



МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ: ОПЫТ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОГО ЛИПИДНОГО ЦЕНТРА Г. НОВОСИБИРСКА

Шахтшнейдер Е.В.

**Научно-исследовательский институт терапии и
профилактической медицины –
филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск**

НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ЛИПИДОЛОГИИ НИИТПМ – ФИЛИАЛ ИЦИГ СО РАН



**Заведующая Клиникой
НИИТПМ — филиала
ИЦИГ СО РАН,
д.м.н., доцент
Белковец
Анна Владимировна**



**Ведущий
кардиолог-липидолог
Липидного Центра
к.м.н. Тимощенко
Ольга Владимировна**

**Лаборатория изучения моногенных форм распространенных
заболеваний человека ФИЦ ИЦИГ СО РАН, рук. Шахтшнейдер Е.В.**

СЕМЕЙНАЯ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЯ (СГХС) – ЗАБОЛЕВАНИЕ, ОБУСЛОВЛЕННОЕ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ДЕФЕКТАМИ, ПРИВОДЯЩИМИ К СНИЖЕНИЮ СКОРОСТИ УДАЛЕНИЯ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ИЗ КРОВотоКА И ВЫРАЖЕННОМУ ПОВЫШЕНИЮ КОНЦЕНТРАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА В КРОВИ

■ Гомозиготная форма СГХС

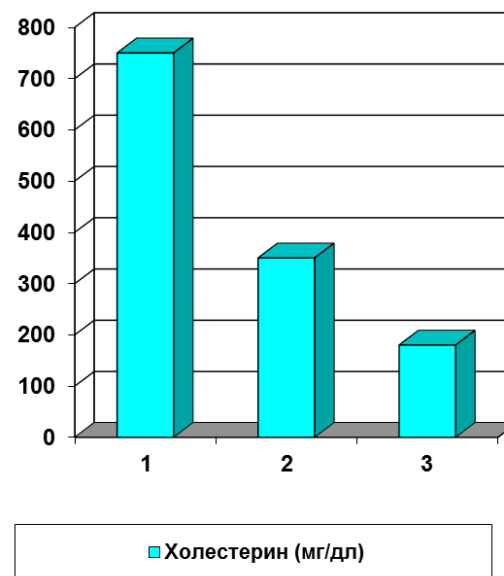
(1:1 000 000)

ОХС 600-1200 мг/дл (15 - 30 мМ)

■ Гетерозиготная форма СГХС

(1:200–1:250)

ОХС 280-500 мг/дл (7 - 12.5 мМ)

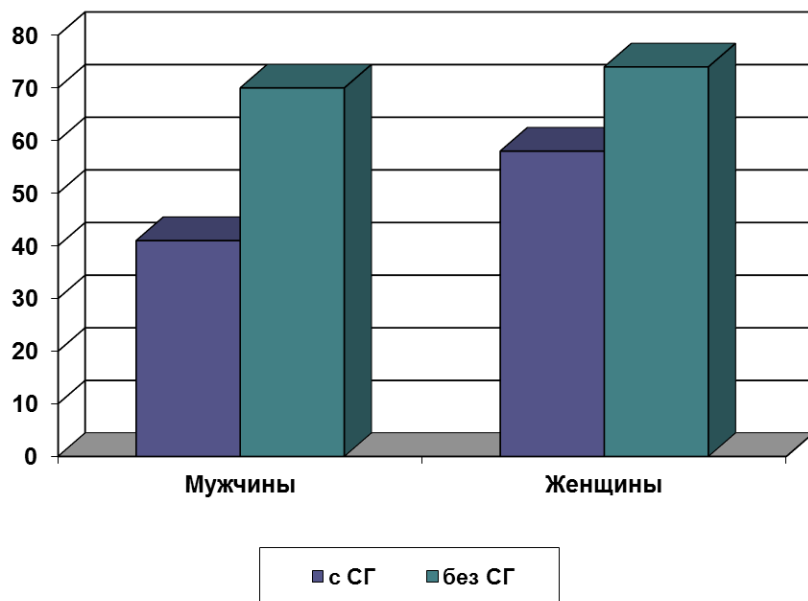


СГХС входит в число наиболее распространенных врожденных метаболических нарушений

РИСК РАЗВИТИЯ ССЗ У ПАЦИЕНТОВ С СГХС

- для мужчин с гетерозиготной формой СГХС
50% в возрасте до 50 лет
- для женщин с гетерозиготной формой СГХС
30% к 55 годам
- при гомозиготной форме СГХС - **ССЗ развиваются в подростковом возрасте (10-17 лет)**

СРЕДНЯЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ ПАЦИЕНТОВ С СГХС И РОДСТВЕННИКОВ ЭТИХ ПАЦИЕНТОВ БЕЗ СГХС



Jensen J., 2007

Несмотря на распространенность этого заболевания и доступность эффективных методов лечения, СГХС часто остается не диагностированной и не леченной, особенно у детей

До 20% случаев СГХС диагностируются в США

КАСКАДНЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ – ПОЭТАПНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАЦИЕНТОВ С РИСКОМ НАЛИЧИЯ СГХС

Скрининг направленный
на выявление повышенного
содержания ОХС и ХС-ЛНП

СЕМЕЙНЫЙ АНАМНЕЗ

КЛИНИЧЕСКИЕ
ЛИПИДНЫЕ КРИТЕРИИ

ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК

Официальное признание ВОЗ с
этической точки зрения:

1. Заболевание
представляет серьезную
проблему для здоровья
2. Доступен
диагностический тест
3. Доступны превентивные
меры

Фенотип верифицируется генотипом!

- **Скрининг на содержание холестерина должен быть проведен всем лицам в популяции до достижения 20 лет**
- **В случае семейного анамнеза СГХС или раннего развития ИБС скрининг на содержание холестерина проводится при достижении возраста 2 лет**

Рекомендации EAS and ESC, 2018

Голландские диагностические критерии СГХС (Dutch Lipid ClinicNetwork Criteria), ВОЗ 1999

Семейный анамнез	Баллы
а) Родственник 1-й степени родства с ранней (мужчины <55 лет, женщины <60 лет) ИБС или другим сосудистым поражением или Родственник 1-й степени родства с ХС ЛПНП >95-го перцентиля	1
б) Родственник 1-й степени родства с ксантомами сухожилий и/или дугой роговицы или Дети в возрасте до 18 лет с ХС ЛПНП >95-го перцентиля	2
История заболевания	
а) У пациента ранняя (мужчины <55 лет, женщины <60 лет) ИБС	2
б) У пациента ранее (мужчины <55 лет, женщины <60 лет) развитие атеросклеротического поражения церебральных/периферических сосудов	1
Физикальное обследование	
а) Ксантомы сухожилий	6
б) Липидная дуга роговицы в возрасте моложе 45 лет	4
Лабораторный анализ (при нормальных значениях ХС ЛВП и триглицеридах)	
а) ХС ЛНП >8,5 ммоль/л	8
б) ХС ЛНП 6,5-8,5 ммоль/л	5
в) ХС ЛНП 5-6,4 ммоль/л	3
г) ХС ЛНП 4-4,9 ммоль/л	1
Анализ ДНК	
Имеется функциональная мутация гена <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> , <i>PCSK9</i>	8
Диагноз СГХ	
Определённая	>8 баллов
Вероятная	6-8 баллов
Возможная	3-5 баллов

ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СГХС

Рекомендуется с целью подтверждения диагноза СГХС проведение молекулярно-генетического исследования, направленного на патогенные или вероятно патогенные варианты нуклеотидной последовательности в генах *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, **у лиц с суммой баллов 6 и более** согласно клиническим критериям DLCN

АТЕРОСКЛЕРОЗ

2019

Научно-практический журнал

Т. 15, № 1

КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ

М.В. Ежов¹, С.С. Бажан², А.И. Ершова³, А.Н. Мешков³, А.А. Соколов⁴, В.В. Кухарчук¹,
В.С. Гуревич^{5,6}, М.И. Воевода², И.В. Сергиенко¹, Е.В. Шахтшнейдер², С.Н. Покровский¹,
Г.А. Коновалов⁷, И.В. Леонтьева⁸, В.О. Константинов⁶, М.Ю. Щербакова⁹, И.Н. Захарова¹⁰,
Т.В. Балахонова¹, А.Е. Филиппов⁵, Н.М. Ахмеджанов³, О.Ю. Александрова¹¹, Б.М. Липовецкий¹²

ГРУППА ПАЦИЕНТОВ С СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЕЙ

СГХС



- Определенная, >8
- Вероятная, 6-8
- Возможная, 3-5

СГХС



- Пробанды
- Родственники

	М ± SD*	Минимум	Максимум
ОХС, ммоль/л	9,8±3,7	5,7	25,0
ТГ, ммоль/л	2,1±3,0	0,62	17,4
ХС-ЛВП, ммоль/л	1,4±0,4	0,54	2,2
ХС-ЛНП, ммоль/л	5,6±2,3	3,8	15,52
ИМТ, м²/кг	26,2±3,6	19,0	35,0
Возраст, лет	38,3±16,9	8	69

МЕТОДЫ

- Таргетное высокопроизводительное секвенирование генов, ассоциированных с развитием СГХС и генов липидного обмена
- Прямое автоматическое секвенирование промотора и экзонов гена *LDLR*
- MLPA анализ
- Полногеномное и полноэкзомное секвенирование

ГЕНЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ФЕНОТИПОМ СГХС

АУТОСОМНО-ДОМИНАНТНАЯ ФОРМА

LDLR – ген рецептора ЛНП (80-90%)

APOB – ген аполипопротеина В (5%)

PCSK9 – ген пропротеин конвертазы субтилизин/кексин тип 9 (<5%)

АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНАЯ ФОРМА

LDLRAP1 – ген белка-адаптора рецептора ЛНП (<1%)

ABCG5 – ATP binding cassette subfamily G member 5

ABCG8 – ATP binding cassette subfamily G member 8

CYP7A1 – cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1

НОВЫЕ ГЕНЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ФЕНОТИПОМ СГХС

STAP1 – signal transducing adaptor family member 1

LIPA – lipase A, lysosomal acid type

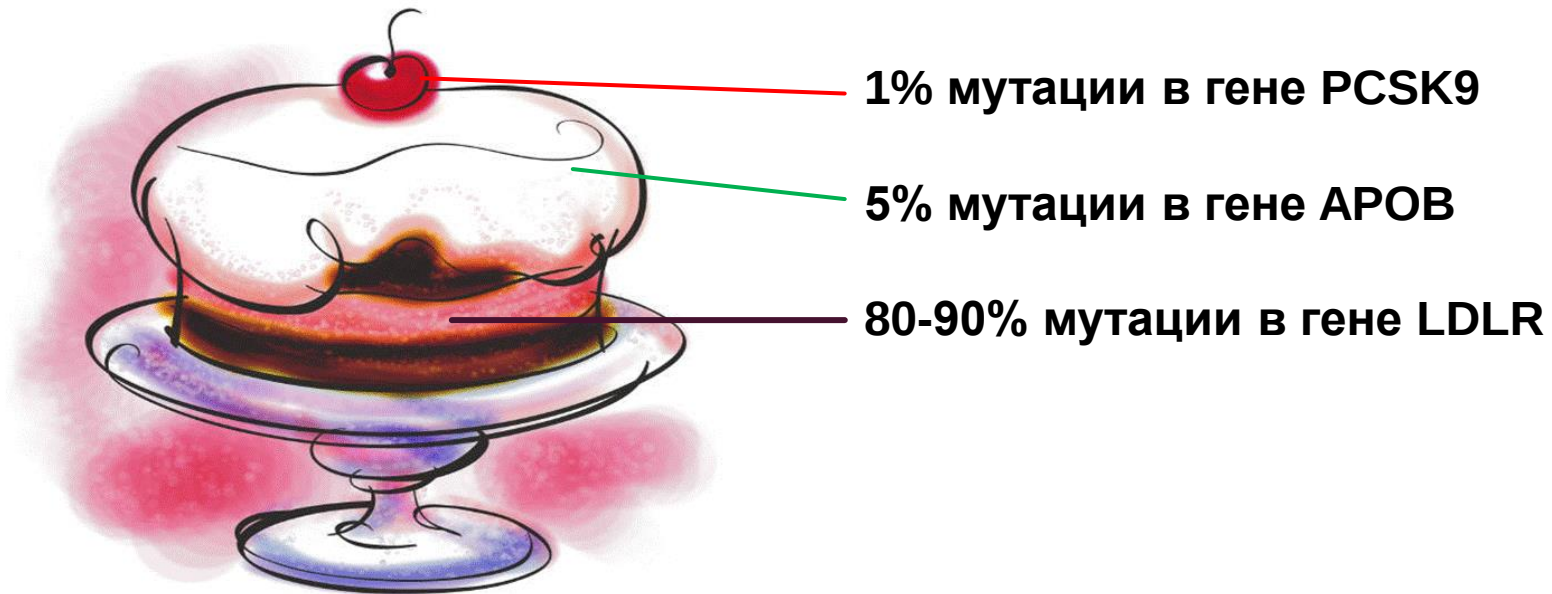
PNPLA5 – patatin like phospholipase domain containing 5

АУТОСОМНО-ДОМИНАНТНАЯ ФОРМА СГХС

LDLR – ген рецептора ЛНП

APOB – ген аполипопротеина В

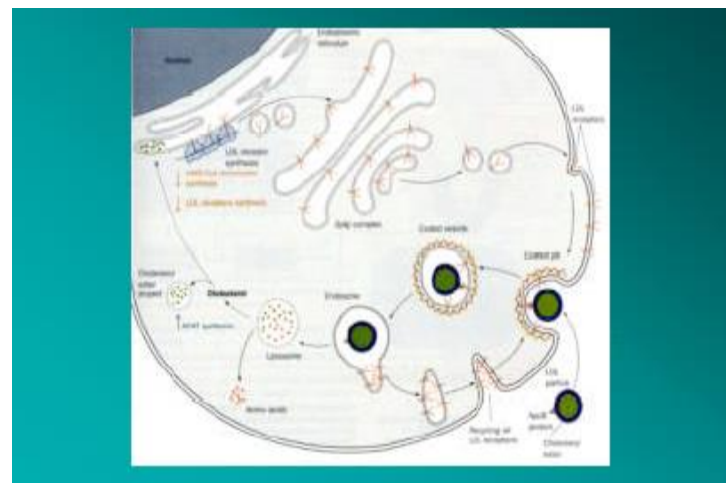
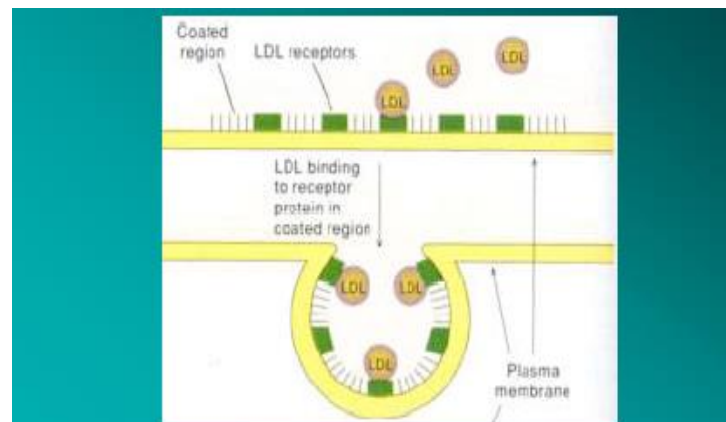
PCSK9 – ген пропротеин конвертазы субтилизин/кексин тип 9



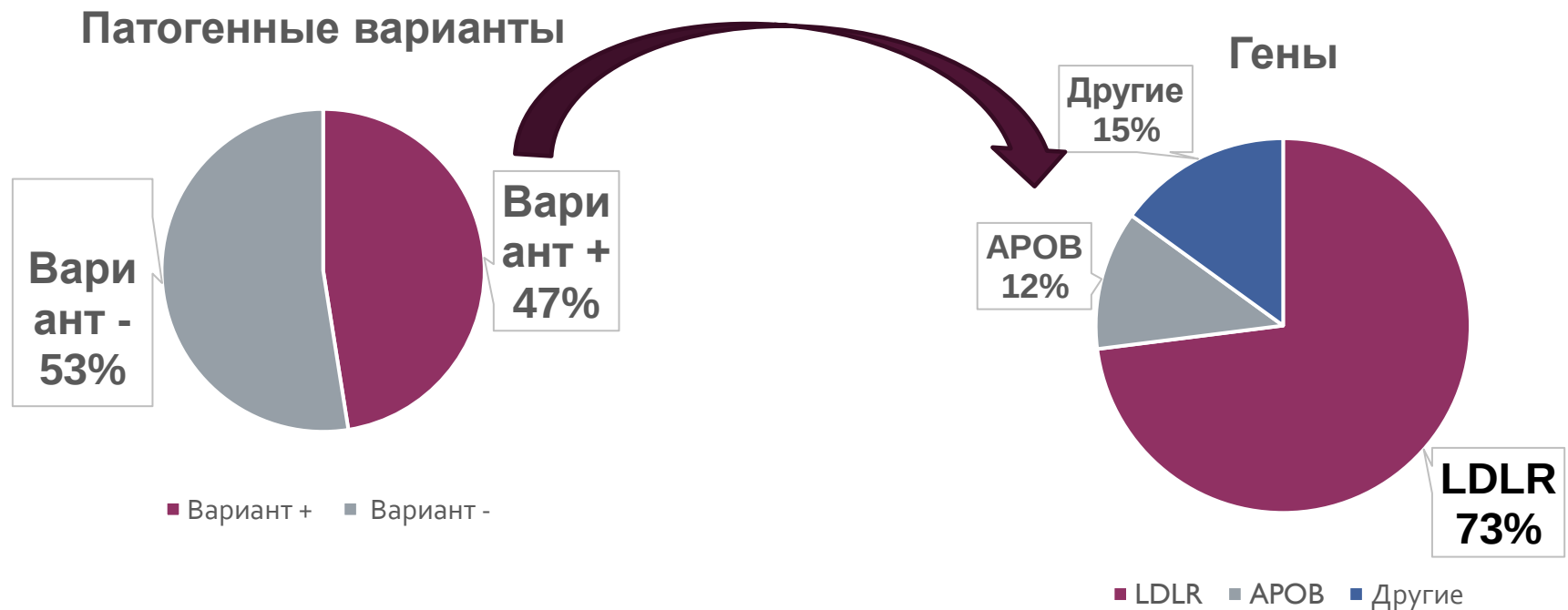
Классы мутаций в гене рецептора ЛНП

- 1 нет синтеза рецептора ЛНП
- 2 дефект транспорта (Golgi)
- 3 дефект связывания ЛНП
- 4 дефект интернализации-поглощения
- 5 дефект рециклирования

**рЛНП связывает ЛНП
и транспортирует внутрь
клетки за счет эндоцитоза**



ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С СГХС



У 12 из 14 детей пробандов (**85,7%**) выявлены патогенетически значимые варианты в генах, ассоциированных с СГХС:

- в 10 случаях в гене *LDLR*
- в одном случае в гене *APOB*
- в одном случае в гене *SREBPF1*

LDLR

Номер пациента	Номер позиции	Замена аминокислот	Частота редкого аллеля, GnomAD	Клиническое значение по данным ClinVar
P28, P40, P41, P42, P55, P56	rs121908038	p.Leu401His	нет данных	Likely Pathogenic
P45	rs137853964	p.Val827Ile	A=0.001006	Likely Pathogenic
P22, P36, P58	rs28942078	p.Val429Met	A=0.000012	Pathogenic/ Likely Pathogenic
P65	rs539080792	p.Glu337Lys	A=0.000104	Uncertain Significance
P47	rs570942190	p.Arg416Trp	T=0.000024	Not reported in ClinVar
P67, P68	rs755757866	p.Cys340Tyr	T=0.000008	Likely Pathogenic
P7	rs761954844	p.Cys329Tyr	A=0.000016	Likely Pathogenic
P35	rs879254566	p.Asp178Glu	нет данных	Pathogenic/ Likely Pathogenic
P38, P39	rs879254721	p.Glu308Lys	нет данных	Pathogenic
P2	rs879254980	p.Glu558Ter	нет данных	Pathogenic
P24, P25, P26, P81, P82	rs879255191	-	нет данных	Conflicting Interpretations of Pathogenic
P52	rs875989907	p.Asp266Asn	A=0.000012	Pathogenic
	rs879254769	p.Cys352Ser	нет данных	Likely Pathogenic
P10	rs875989894	p.Cys89Ser	нет данных	Pathogenic/Likely Pathogenic
	ND	p.Tyr375Asp	нет данных	Novel variant

КЛИНИЧЕСКИЕ СЛУЧАИ: КОМПАУНД ГЕТЕРОЗИГОТЫ В ГЕНЕ *LDLR*

В 5 и 7 экзонах гена *LDLR*: Chr19:11217342 и Chr19:11221441

- Пациент П20, женщина, 28 лет (2016 г.). Диагноз: ИБС. Стенокардия напряжения 2 ФК, ПИКС, ЧТКА ЛКА, ПКА, ОА 2012 г, ЧТКА ОА 2013 г, ЧТКА правой ВСА 2013 г, левой 2014 г, ГБ 3 ст, АГ 2 ст, риск 4. СГХС определенная (критерии DLCN – 24 балла). При обследовании, на фоне приема липидснижающих препаратов из группы статинов, уровень ОХС 18,6 ммоль/л. У пациентки были определены редкие варианты в

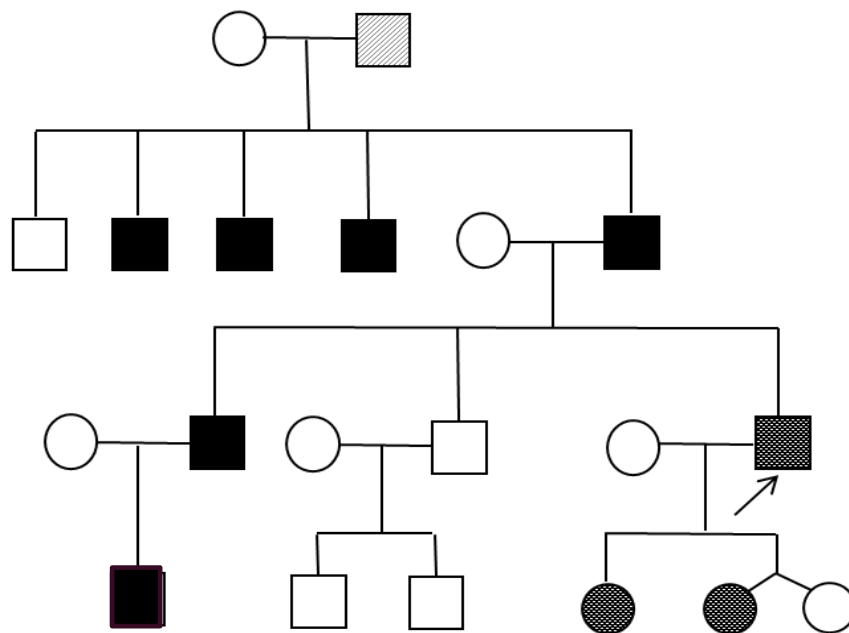
В 3 и 8 экзонах гена *LDLR*: Chr19:11213415 и Chr19:11222252

NM_000527:exon3:c.G266C:p.C89S - ранее в этой позиции был описан редкий «патогенный» вариант rs875989894 с заменой G>A;

Второй вариант описан впервые: NM_000527:exon8:c.T1123G:p.Y375D

- Пациент П10, женщина, 34 лет (2020 г.). Диагноз: МКШ. ПКА 2009. ИМ 2020. СГХС определенная (критерии DLCN – 18 баллов). При обследовании, на фоне приема липидснижающих препаратов из группы статинов, уровень ОХС 25 ммоль/л, ХС-ЛНП 12 ммоль/л. У пациентки были определены редкие варианты

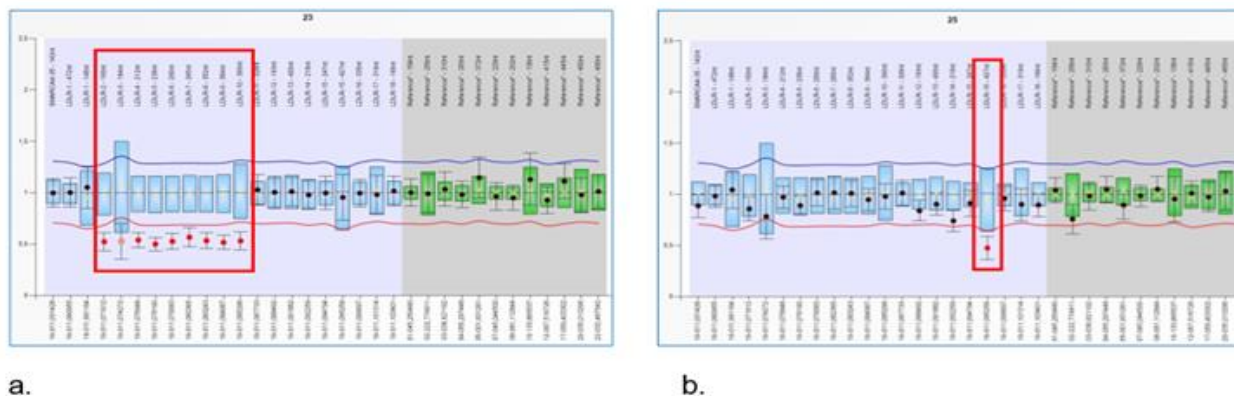
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ: РЕДКИЙ ВАРИАНТ В РЕГУЛЯТОРНОМ РАЙОНЕ ГЕНА *LDLR*



▨ пробанд с СГХС, носитель варианта G/A rs879255191; ● - дочери пробанда с гиперхолестеринемией, носители варианта G/A rs879255191; ■ - родственники мужского пола, перенесшие инфаркт миокарда в возрасте до 53 лет; ▨ - дед пробанда погиб в возрасте до 45 лет.

Rs879255191 (c.2389+5G>A) - высококонсервативный динуклеотид донорного сайта сплайсинга интрона 16 гена *LDLR*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЛЕЦИЙ И ДУПЛИКАЦИЙ В ГЕНЕ *LDLR* МЕТОДОМ MLPA



42 пациентам с СГХС, без функционально–значимых замен в генах *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, был выполнен MLPA для определения структурных изменений промотора и экзонов гена *LDLR*

Выявлены делеции в образцах ДНК двух неродственных пациентов:

- гетерозиготная делеция затрагивала участок со 2 по 10 экзоны гена *LDLR*
- гетерозиготная делеция 15 экзона гена *LDLR*

MLPA позволяет дополнительно выявить до 2-3% пробандов

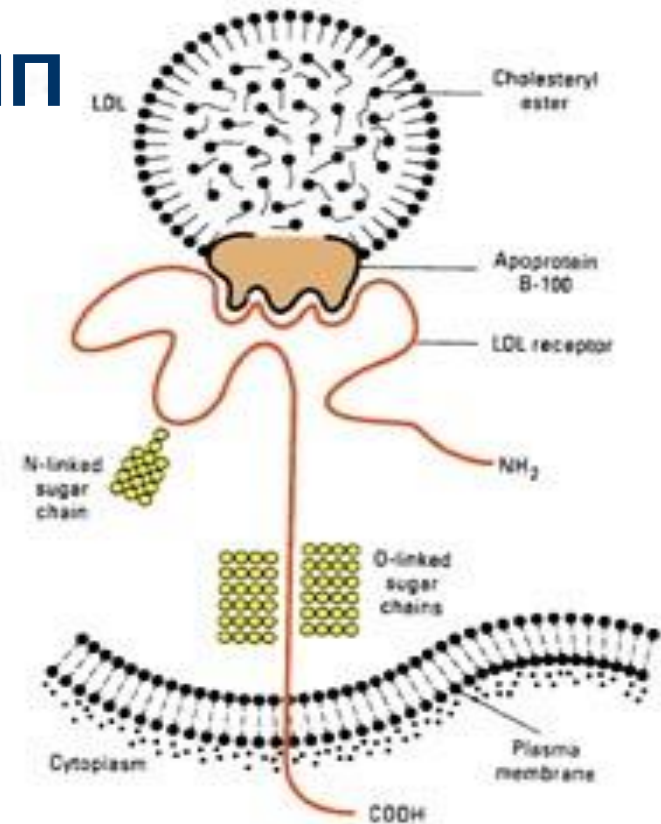
Семейная гиперхолестеринемия вследствие дефекта АРОВ

Рецептор ЛНП

1:700 (гетерозиготы)

Аро-В-100 лиганд для рецептора
ЛНП

Клинически идентична
классической СГХС

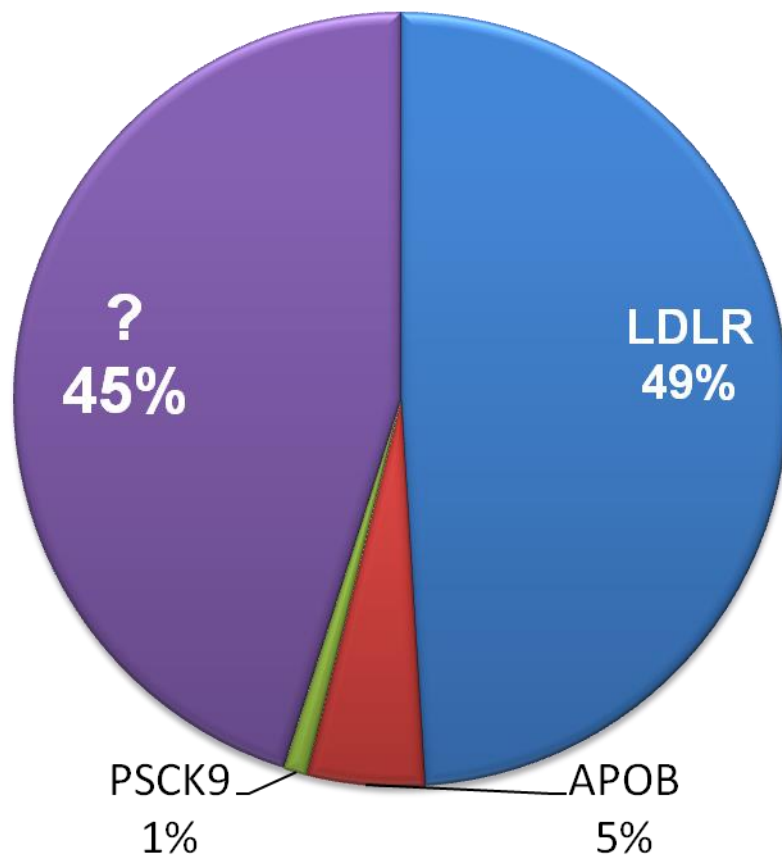


В популяции России мутация p.Arg3527Gln <0,05%

РЕДКИЕ ВАРИАНТЫ В ГЕНЕ АРОВ У ПАЦИЕНТОВ С СГХС

Пациент	Номер позиции	Замена аминокислот	Частота редкого аллеля по данным GnomAD	Клиническое значение по данным ClinVar
P11, P15, P71	rs5742904	p.Arg3527Gln	T=0.000275	Pathogenic

- пациент P71 - 36 лет, ксантомы, ОХС 7,75 ммоль/л, ХС-ЛПНП 5,76 ммоль/л на фоне приема статинов, DLCN 12 баллов.
- Сын пациента P11 - 13 лет, ОХС 6,9 ммоль/л
- пациент P15 - 25 лет, ОХС 7,5 ммоль / л, ХС-ЛПНП 5,7 ммоль / л, DLCN 11 баллов



**Редкие патогенные
варианты в генах
LDLR, APOB, PCSK9
– 56-60% СГХС**

**Отрицательный
результат анализа генов
LDLR, APOB, PCSK9 не
исключает СГХС**

Номер пациент а	Номер позиции	Замена аминокислот	Частота редкого аллеля по данным GnomAD	Клиническое значение по данным ClinVar
ABCG5				
P74	rs145164937	p.Ala98Gly	C=0.002223	Conflicting interpretations of pathogenicity
APOC3				
P59	rs138326449	c.55+1G>A Splice Donor Variant	C=0.002244	Conflicting interpretations of pathogenicity
LPL				
P9	rs118204077	p.Arg270Cys	C=0.0001	Pathogenic
SREBF1				
P83, P84	rs115855236	p.Pro141Leu	A=0.001210	Not reported in ClinVar

РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Редкий вариант rs760657350 в гетерозиготной форме в гене **PLD1** (phospholipase D1):

Splice Acceptor Variant, chr3:171645024 (GRCh38.p13)

Новый вариант в гене **SIDT1** (SID1 family of transmembrane dsRNA-gated channels)

Все варианты впервые описаны у пробандов с клиническим диагнозом СГХС и являются перспективными для дальнейшего изучения. Для гена **SIDT1** ранее было показано участие в транспорте холестерина (Méndez-Acevedo КМ, 2017), но в контексте изучения фенотипа семейной гиперхолестеринемии он не изучался.

Новый вариант в гене **LRP1B** (LDL receptor related protein 1B)

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КАСКАДНОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА VS ФЕНОТИПИЧЕСКОГО:

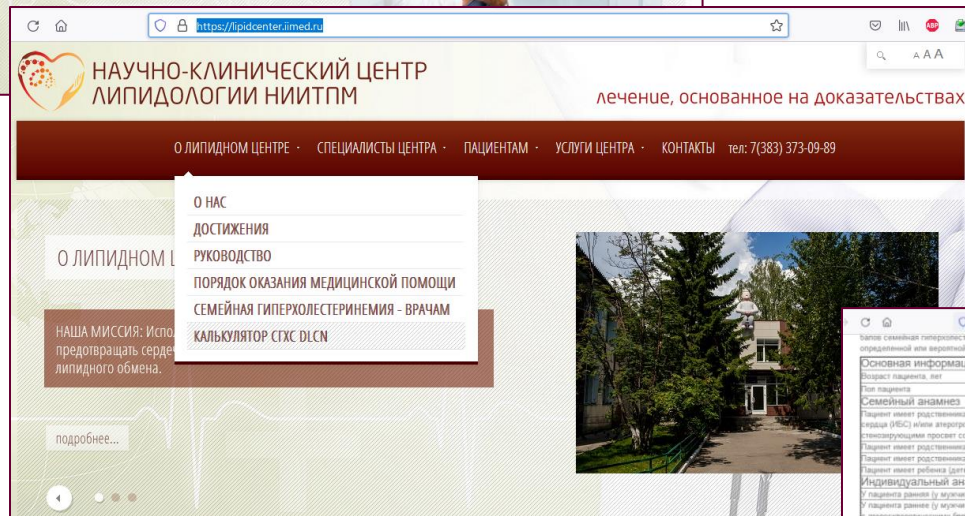
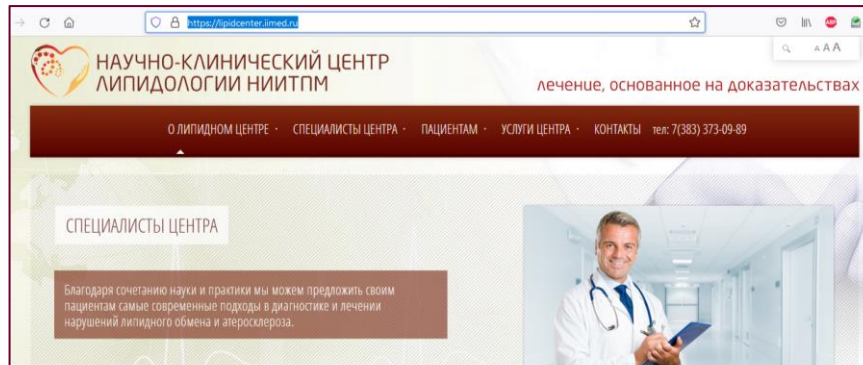
- **38% (Нидерланды) и 53% (Норвегия) пациентов были не лечены до постановки генетического диагноза**
- **(93% и 89% получают лечение после постановки диагноза, соответственно)**
- **менее чем 10% пациентов получали адекватную липидснижающую терапию до проведения генетического скрининга**

СТРАТЕГИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ СГХС

- Полноэкзомное или таргетное секвенирование генов с последующей верификацией найденных замен прямым автоматическим секвенированием по Сэнгеру
- Прямое автоматическое секвенирование экзонов генов *LDLR*, *APOB*, *PSCK9*, включая 20 п.н. фланкирующих некодирующих районов ДНК по обе стороны от каждого экзона. Гены могут быть тестированы одновременно или последовательно. В случае отсутствия мутаций в данных генах показано высокотехнологичное секвенирование
- Определение последовательности одного или нескольких экзонов у членов семьи с известными мутациями

Рекомендуется провести диагностику родственникам лиц с клиническим диагнозом СГХС, включая родственников 1-й, 2-й и, когда это возможно, 3-й степени биологического родства

<https://lipidcenter.iimed.ru/>



Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины –
Филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук
(630089, Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1)

НАПРАВЛЕНИЕ НА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

ФИО пациента _____
 Год рождения _____ муж/жен _____
 Города _____
 Стационар/отделение _____ № и/б _____
 Диагноз _____

Клинические критерии: _____ (баллы)
 Семейный анамнез (патология ССЗ) _____

Материал, направляемый на исследование: кровь (антикоагулянт – ЭДТА)
 Исследование на (отметить необходимые строки знаком +):

Исследование методом прямого автоматического секвенирования промотора и 18 экзонов гена LDLR (срок выполнения анализа – 35 рабочих дней)	
Исследование методом прямого автоматического секвенирования одного экзона гена LDLR (срок выполнения анализа – 12 рабочих дней), для подтверждения мутации у родственников пациента	
Исследование мутации R3500Q (rs5742904) гена APOB	
Исследование методом прямого автоматического секвенирования одного экзона гена APOB (срок выполнения анализа – 12 рабочих дней)	
Исследование методом прямого автоматического секвенирования 13 экзонов гена рецептора PCSK9 (срок выполнения анализа – 35 рабочих дней)	
Исследование методом прямого автоматического секвенирования одного экзона гена рецептора PCSK9 (срок выполнения анализа – 12 рабочих дней), для подтверждения мутации у родственников пациента	
Таргетное секвенирование генов липидного обмена (срок выполнения анализа – по мере набора группы)	

Врач _____ тел. _____ e-mail _____
 Дата _____

https://lipidcenter.iimed.ru/ru/lipidom-ba.html

Важно! Семейная гиперхолестеринемия может быть определенной, наследственной или приобретенной. Тип этого диагноза «Семейная гиперхолестеринемия» выставляется только при наличии определенной или вероятной формы.

Основная информация	
Пол пациента, лет	Показать/скрыть, выбрать: ▼
Семейный анамнез	
Пациент имеет родственника первой степени родства с известной гиперлипидемией (у мужчин менее 55 лет, у женщин менее 60 лет) ишемическую болезнь сердца (ИБС) или/и атеросклеротическим ишемическим инсультом, или периферическим атеросклерозом с атеросклеротическими бляшками, стенозирующими просвет сосуда более 50 %	☐
Пациент имеет родственника первой степени родства с известным уровнем холестерина ЛПНП > 95 процентов по возрасту и полу	☐
Пациент имеет родственника первой степени родства с суточной скоростью мочи более 300 мг/сут	☐
Пациент имеет родственника (детей) моложе 18 лет с холестерином ЛПНП более 95 процентов по возрасту и полу	☐
Индивидуальный анамнез	
У пациента данные (у мужчин менее 55 лет, у женщин менее 60 лет) ишемическая болезнь сердца	☐
У пациента данные (у мужчин менее 55 лет, у женщин менее 60 лет) данные атеросклеротического ишемического инсульта, или периферического атеросклероза с атеросклеротическими бляшками, стенозирующими просвет сосуда более 50 %	☐
Физикальное обследование	
У пациента суточные симптомы	☐
У пациента симптомы дилатации в возрасте менее 45 лет	☐
Биохимические результаты (холестерин ЛПНП) (у взрослых, старшей, получить уровень холестерина ЛПНП перед лечением)	
Более 325 мг/дл (>=8.5 ммоль/л)	☐
251-325 мг/дл (6.5-8.4 ммоль/л)	☐
191-250 мг/дл (5.0-6.4 ммоль/л)	☐
165-190 мг/дл (4.3-5.0 ммоль/л)	☐
менее 165 мг/дл (<4.0 ммоль/л)	☐
Анализ ДНК	
Наличие патогенного или вероятно патогенного варианта нуклеотидной последовательности генов LDLR, APOB, PCSK9 или LDLRAP1	☐
Результат:	Вычислить Очистить
Диагноз ставится на основании суммы баллов	0

COPYRIGHT_2022_ НИИТПМ_ШАХТШЕЙДЕР Е.В.

- **Забор крови производится из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 2-5 мл и переносится в пробирку с ЭДТА или специальную вакуумную систему типа “Vessuette” (с ЭДТА с сиреневой крышкой), пробирка закрывается пробкой и переворачивается несколько раз (для перемешивания с антикоагулянтом)**
- **Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя!**
- **Пробирку с кровью до исследования хранят в холодильнике при +4°C - +8°C**
- **Максимальный срок хранения: кровь, собранная в пробирку с ЭДТА, может храниться при +4°C — +8°C 2 дня (для длительного хранения пробы замораживают и хранят при -20 C)**

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (СГХС)

- 1. Верификация диагноза пациента**
- 2. Обследование членов семьи**
- 3. Первичная профилактика**
- 4. Раннее начало и адекватность проводимой
терапии**

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!

