Гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия в Санкт–Петербурге вследствие дефекта гена рецептора липопротеидов низкой плотности

Б.М. Липовецкий, М.Ю. Мандельштам
ФГБУ Российской Федерации «Институт мозга человека» им. Н.П. Бехтеревой РАН, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Абстракт

Цель работы – проанализировать, как часто семейная гиперхолестеринемия (ГХС), передается от одного из родителей-пробандов детям; оценить особенности липидного состава крови в группах мужчин и женщин с ГХС и их сыновей и дочерей; сопоставить частоту и выраженность клинических проявлений в дифференцированных группах и по возможности идентифицировать генетический дефект.

Материалы и методы. На протяжении последних 20 лет нами наблюдалось 60 пробандов с семейной ГХС и две группы их детей: 40 человек с гетерозиготной семейной ГХС (1) и 43 человека, не унаследовавших данную патологию (2). Липидный состав крови неоднократно определяли у всех диспансеризированных лиц. у 47 пробандов изучена кодирующая последовательность гена рецептора липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) методом конформационно-чувствительного электрофореза и секвенирования ДНК.

Результаты. Как показали наблюдения, семейная ГХС была передана половине (50%) потомков как от отцов, так и от матерей. Осложнения ГХС в основном отмечены в группе мужчин-пробандов после 40 лет. у 93% этих лиц наступали поражения сердечно-сосудистой системы, при этом в течение нашего наблюдения в 38% они заканчивались летальным исходом. в группе сыновей с ГХС (средний возраст 31±3.5 год) и дочерей с ГХС (средний возраст 40±3.1 лет) клинические проявления отмечены в единичных случаях. Из прошедших генетическое обследование 47 пробандов мутация гена рецептора ЛПНП найдена у 29 человек.

Заключение. у лиц с семейной ГХС решающими факторами риска сосудистых поражений являются принадлежность к мужскому полу и возраст. Из 29 пробандов с выявленной мутацией рецептора ЛПНП повторялись лишь 2 его вида (у 10 человек), все остальные варианты этой мутации (их 19) имели оригинальную структуру.

Ключевые слова: *Пробанды, семейная гиперхолестеринемия, липопротеиды высокой и низкой плотности, ген рецептора ЛПНП.*

Heterozygous familial hypercholesterolemia in St.-Petersburg due to defects of the low density lipoprotein receptor gene.

B.M. Lipovetsky, M.Yu. Mandelshtam.
Institute of the Human Brain, Institute of the Experimental Medicine, St.Petersburg, Russia

Abstract

Aim – to analyze how commonly Familial hypercholesterolemia (FH) is transmitted from one of parents-probands to children; to evaluate peculiarities of the blood lipid spectra in males and females suffering from FH and their sons and daughters; to compare the frequency and expression of clinical features in differentiated groups and, when possible, to establish the nature of genetic defect underlying FH.

Materials and methods. During last two decades we have followed 60 probands with FH and two groups of their children: 40 persons with heterozygous FH (group 1) and 43 persons without this pathology (group 2). Blood lipid spectra was measured several times in all subjects. In 47 probands we have studied the coding region of the low density lipoprotein receptor (LDLR) by conformation-sensitive electrophoresis of DNA and by DNA sequencing.

Results. FH was transferred to half of the progeny (50% of children) both from fathers and from mothers. Clinical features of hypercholesterolemia were mainly observed in the group of males-probands older than 40 years. In 93% of these persons coronary heart disease was registered and during our observation 38% of them finished by lethal end-point. In the group of sons with FH (age 31±3.5) and in the group of daughters with FH (age 40±3.1) clinical manifestations were recorded in singletons. Out of 47 probands studied genetically LDL receptor gene mutations were revealed in 29.

Conclusion. In persons with FH the most important risk factor for coronary heart disease must be considered male sex

and age after 40-45 . Out of 29 probands with different variants of the genetic defect only two variants were repeated (in 10 persons), all other variants (each of them) spread only in the single family.

Keywords: *probands, Familial hypercholesterolemia (FH), low density lipoprotein (LDL), low density lipoprotein (LDL) receptor.*

Диагноз семейной ГХС в широкой практике основывается прежде всего на особенностях липидного состава крови, для которого характерно значительное повышение уровня общего холестерина (ХС), достигающее обычно 8 ммоль/л и более, и ХС липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП), который у взрослых лиц чаще всего превышает 5 ммоль/л. При этом триглицериды (ТГ) могут быть в пределах нормы (до 1.5 ммоль/л) или оказаться умеренно повышенными. Иначе говоря, по фенотипической классификации Фредриксона гиперлипидемия при семейной ГХС носит характер IIa, реже IIb типа.

Большое значение в диагностике семейной ГХС имеет анамнез: указания на ГХС и характерные осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы у ближайших родственников в возрасте до 60 лет [1].

Дополнительное значение для диагностики семейной ГХС имеют так называемые клинические метки семейной ГХС – липоидные дуги роговицы и ксантомы в области пястно-фаланговых суставов, локтей, ахилловых сухожилий, однако они определяются не более, чем у четверти этих лиц.

В основе классической моногенной доминантной гетерозиготной семейной ГХС лежит генетический дефект – мутация одного из «главных» генов-регуляторов липидного обмена, локализованного в 19-й хромосоме и кодирующего продукцию рецепторов ЛПНП. Это стало понятным после работ J.Goldstein и M.Brown [2, 3]. Оказалось, что эта мутация гетерогенна: описано более 1500 ее вариантов [4-6]. При наличии любого из них количество или качество рецепторов ЛПНП в печеночных и других клетках организма не соответствует норме, нарушается захват ЛПНП (главных носителей ХС) из циркулирующей крови, развивается ГХС.

в отличие от гена рецептора ЛПНП, в другом «главном» гене-регуляторе липидного обмена – гене АРОВ, локализованном на 2-ой хромосоме, имеется одна мажорная мутация – R3500Q, при которой в полипептидной цепи белка АРОВ аргинин в положении 3500 заменен глютамином (R, Q – условные обозначения указанных аминокислот); она широко распространена в Средней Европе, но встречается лишь у 4,5% пациентов с семейной ГХС в Москве [6] и, по-видимому, еще реже в Санкт-Петербурге [5, 7].

Такое изменение структуры АРОВ приводит к затруднению захвата ЛПНП нормальными рецепторами печеночных клеток, то есть к их накоплению в циркулирующей крови и к ГХС.

Помимо описанных моногенных ГХС, часто приходится сталкиваться с полигенными ГХС, которые не связаны с каким-то одним измененным геном, они являются следствием ряда нуклеотидных полиморфизмов в локусах определенных «второстепенных» олигогенов, которые создают лишь предрасположение к нарушениям обмена ХС [7]. Таким образом, полигенные ГХС при наличии ряда нуклеотидных полиморфизмов развиваются, как правило, под влиянием других неблагоприятных факторов риска. Они встречаются значительно чаще, чем моногенные ГХС, но непосредственно (как таковые) не наследуются. Само по себе наследственное предрасположение не приводит к ГХС, тем более, к сосудистым поражениям, если нет воздействия дополнительных факторов риска (нерациональное питание, артериальная гипертензия, ожирение, курение и др.).

Материалы и методы.

За последние 20 лет под нашим наблюдением находились 60 пробандов семейной ГХС, имевших детей, число которых составило 83 человека, так что общее количество диспансеризированных было 143 человека (таблица 1).

Средний возраст наблюдавшихся пробандов-мужчин на период первоначального обследования – 44±1.6 г, пробандов-женщин -53±2.0, воз-

Таблица 1. Распределение обследованных соответственно поколению, полу и наличию гиперхолестеринемии (ГХС) у детей.

Контингент обследованных	Мужчины	Женщины	Итого
Пробанды–родители с ГХС	34	26	**60**
Дети с семейной ГХС	26	14	**40**
Дети без семейной ГХС	27	16	**43**
Всего обследованных	**87**	**56**	**143**

раст сыновей с семейной ГХС – 31±3.5, возраст дочерей с семейной ГХС – 40±3.1.

На одном из этапов нашего наблюдения (в 2003г) мы анализировали эту группу пробандов [8], но не учитывали половых различий, что по-видимому имеет решающее значение для прогноза. Кроме того, в той работе не было данных генетического исследования этой группы обследованных.

В 23-х семьях пробандов было по двое детей, из них в 5 случаях семейную ГХС унаследовали оба потомка (22%), в 11 семьях ГХС передалась лишь одному из двух детей (48%), в 7 семьях ни один из двух детей не стал носителем семейной ГХС (30%). Таким образом, 21 потомок из 46 (23 семьи с двумя детьми) унаследовал семейную ГХС, 25 детей в семьях наблюдавшихся пробандов родились здоровыми. Интересно отметить, что в двух семьях пробандов (в одном случае пробанд – отец, в другом пробанд – мать) родились близнецы (сестры и брат с сестрой), у которых в обоих случаях констатирована семейная ГХС.

Липиды крови определяли в лаборатории Института мозга человека РАН стандартизованным методом на анализаторе немецкой фирмы «Humalyzer GMB".

Для определения природы наследуемого дефекта (мутации) изучали кодирующую последовательность гена рецептора ЛПНП с помощью конформационно-чувствительного электрофореза и секвенирования ДНК, которую выделяли из лейкоцитов с помощью фенол-хлороформных экстракций. Во всех опытах было исключено носительство мутации R3500Q гена APO B. Далее с помощью полимеразной цепной реакции амплифицировали отдельные участки (экзоны) гена рецептора ЛПНП и изучали их электрофоретическую подвижность с помощью процедуры, известной как анализ конформационного полиморфизма однонитевых фрагментов ДНК. Этот метод позволяет локализовать мутацию в пределах гена. Затем определяли нуклеотидную последовательность участка гена, предположительно содержащего мутацию, с помощью метода секвенирования ДНК. Это давало возможность идентифицировать вид мутации.

При статистической обработке данных рассчитывали средние значения показателей (M) и средние квадратические отклонения (±m). Для сравнения использовали t-критерий Стьюдента, достоверными считали различия при $p<0.05$.

Результаты и обсуждение.

Представляет интерес вариабельность соотношений между половой принадлежностью родителей-пробандов семейной ГХС и их детей. Оказалось, что отцы-пробанды (34 человека) практически одинаково часто имели сыновей (25) и дочерей (22), причем почти поровну распределились дети с семейной ГХС (22 человека) и без семейной ГХС (25 человек). у матерей-пробандов гораздо чаще рождались сыновья (28 человек), тогда как дочерей было всего 8, при этом как сыновья, так и дочери разделились точно пополам по наличию или отсутствию ГХС. (таблица 2).

Таблица 2. Распределение детей пробандов семейной ГХС по родству, полу и наличию семейной ГХС (отцов-пробандов 34, матерей-пробандов 26).

Родство и пол*)	Дети с ГХС	Дети без ГХС	Итого
Отец–сын	12 чел.	13 чел.	25 чел.
Отец–дочь	10 чел.	12 чел.	22 чел.
Мать–сын	14 чел.	14 чел.	28 чел.
Мать–дочь	4 чел.	4 чел.	8 чел.
Всего	40 чел.	43 чел.	83 чел.

Примечания) сыновей с ГХС — 26 чел., без ГХС — 27; дочерей с ГХС — 14 чел., без ГХС — 16 .*

Приводим данные о липидном составе крови шести дифференцированных групп в таблице 3.

Достоверные отличия в липидных показателях между мужчинами и женщинами (среди пробандов) выявлены только по ХС ЛПВП, значения которого у женщин значительно выше. При сопоставлении липидных показателей у отцов-пробандов и их сыновей с ГХС достоверные отличия отмечаются по ТГ и КА (у сыновей они оказались меньше). Липиды матерей-пробандов и их дочерей с ГХС различались только по КА (у дочерей этот коэффициент был меньше).

Между сыновьями пробандов с ГХС и дочерьми пробандов с ГХС отличия касались ХС ЛПВП и КА: значения ЛПВП у сыновей были ниже, а значения КА – выше, то-есть выраженность атерогенного сдвига у представителей мужского пола во всех группах с ГХС оказалась больше.

Что касается детей, не унаследовавших семейную ГХС, то отличие между группами мужского

Таблица 3. Усредненные липидные показатели плазмы крови в ммоль/л у пробандов с семейной ГХС (мужчин и женщин) и их детей (сыновей и дочерей) с ГХС и без ГХС.

Группы	n	ЛПНП	ЛПВП	ТГ	КА (ед.)
Отцы-пробанды	34	7.7±0.34	1.03±0.07	2.3±0.18	9.0±0.37
Матери-пробанды	26	8.4±0.43	1.23±0.07	1.9±0.17	8.6±0.69
Сыновья с ГХС	26	6.8±0.41	1.12±0.07	1.4±0.20	7.1±0.48
Сыновья без ГХС	27	2.5±0.11	1.35±0.10	0.9±0.07	2.2±0.14
Дочери с ГХС	14	6.3±0.29	1.40±0.11	1.4±0.21	5.1±0.38
Дочери без ГХС	16	3.2±0.25	1.50±0.11	0.8±0.07	2.6±0.27

*Примечания: *) ЛПНП — липопротеиды низкой плотности, ЛПВП — липопротеиды высокой плотности, ТГ — триглицериды, КА — коэффициент атерогенности (в единицах).*

и женского пола было значимым только по ХС ЛПНП, которое в женской группе было выше (3.2±0.25 против 2.5±0.11 ммоль/л).

Таким образом, самые неблагоприятные показатели по липидному составу крови выявлены в группе мужчин-пробандов. у взрослых детей пробандов (средний возраст сыновей – 31±3.5 год, дочерей – 40±3.1), которым передалась семейная ГХС, атерогенный сдвиг все же несколько меньше, чем у родителей, но они много моложе.

Таблица 4. Клинические проявления семейной ГХС в 4-х группах обследованных с семейной ГХС: 1.пробанды-мужчины, 2.пробанды-женщины, 3.сыновья с ГХС, 4.дочери с ГХС.

Группы, их ср. возраст	Число обслед.	Летальные исходы	Нефатальные ИМ или МИ	Другие осложнения	Нет клинич. проявений
1. 44±1.6	34	13 (38%)	10 (29%)	9 (26%)	2 (6%)
2. 53±2.0	26	3 (11.5%)	3 (11.5%)	9 (35%)	17 (42%)
3. 31±3.5	26	–	2 (8%)	1 (4%)	23 (88%)
4. 40±3.1	14	–	2 (14%)	1 (7%)	11 (79%)
Итого	100	16 чел.	17 чел.	20 чел.	43 чел.

Примечания: ИМ – инфаркт миокарда, МИ — мозговой инсульт.

Клинические проявления семейной ГХС в двух группах пробандов-родителей и двух группах их детей с ГХС представлены в таблице 4.

Таблица 4 демонстрирует большую разницу между частотой и тяжестью клинических проявлений у мужчин-пробандов (группа 1) и женщин-пробандов (группа 2). Хотя женщины в среднем были старше мужчин на 10 лет, летальных исходов у них было в 3.3 раза меньше, процент нефатальных ИМ или МИ у женщин был меньше, чем у мужчин, в 2.5 раза. ГХС у женщин-пробандов после 55 лет в 35% приводила к таким проявлениям, как стенокардия, дисциркуляторная энцефалопатия, а в 42% ГХС никак себя не проявила. у мужчин-пробандов уже в возрасте 45-50 лет клинических проявлений не было только у 6% обследованных. Почти в 70% случаев к этому времени у мужчин наступали серьезные осложнения: внезапная смерть, инфаркт миокарда или мозговой инсульт. Вероятно, существенная роль в более тяжелом течении ГХС у мужчин принадлежит и фактору курения: большинство мужчин-пробандов (группа 1) курили, тогда как среди женщин (группа 2) курили 3 человека.

Причины летальных исходов у 3-х женщин с ГХС из группы 2 – внезапная сердечная смерть, разрыв аневризмы брюшной аорты в случае, сочетавшемся с артериальной гипертензией и тромбоз брыжеечной артерии с некрозом отрезка кишечной стенки. у трех других женщин были нефатальные инфаркты миокарда (2) и мозговой инсульт (1). в остальных случаях (9 человек) диагностирована стенокардия или дисциркуляторная энцефалопатия. В 42% в группе 2 клинических проявлений какого-либо заболевания со стороны сердечно-сосудистой системы не было.

Среди взрослых сыновей и дочерей пробандов, которым передалась семейная ГХС, в обеих груп-

пах (3 и 4) было по 3 человека с теми или иными нефатальными осложнениями. в 88% в группе 3 и в 79% в группе 4 клинических проявлений болезни не было.

Надо полагать, что благополучие 3-й группы (сыновья пробандов, имеющих ГХС) – временное, поскольку их средний возраст составлял на период наблюдения 31±3.5 г. 10 лет спустя, если этой группе лиц не будет проводиться систематическая, эффективная, гиполипидемическая терапия, они по-видимому повторят судьбу мужчин-пробандов. По данным T.Yamamoto et al. (1989) 80% мужчин с семейной ГХС к 50 годам страдают ишемической болезнью сердца [9].

Мы проанализировали группу из 32 умерших мужчин с семейной ГХС, одна часть которых (10 человек) регулярно принимала статины, другая часть (22 человека) систематического лечения статинами не получала [10]. Оказалось, что средний возраст мужчин в первом случае составил 55±3 г, во втором случае – 44±2 г. Иначе говоря, есть все основания считать, что лечение статинами значительно увеличивает продолжительность жизни больных семейной ГХС.

Что касается распространенности семейных ГХС, то в центральной и восточной Европе встречается 1 случай на 500 человек (гетерозиготная ГХС); гомозиготные формы семейной ГХС встречаются во много раз реже (1 случай на 1 миллион) [11, 12].

Из 47 наблюдавшихся у нас пробандов с семейной ГХС мутация гена рецептора ЛПНП идентифицирована в 29 случаях, что составляет 62%. Полученный результат (в плане частоты находок мутации) хорошо согласуется с популяционными исследованиями в других странах Европы. в 8 случаях из 29 был найден один и тот же генетический дефект – G197 del – мажорная мутация; она определялась у 30% пробандов семейной ГХС в однородной этнической группе евреев-ашкенази (так называемая литовская мутация). Описанный вариант мутации связан с выпадением (делецией) трех нуклеотидов в цепи гена рецептора ЛПНП. Кодирующие «тройки» нуклеотидов гена – триплеты, определяющие выбор аминокислоты для данного белка и ее встраивание в полипептидную цепь, получили название кодона. в данном варианте мутации отсутствует кодон, контролирующий включение в полипептидную цепь рецептора ЛПНП глицина (аминокислоты) в 197 положении. в этом случае глицин выпадает из полипептидной цепи рецептора ЛПНП, что приводит к потере его способности связывать ЛПНП.

Дважды встретился ранее никем не описанный вариант мутации гена рецептора ЛПНП, который обозначается как W422X. в этом случае аминокислота триптофан (W) заменяется в полипептидной цепи рецептора ЛПНП в 422 положении на так называемый «стоп-кодон» (X); построение полноценной полипептидной цепи преждевременно обрывается, синтезируется ущербный рецептор, который не может связываться с мембраной печеночной клетки и захватывать ЛПНП из циркулирующей крови.

Таким образом, у 19 пробандов (из 29) мутации гена рецептора ЛПНП, найденные в нашей работе, имели оригинальный (уникальный) характер, то есть каждая из них была обнаружена лишь в одной родословной. Это свидетельствует о высокой гетерогенности семейной ГХС в Санкт-Петербурге, отражает смешанный характер его населения и методически значительно затрудняет ДНК-диагностику этой патологии. Для идентификации дефекта гена рецептора ЛПНП у пациентов с подозрением на семейную ГХС, проживающих в Санкт-Петербурге, необходимо секвенировать, то есть определить нуклеотидную последовательность всей кодирующей области этого гена. Между тем, нуклеотидная цепь гена рецептора ЛПНП состоит из 48 тысяч нуклеотидов, а кодирующей способностью обладает примерно пятая его часть.

Генетические исследования, описанные в настоящей статье, частично финансировались за счет гранта РФФИ №10-04-00563.

Выводы.

1. Гетерозиготная семейная ГХС передается от одного из родителей половине потомков, независимо от их половой принадлежности.

2. Гендерные различия липидных показателей при семейной ГХС касаются главным образом антиатерогенной фракции липидов (ХС ЛПВП), уровень которой у женщин достоверно выше.

3. Поражения сердечно-сосудистой системы в основном наблюдались в группе пробандов-мужчин после 40 лет и частично связаны с присоединением дополнительных факторов риска.

4. Систематическое лечение статинами лиц с семейной ГХС продлевает им жизнь в среднем на 10 лет.

5. Методами молекулярной генетики идентифицирована мутация гена рецептора ЛПНП у пробандов семейной ГХС в 62%. Всего у нашего контингента обследованных был распознан 21 вид этой мутации, из них 19 видов носили характер уникальных (они не повторялись) и только 2 варианта данной мутации встречались неоднократно (G197 del у 8 человек и W422X у 2 человек).

Список литературы.

1. *WHO. Human Genetics Programme. Familial hypercholesterolemia: report of a second WHO consultation// Geneva: WHO. 1999.*
2. *Goldstein J., Brown M. Lipoprotein receptors, cholesterol metabolism and atherosclerosis// Arch. Pathol. 1975.- v.99: 181-184*
3. *Hobbs H., Russell D., Brown M., et al. The LDL receptor locus in Familial hypercholesterolemia// Ann. Rev. Genet. 1990.-v.24: 133-170.*
4. *Varret M., Rabes J., Thiart R.,et al. LDLR database: new additions to the database and the software, and results of the 1st molecular analysis// Nucl. Fcid Res.1998.-v.26: 248-252.*
5. *Захарова Ф.М., Татищева Ю.А., Голубков В.И. и др. Семейная гиперхолестеринемия в Санкт-Петербурге: разнообразие мутаций свидетельствует об отсутствии выраженного эффекта основателя // Генетика. 2007.- т.43 (9): 1255-1262.*
6. *Кухарчук В.В., Малышев П.П., Мешков А.Н. Семейная гиперхолестеринемия: современные аспекты диагностики, профилактики и терапии // Кардиология. 2009. – т.49(1): 76 – 83.*
7. *Мандельштам М.Ю. Что дало изучение семейной гиперхолестеринемии для понимания генетики дислипидемий? //Медицинская генетика.2003.-т.2 (12) : 509-519.*
8. *Липовецкий Б.М. Семейная гиперхолестеринемия у родителей и детей частота наследования, клинические проявления, выраженность атерогенного сдвига//Российский кардиологический журнал. 2003.-№2:30-34.*
9. *Yamamoto A., Kamiya T., Yamamura T., et al. Clinical features of Familial hypercholesterolemia// Atherosclerosis. 1989.-v.9 (1), suppl.1 : 66-74.*
10. *Липовецкий Б.М. Наследственные дислипидемии// 2010. СПб.127с.*
11. *ESC/EAS Guidelines for management of dyslipidaemias// Atherosclerosis.2011.-v.217 – S1: S44 p.*
12. *Dedoussis G.V.Z., Schmidt H., Genschel J. LDL-receptor mutations in Europe // Hum. Mutat. 2004. v. 24.(6): 443–459.*