%)	<0,05
Возраст 40–60 лет	23 (43,4%)	18 (44,7%)	>0,05
Возраст старше 60 лет	26 (50%)	3 (7,9%)	<0,05
ОХС, ммоль/л	10,56±0,27	9,63±0,2	=0,01
ЛПНП, ммоль/л	7,83±0,23	7,2±0,2	=0,048
ЛПВП, ммоль/л	1,37±0,05	1,62±0,07	=0,01
ТГ, ммоль/л	1,84±0,1	1,62±0,14	=0,2
Курение	11 (20,8%)	11 (26,8%)	=0,49
ИМТ более 25 кг/м ²	41 (77,4%)	28 (68,3%)	=0,42
АГ	43 (81,1%)	20 (48,3%)	=0,007
Мужчин	30 (56,6%)	15 (36,6%)	>0,05
Женщин	23 (43,4%)	26 (63,4%)	>0,05

Примечание: СГХС – семейная гиперхолестеринемия; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ОХС – общий холестерин; ЛПНП – липопротеиды низкой плотности; ЛПВП – липопротеиды высокой плотности; ТГ – триглицериды; ИМТ – индекс массы тела; АГ – артериальная гипертензия.

ИБС 48,7% пациентов были моложе 40 лет. В то же время количество пациентов среднего возраста (40–60 лет) значительно не различалось (43,4% в 1-й подгруппе и 44,7% во 2-й, $p>0,05$).

Нами были проанализированы показатели липидного спектра в обеих группах до начала гипополипидемической терапии. Выявлены достоверно меньшие значения ОХС ($9,63\pm 0,2$ ммоль/л), ЛПНП ($7,2\pm 0,2$ ммоль/л) у лиц без ИБС по сравнению с аналогичными показателями липидного спектра у пациентов с ИБС ($10,56\pm 0,27$ и $7,83\pm 0,23$ ммоль/л соответственно, $p<0,05$). Следует также отметить, что в подгруппе пациентов с СГХС и ИБС уровень ЛПВП был значительно ниже ($1,37\pm 0,05$ ммоль/л), чем у пациентов без ИБС ($1,62\pm 0,07$ ммоль/л, $p=0,01$). По-видимому, уровень ЛПВП наряду с ОХС и ЛПНП является значимым ФР развития коронарного атеросклероза у пациентов с СГХС. Достоверного различия уровня ТГ между группами выявить не удалось.

Достоверных различий по полу между группами выявлено не было ($p=0,08$), однако, возможно, это было связано с малочисленностью выборки. Частота встречаемости пациентов с избыточной массой тела и курильщиков в обеих группах достоверно не различалась (табл. 1).

Среди «классических» ФР атеросклероза выявлено достоверно большее количество больных артериальной гипертензией (АГ) ($p=0,007$) среди

пациентов с ИБС (81,1% по сравнению с 48,3% у лиц без ИБС).

Нами также была проанализирована частота встречаемости «классических» сердечно-сосудистых ФР у пациентов с СГХС разного возраста (табл. 2).

Из представленных в табл. 2 данных видно, что у пациентов с СГХС и ИБС различного возраста частота встречаемости классических ФР меняется. Так, у лиц моложе 40 лет АГ встречается даже чаще у лиц без ИБС (33,3%) по сравнению с лицами с ИБС (25%). Частота курения и избыточной массы тела не отличается у молодых пациентов с ИБС и без коронарного атеросклероза. Значимых различий среди показателей липидного спектра также не выявлено. Однако уровень ТГ несколько выше при наличии ИБС, чем у лиц без ИБС ($2,45\pm 0,45$ ммоль/л по сравнению с $1,58\pm 0,17$ ммоль/л). Кроме того, ИБС в данном возрасте встречалась чаще у мужчин (75%), чем среди лиц без ИБС (50%) (статистически значимого различия не выявлено, что, видимо, связано с малочисленностью выборки).

У лиц среднего возраста (40–60 лет) с ИБС явно преобладают лица с АГ (81,8% по сравнению с 56,2% в подгруппе без ИБС). Среди лиц с ИБС также имеется тенденция к большему числу курильщиков и лиц с избыточной массой тела. Необходимо отметить в 1-й подгруппе тенденцию к более низкому уровню ЛПВП (при

Таблица 2. Клинико-биохимические показатели у пациентов с определенной семейной гиперхолестеринемией в подгруппах в зависимости от наличия клинических проявлений атеросклероза

Факторы риска	Моложе 40 лет		40–60 лет		40–60 лет	
	ИБС есть	ИБС нет	ИБС есть	ИБС нет	ИБС есть	ИБС нет
АГ	1 (25%)	6 (33,3%)	18 (81,8%)	9 (56,2%)	23 (88,5%)	2 (66,7%)
ИМТ более 25 кг/м ²	1 (50%)	9 (64,3%)	13 (86,7%)	9 (75,0%)	14 (73,7%)	2 (100%)
Курение	1 (33,3%)	6 (35,2%)	6 (33,3%)	4 (26,7%)	2 (8,0%)	0 (0,0)
Мужчин	3 (75,0%)	9 (50%)	8 (36,4%)	11 (64,7%)	8 (30,8%)	1 (33,3%)
Женщин	1 (25%)	9 (50%)	14 (63,6%)	6 (35,3%)	18 (69,2%)	2 (66,7%)
ОХС, ммоль/л	9,35±0,70	9,50±0,30	10,49±0,36	9,79±0,29	10,81±0,43	10,23±1,31
ЛПНП, ммоль/л	6,87±0,53	7,15±0,30	7,77±0,30	7,36±0,27	8,04±0,39	6,80±0,39
ЛПВП, ммоль/л	1,40±0,19	1,40±0,19	1,34±0,08*	1,62±0,10*	1,39±0,08	1,46±0,09
ТГ, ммоль/л	2,45±0,45	1,58±0,17	1,80±0,25	2,24±0,65	1,76±0,13	1,88±0,03
ХС-не-ЛПВП	4,69±0,01	3,91±0,53	3,84±0,33	3,99±0,41	9,38±4,84	3,70±1,5

Примечание: * – $p < 0,05$; СГХС – семейная гиперхолестеринемия, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ОХС – общий холестерин, ЛПНП – липопротеиды низкой плотности, ЛПВП – липопротеиды высокой плотности, ТГ – триглицериды, ИМТ – индекс массы тела, АГ – артериальная гипертензия, ХС-не-ЛПВП – холестерин не липопротеидов высокой плотности.

Таблица 3. Мутации гена рецептора ЛПНП у обследованных больных определенной семейной гиперхолестеринемией в подгруппах в зависимости от наличия ИБС

	Пациенты СГХС с ИБС (n=53)	Пациенты СГХС без ИБС (n=41)
Мутации	с.1340 C>G (S447C[S426C]) с.1936 C>A (L646I[L625I]) с.192del10/ins8 (Fs S65: D129X[Fs S44: D108X]) с.313+2 T>G с.1532 T>C (L511S[L490S]) с.1686del8/insT (FsW562: L568X[Fs W541: L547X]) с.618 T>G (S185R, S206R)	с.1340 C>G (S447C[S426C]) с.1936 C>A (L646I[L625I]) с.192del10/ins8 (Fs S65: D129X[Fs S44: D108X]) с.313+2 T>G с.1532 T>C (L511S[L490S]) с.1859 G>C (W620S[W599S]) с.245G>C p.Cys82Ser [p.C61S]

Примечание: СГХС – семейная гиперхолестеринемия, ИБС – ишемическая болезнь сердца.

наличия ИБС – 1,34±0,08 ммоль/л по сравнению с 1,62±0,10 ммоль/л без ИБС, $p=0,03$). Кроме того, среди лиц с ИБС преобладают женщины (63,6%).

У лиц старшей возрастной группы (старше 60 лет) при наличии ИБС также была выше частота АГ (88% по сравнению с 66,7% без ИБС). Курение и избыточная масса тела, по-видимому, в данной

возрастной группе имеют уже меньшую роль в развитии ИБС. Частота встречаемости ИБС у женщин в данной возрастной группе также выше в 2 раза. Среди показателей липидного спектра наблюдается тенденция к увеличению ЛПНП у лиц с ИБС ($8,04 \pm 0,39$ ммоль/л) по сравнению с лицами без ИБС ($6,80 \pm 0,39$ ммоль/л).

Мы проанализировали показатель «холестерин не липопротеидов высокой плотности» (ХС-нелПВП), он оказался в 3 раза выше у лиц с ИБС старшей возрастной группы.

Уровень Лп(а) определялся у 81 пациента, в 41,97% случаев (34 человека) выявлен повышенный уровень – Лп(а) > 0,3 г/л, в 58% случаев (47 человек) – Лп(а) < 0,3 г/л, в пределах нормы. У пациентов СГХС, имеющих повышенный уровень Лп(а), ИБС диагностировалась чаще: у 11 человек (32,4%) против 9 (19,1%) при нормальном уровне Лп(а), различия не достоверны ($p=0,47$). Частота встречаемости острого инфаркта миокарда (ОИМ) у пациентов с повышенным уровнем Лп(а) была статистически значимо выше, чем у лиц с нормальным уровнем: 8 (23,5%) и 4 (8,5%) соответственно (ОР 3,3 [1,1; 9,8], $p=0,03$). ОИМ у лиц моложе 40 лет был выявлен только среди лиц, имеющих повышенный уровень Лп(а): у одного мужчины (28 лет) и одной женщины (29 лет).

Генетический анализ выполнен у 51 пациента (54,3%), у 21 пациента выявлена мутация в рецепторе ЛПНП (у 14 пациентов без клиники ИБС, у 7 с ИБС) (табл. 3).

Как представлено в табл. 3, и у пациентов с ИБС,

и у пациентов без клиники ИБС могут быть выявлены мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания, или же миссенс-мутации (приводящие к замене аминокислот в последовательности рецепторного белка). Более того, ряд идентичных мутаций: с.1340 C>G (S447C[S426C]), с.1936 C>A (L646I[L625I]), с.192del10/ins8 (Fs S65: D129X[Fs S44: D108X]), с.313+2 T>G, с.1532 T>C (L511S[L490S]) – были обнаружены и в той и другой подгруппе.

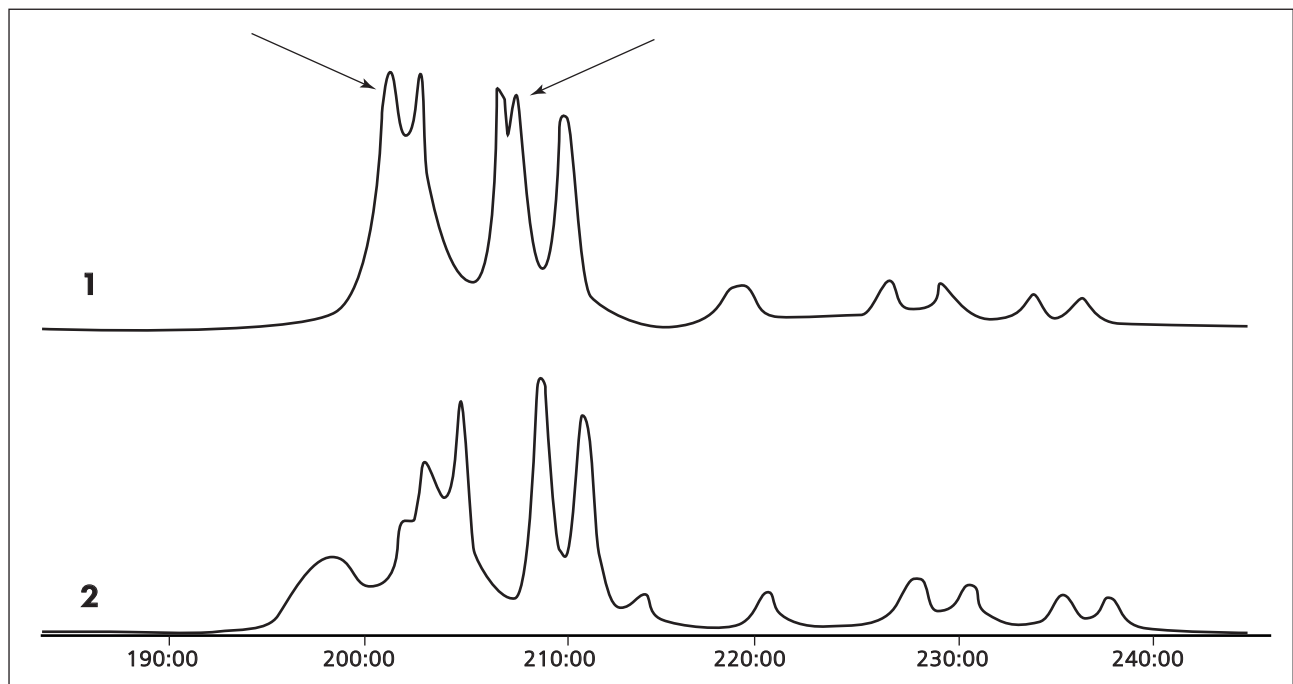
Следует отметить значительную клиническую вариабельность течения СГХС даже у пациентов – членов одной семьи, у которых выявлена сходная мутация. Так, под нашим наблюдением находились 2 сестры в возрасте 31 и 29 лет, у которых была выявлена мутация рецептора ЛПНП. Клинически у обеих выявлялась значимая дислипидемия. Старшая в возрасте 26 лет перенесла ОИМ, у младшей (отказавшейся от проведения гиполипидемической терапии в связи с планирующейся беременностью) в возрасте 29 лет выявить признаки атеросклеротического поражения сосудов какого-либо бассейна не удалось.

Ниже мы приводим клинический пример пациента, у которого была выявлена мутация рецептора ЛПНП (впервые), однако клинических проявлений атеросклероза (несмотря на тип мутации) ни у него, ни у членов его семьи выявлено не было.

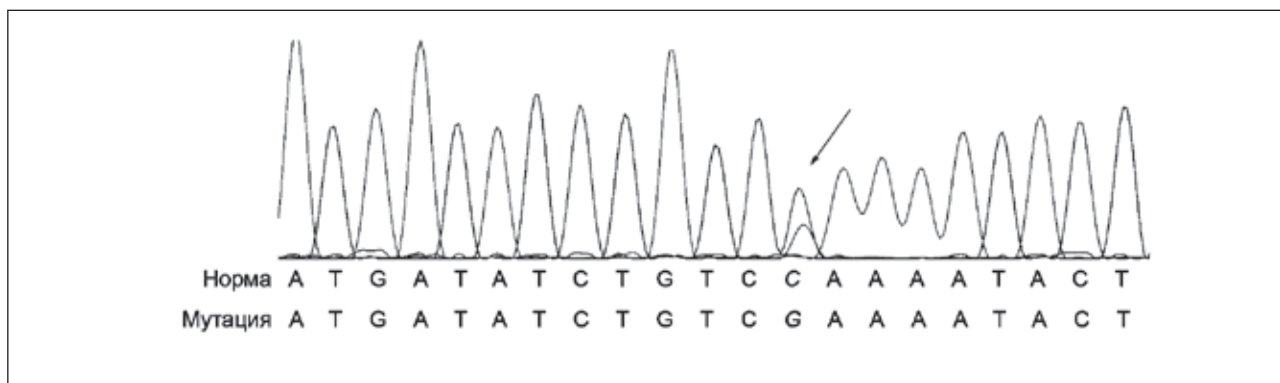
В ходе скрининга был обнаружен пациент с необычным паттерном разделения одонитевых конформеров в 13-м экзоне гена рецептора ЛПНП (рис. 1, дорожка 1).

В 13-м экзоне часто встречается однонуклео-

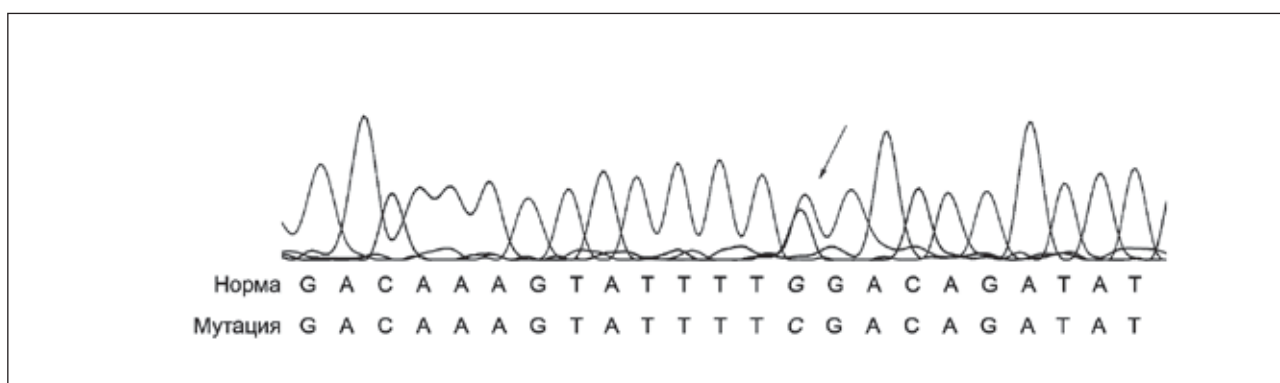
Рис. 1. Мутация с.1859 G>C в экзоне 13 гена рецептора ЛПНП



Примечание: поиск мутации с.1859 G>C в экзоне 13 гена рецептора ЛПНП методом анализа конформационного полиморфизма одонитевых фрагментов ДНК. Стрелки на дорожке 1 указывают на расположение одонитевых конформеров в образце с мутацией. Анализ проводили в 6% ПААГ при температуре 18°C.

Рис. 2. Идентификация мутации с.1859 G>C методом секвенирования

Примечание: идентификация мутации с.1859 G>C методом секвенирования. Показан результат секвенирования смысловой нити экзона 13 образца с мутацией. Под рисунком выписаны нормальная и мутантная последовательности гена рецептора ЛНП. Место несовпадения смысловой нити экзона 13 образца с мутацией при наложении на хроматограмме указано стрелкой.

Рис. 3. Идентификация мутации с.1859 G>C методом секвенирования

Примечание: показан результат секвенирования антисмысловой нити экзона 13 образца с мутацией. Под рисунком выписаны нормальная и мутантная последовательности гена рецептора ЛНП, место их несовпадения при наложении на хроматограмме указано стрелкой.

тидный полиморфизм, описанный в 1987 г. как Avall-ПДРФ (ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), ПААГ – полиакриламидный гель [13]. Однако выявляемый у пациента характер разделения одностебельных конформеров отличался от такового у пациентов с упомянутым SNP. По результатам секвенирования у этого пациента была охарактеризована новая мутация – с.1859 G>C (W620S [W599S]), приводящая к замене триптофана на серин (рис. 2, 3).

Мутация у данного пациента находится в гетерозиготном состоянии. Для идентификации этой мутации методом ПДРФ-анализа была подобрана эндонуклеаза рестрикции Taq I. Однонуклеотидная замена в случае мутации приводит к появлению сайта для рестрикции, при этом образуются два фрагмента длиной 196 и 90 пар нуклеотидов.

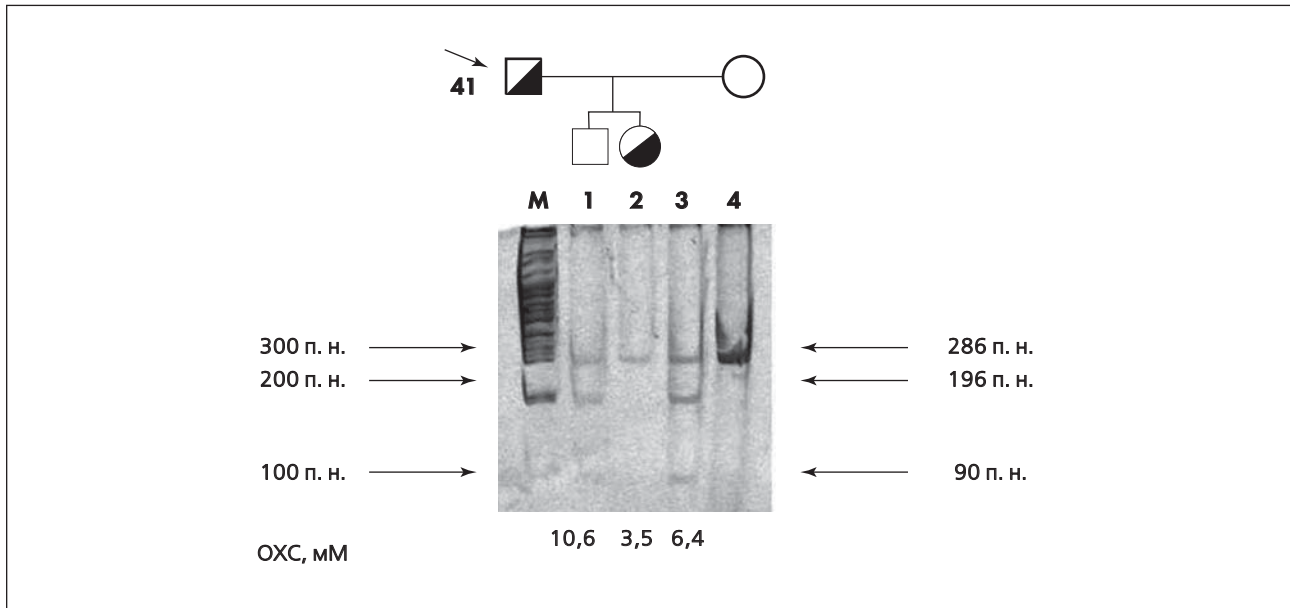
Пациент А., 44 года, русский, в прошлом житель г. Ростова-на-Дону. Знает о повышении уровня ОХС в течение 10 лет (гиполипидемическую терапию получает в течение 2 лет, с момента установки диагноза). Наследственность отягощена по сердечно-сосудистой патологии (отец умер

от инфаркта миокарда в 40 лет). Не курит. Постоянно занимается спортом. При первичном обследовании выявлены изменения липидного спектра: ОХС – 10,6 ммоль/л, ЛПНП – 8,7 ммоль/л, ЛПВП – 1,1 ммоль/л, ТГ – 1,7 ммоль/л, глюкоза – 4,2 ммоль/л, билирубин – 19,7 мкмоль/л, АЛТ – 27 Ед/л, АСТ – 23 Ед/л, креатинин – 96 мкмоль/л, мочевина – 5,7 ммоль/л, уровень Лп(а) – 0,34 г/л. Данных, указывающих на вторичную гиперлипидемию, не выявлено. Клинически установлен диагноз СГХС (по системе DLC – определенный). Наблюдается в динамике 2 года. Отмечает транзиторные подъемы АД до 170/100 мм рт. ст. в течение 1–1,5 лет. В ходе обследования диагностирована гипертоническая болезнь 1-й стадии, риск 3. Указания на перенесенный острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровоснабжения отсутствуют. В течение этого времени принимает аторвастатин в дозе 40 мг/сут. На этом фоне: ОХС – 5,6 ммоль/л, ЛПВП – 1,37 ммоль/л, ЛПНП – 3,76 ммоль/л, ТГ – 1,01 ммоль/л. От рекомендованного увеличения дозы препарата для достижения целевых цифр липидного спектра

категорически отказался в связи с появлением диспептических явлений. При осмотре ксантелазм век, липоидной дуги роговицы, ксантом сухожилий не выявлено. Индекс массы тела – 24 кг/м². По органам и системам – без особенностей. При выполнении ХМ ЭКГ, эхокардиоскопии и нагрузочного тестирования данных, указывающих на ИБС, не получено, ТС БЦА: толщина комплекса интима-медиа (ТИМ) – 0,7 мм, атеросклеротических бляшек нет.

Для выявления носителей мутации среди родственников обследованы дочь (13 лет) и сын (8 лет) пациента. При осмотре липоидной дуги роговицы, ксантом, ксантелазм век у них не выявлялось. У дочери ТИМ – 0,4 мм, ОХС – 6,4 ммоль/л, ТГ – 0,9 ммоль/л, ЛПНП – 4,8 ммоль/л, ЛПВП – 1,2 ммоль/л, АЛТ – 17,9 Ед/л, АСТ – 17,5 Ед/л, Лп(а) – 0,85 г/л. У сына ОХС – 3,5 ммоль/л, ЛПВП – 1,1 ммоль/л, ЛПНП – 2,2 ммоль/л, АСТ – 22,7 Ед/л; АЛТ – 14,6 Ед/л.

Рис. 4. Идентификация мутации с.1859 С>G методом ПДРФ-анализа



Примечание: ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов; М – маркер с шагом 100 п.н., 1, 3 – образцы с мутацией (отец и дочь), 2 – образец без мутации (сын), 4 – отрицательный контроль (образец без мутации). Слева и справа подписаны размеры фрагментов. Электрофорез проводили в 8% ПААГ, окрашивание бромистым этидием.

По результатам ПДРФ-анализа всех пациентов эта мутация была обнаружена лишь у одного про-банды. Его дочь унаследовала мутацию, а сын – нет (рис. 4). Липидные данные, представленные выше, показывают, что уровень ОХС и ЛПНП у дочери выше нормы, а у сына – нет.

Обсуждение

Для диагностики СГХС в настоящее время разработаны конкретные клинические критерии, в связи с чем установка диагноза не представляет особых трудностей. Принципиально важно обратить внимание прежде всего на выраженную гиперлипидемию, даже при отсутствии клинических проявлений атеросклероза. После выявления выраженной дислипидемии необходимо обследование для исключения вторичного ее характера, а также анализ семейного анамнеза. По нашим данным, у пациентов с выраженной дислипидемией (уровень ОХС – более 7,8 ммоль/л, ЛПНП – более 4,9 ммоль/л) вторичная дислипидемия выявляется в 88% случаев, у лиц с ОХС более 9 ммоль/л – в 69% [14].

Диагноз определенной СГХС устанавливали на бальной основе согласно критериям DLC на основании уровня дислипидемии, характерных стигм СГХС – наличия ксантом, ксантелазм, липоидной дуги роговицы, наличия коронарного и периферического атеросклероза, отягощенного семейного анамнеза. Генетический анализ выполнен у 51 пациента (54,3%), у 21 пациента выявлена мутация в рецепторе ЛПНП.

Доля пациентов с СГХС без клинических проявлений атеросклероза по нашим данным составила 43,6%. Кроме того, следует отметить значительную вариабельность частоты встречаемости «классических» коронарных факторов риска в зависимости от возраста пациентов. По данным J. Besseling, среди популяции пациентов с гетерозиготной СГХС также отмечается значительная вариабельность по риску развития ИБС. Так, было отмечено повышение риска развития ИБС у лиц с тяжелой СГХС (при уровне ЛПНП более 8 ммоль/л) по сравнению с пациентами с нетяжелой СГХС (средний уровень составил 4,7 ммоль/л) [15]. По нашим данным, у пациентов с СГХС с ИБС также отмечен

статистически более значимый уровень ЛПНП ($7,83 \pm 0,23$ ммоль/л) по сравнению с лицами без ИБС ($7,2 \pm 0,2$ ммоль/л). Кроме того, эти же авторы [15] показали обратную связь уровня ЛПВП у пациентов с СГХС и риска развития ИБС, что также соответствует полученным нами данным.

Несмотря на то что СГХС является моногенным заболеванием, скорость развития атеросклеротического поражения артерий у разных пациентов иногда значительно различается, даже среди носителей одной и той же мутации. Это связано с влиянием не только степени нарушения опосредованного рецепторами катаболизма ЛПНП у данного пациента, но и наличием других ФР, которые ассоциируются с развитием атеросклероза в общей популяции: курения, артериальной гипертонии, сахарного диабета и др. [3, 4].

По нашим данным выборка пациентов с определенной СГХС без клинических проявлений атеросклероза отличалась от пациентов с ИБС следующими характеристиками: более молодой возраст – 40,3 лет по сравнению с возрастом 59 лет при наличии ИБС, преобладали женщины (63% против 36,6%). В подгруппе пациентов с ИБС было характерно изменение липидного спектра в виде значительного повышения ОХС (средний – 10,58 ммоль/л) и ЛПНП (средний – 7,83 ммоль/л), низкого уровня ЛПВП ($1,37 \pm 0,05$ ммоль/л) по сравнению с пациентами без ИБС, где средний уровень ОХС составил $9,63 \pm 0,2$ ммоль/л ($p < 0,05$), ЛПНП – $7,2 \pm 0,2$ ммоль/л ($p < 0,05$) и ЛПВП – $1,62 \pm 0,07$ ммоль/л.

У пациентов СГХС, имеющих повышенный уровень Лп(а), ИБС диагностировалась чаще: у 32,4% по сравнению с пациентами с нормальным уровнем Лп(а) – 19,1%. Частота встречаемости ОИМ у пациентов с повышенным уровнем Лп(а) была статистически значимо выше, чем у лиц с нормальным уровнем: 23,5% и 8,5% соответственно (ОР 3,3 [1,1; 9,8], $p = 0,03$). ОИМ у лиц моложе 40 лет был выявлен только среди лиц, имеющих повышенный уровень Лп(а): у одного мужчины (28 лет) и одной женщины (29 лет). Частота встречаемости таких факторов риска, как избыточная масса тела и курение, была сопоставима в обеих группах. Среди пациентов без ИБС частота встречаемости АГ была достоверно меньше (48% и 81% соответственно). Не выявлено различий в типе мутаций гена рецептора ЛПНП среди пациентов с определенной СГХС и проявлениями ИБС и без клиники коронарного атеросклероза. У пациентов СГХС, имеющих повышенный уровень Лп(а), ИБС диагностировалась чаще: у 32,4% по сравнению с пациентами, имеющими нормальный уровень Лп(а), – 19,1%, однако различия не были достоверными ($p = 0,47$). Частота встречаемости ОИМ у пациентов с повышенным уровнем Лп(а) была статистически значимо выше, чем у лиц с нормальным Лп(а): 8 (23,5%) и 4 (8,5%) соответственно (ОР 3,3 [1,1; 9,8], $p = 0,03$). По данным

литературы, уровень Лп(а) также может оказывать влияние на риск развития ИБС у пациентов с гетерозиготной СГХС [16].

Описанная подробно в данной статье мутация с.1859 G>C была найдена у одного пациента. Она приводит к замене триптофана на серин в 620-м положении белка во втором белковом домене рецептора ЛПНП, характеризующимся чрезвычайной консервативностью аминокислотной последовательности. Этот домен белка участвует в образовании необходимой конформации лигандсвязывающего домена, обеспечивая тем самым его правильное функционирование, а также способствует освобождению лиганда в кислой среде эндосом внутри клетки [17]. Последнее осуществляется за счет того, что участок, называемый бета-пропеллером, конкурирует с ЛПНП за взаимодействие с лигандсвязывающим доменом рецептора и в кислой среде эндосом вытесняет ЛПНП из комплекса с рецептором [18]. На основании характера найденной редкой аминокислотной замены и наследования ее дочерью мы предполагаем, что найденная мутация является причиной СГХС в изученной родословной.

Проведение каскадного скрининга у пациентов с СГХС позволяет выявлять мутацию рецептора ЛПНП у молодых пациентов и, соответственно, ориентировать их на раннюю первичную профилактику атеросклероза. В рассматриваемом клиническом случае у дочери обследуемого пациента подросткового возраста наряду с выраженной дислипидемией и мутацией рецептора ЛПНП выявлено значительное повышение уровня Лп(а) – до 0,85 г/л, что также является дополнительным фактором риска развития атеросклероза [3, 8]. Интересным является то, что у дочери уровень Лп(а) был значительно выше, чем у отца (0,34 г/л), являющегося носителем той же мутации гена рецептора ЛПНП. Это, безусловно, свидетельствует о наличии дополнительных ФР, определяющих в каждом конкретном случае прогноз.

У пациента 44 лет (на момент обследования), несмотря на наличие ряда факторов риска (отягощенная наследственность, артериальная гипертония, пол, гиперхолестеринемия, повышенный уровень Лп(а)), данных, указывающих на ишемическую болезнь сердца, нет. Однако следует отметить, что в течение нескольких лет пациент получает терапию статинами в субмаксимальных дозах, что, возможно, позволяет замедлить развитие атеросклеротического процесса (в данном случае достигнуто снижение уровня ЛПНП на 50%). Прогноз у пациентов с СГХС, получающих терапию статинами, сопоставим с общей популяцией [3].

При сравнении выявленных мутаций в подгруппах больных СГХС с наличием и отсутствием ИБС убедительных особенностей не обнаружено.

Заключение

Обнаружение выраженной дислипидемии требует исключения СГХС даже при отсутствии клинических проявлений атеросклероза, особенно при наличии в семье отягощенной наследственности по сердечно-сосудистой патологии.

Выборка пациентов с определенной СГХС без клинических проявлений атеросклероза по нашим данным отличалась следующими характеристиками: это лица со средним возрастом 40,3 года, преимущественно женщины (63%), с изменением липидного спектра в виде значительного повышения холестерина (средний уровень – 10,58 ммоль/л) и ЛПНП (средний – 7,83 ммоль/л), высокого уровня ЛПВП (1,62 ммоль/л), сопоставимой с лицами с СГХС и ИБС частотой встречаемости таких ФР, как курение и избыточная масса тела, меньшей частотой АГ (48% и 81% соответственно). У пациентов СГХС, имеющих повышенный уровень Лп(а), ИБС диагностировалась чаще: у 32,4% по сравнению с пациентами с нормальным уровнем Лп(а) – 19,1%. Частота встречаемости ОИМ у пациентов с повы-

шенным уровнем Лп(а) была статистически значимо выше, чем у лиц с нормальным уровнем: 23,5% и 8,5% соответственно (ОР 3,3 [1,1; 9,8], $p=0,03$). ОИМ у лиц моложе 40 лет был выявлен только среди лиц, имеющих повышенный уровень Лп(а).

Не выявлено различий в типе мутаций гена рецептора ЛПНП среди пациентов с определенной СГХС и проявлениями ИБС и без клиники коронарного атеросклероза.

Работа выполнена в рамках программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет». Настоящее исследование поддержано грантом РФФИ №15-04-03513а. Секвенирование образцов выполнено с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

Список литературы

1. *Presidium of the Expert Council: Karpov Yu.A., Kukbarchuk V.V., Boytsov S.A. Consensus statement of the Russian National Atherosclerosis Society (RNAS). Familial hypercholesterolemia in Russia: outstanding issues in diagnosis and management. JAD. 2015;2(19):5-16. Russian (Президиум экспертного совета: Карпов Ю.А., Кухарчук В.В., Бойцов С.А. Заключение совета экспертов Национального общества по изучению атеросклероза (НОА). Семейная гиперхолестеринемия в Российской Федерации: нерешенные проблемы диагностики и лечения. АИД. 2015;2(19):5-16).*
2. *Nordestgaard B.G., Chapman M.J., Humphries S.E., Ginsberg H.N., Masana L., Descamps O.S., Wiklund O., Hegele R.A., Raal F.J., Defesche J.C., Wiegman A., Santos R.D., Watts G.F., Parhofer K.G., Hovingh G.K., Kovanen P.T., Boileau C., Av-erna M., Borén J., Bruckert E., Catapano A.L., Kuivenboven J.A., Pajukanta P., Ray K., Stalenboef A.F., Stroes E., Taskinen M.R., Tybjaerg-Hansen A. Familial hypercholesterolemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. Eur Heart J. 2013;34(45):3478-90a.*
3. *Li povecky B.M. Hereditary dyslipidemias. St. Petersburg. 2010:127. Russian (Литовецкий Б.М. Наследственные дислипидемии. СПб. 2010:127).*
4. *Kukbarchuk V.V., Malyshev P.P., Mesbkov A.N. Familial hypercholesterolemia: modern aspects of diagnosis, prevention and therapy. Cardiology. 2009;1:76-83. Russian (Кухарчук В.В., Мальшев П.П., Мешков А.Н. Семейная гиперхолестеринемия: современные аспекты диагностики, профилактики и терапии. Кардиология. 2009;1:76-83).*
5. *Komarova T.Yu., Golovina A.S., Grudinina N.A., Zacharova F.M., Korneva V.A., Li povecky B.M., Serebrynickaya M.P., Konstantinov V.O., Vasilyev V.B., Mandelshtam M.Yu. New mutations in low-density lipoprotein receptor gene in familial hypercholesterolemia patients from Petrozavodsk. Russian Journal of Genetics. 2013;49(6):673-6. Russian (Комарова Т.Ю., Головина А.С., Грудина Н.А., Захарова Ф.М., Корнева В.А., Литовецкий Б.М., Серебренническая М.П., Константинов В.О., Васильев В.Б., Мандельштам М.Ю. Новые мутации гена рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с семейной гиперхолестеринемией из Петрозаводска. Генетика. 2013;49(6):772-6).*
6. *Komarova T.Yu., Korneva V.A., Kuznetsova T.Yu., Golovina A.S., Vasilyev V.B., Mandelshtam M.Yu. Familial hypercholesterolemia mutations in Petrozavodsk: no similarity to St. Petersburg mutation spectrum. BMC Medical Genetics. 2013;14:128.*
7. *O'Brien E.C., Roe M.T., Fraulo E.S., Peterson E.D., Ballantyne C.M., Genest J., Gidding S.S., Hammond E., Hemphill L.C., Hudgins L.C., Kindt I., Moriarty P.M., Ross J., Underberg J.A., Watson K., Pickhardt D., Rader D.J., Wilemon K., Knowles J.W. Rationale and design of the familial hypercholesterolemia foundation CASCADE Screening for Awareness and Detection of Familial Hypercholesterolemia registry. Am Heart J. 2014;167(3):342-9.*

8. Nordestgaard B.G., Chapman M.J., Ray K., Borén J., Andreotti F., Watts G.F., Ginsberg H., Amarencu P., Catapano A., Descamps O.S., Fisher E., Kovane P.T., Kuivenboven J.A., Lesnik P., Masana L., Reiner Z., Taskinen M.R., Tokgözoğlu L., Tybjaerg-Hansen A. *European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Lipoprotein (a) as cardiovascular risk factor: current status. Eur. Heart J.* 2010;31:2844–53.
9. Kunkel L.M., Smith K.D., Boyer S.H. et al. *Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. Proceed. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977;74:1245–9.
10. Bell G.I., Karam J.H., Rutter W.J. *Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insulin gene. Proceed. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981;78:5759–63.
11. Hobbs H.H., Brown M.S., Goldstein J.L. *Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. Hum. Mutat.* 1992;1:445–66.
12. Graham C.A., McIlhatton B.P., Kirk C.W., Beattie E.D., Lyttle K., Hart P., Neely R.D.G., Nicholls D.P. *Genetic screening protocol for familial hypercholesterolemia which includes splicing defects gives an improved mutation detection rate. Atherosclerosis.* 2005;182:331–40.
13. Hobbs H.H., Esser V., Russell D.W. *Ava II polymorphism in the human LDL receptor. Nucl. Acid Res.* 1987;15(1):379.
14. Korneva V.A., Kuznetsova T.Yu., Karpova E.S., Rupasova K.I. *Treatment of patients with severe dyslipidemia in real clinic practice. Ration Pharmacother Cardio.* 2015;11(4):380–4. Russian (Корнева В.А., Кузнецова Т.Ю., Карпова Е.С., Рупасова К.И. Ведение пациентов с выраженной дислипидемией в реальной клинической практике. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии.* 2015;11(4):380–4).
15. Konstantinov V.O., Liberman I.S. *Familial hypercholesterolemia in: Konstantinov V.O. Preclinical atherosclerosis (diagnosis and treatment), SPb; 2006:43–65. Russian (Константинов В.О., Либерман И.С. Семейная гиперхолестеринемия // Константинов В.О. Доклинический атеросклероз (диагностика и лечение). СПб, 2006:43–65).*
16. Besseling J., Kindt I., Michel H., Kastelain J. *Severe heterozygous familial hypercholesterolemia and risk for cardiovascular disease: A study of a cohort of 14,000 mutation carriers. Atherosclerosis.* 2014;233(1):219–23.
17. Holmes D.T., Schick B.A., Humphries K.H., Frohlich J. *Lipoprotein (a) as independent risk factor for cardiovascular disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. Clin Chem.* 2005;51:2067–73.
18. Rudenko G., Henry L., Henderson K., Ichtchenko K., Brown M.S., Goldstein J.L., Deisenhofer J. *Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. Science.* 2002;298:2353–8.
19. Davis C.G., Goldstein J.L., Sydbo T.C., Anderson R.G., Russell D.W., Brown M.S. *Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. Nature.* 1987;326(6115):760–5.