

Семейный дефект аполипопротеина В-100: молекулярная основа заболевания и клинико-биохимические особенности пациентов

П.П. Малышев, А.Н. Мешков, Л.А. Котова, В.В. Кухарчук

Институт клинической кардиологии им. А.Л.Мясникова РКНПК Росздрава. Москва, Россия

Familial defect of apolipoprotein B-100: molecular disease basis and clinico-biochemical characteristics of the patients

P.P. Malyshev, A.N. Meshkov, L.A. Kotova, V.V. Kukharchuk

A.L. Myasnikov Research Institute of Clinical Cardiology, Russian Cardiology Scientific and Clinical Complex,
Russian Federal Agency for Health and Social Development. Moscow, Russia

Цель. Определить характер и частоту мутаций гена аполипопротеина (апо) В-100 у пациентов с клиническим диагнозом гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (СГ) и охарактеризовать фенотипические проявления у носителей мутации.

Материал и методы. Скрининг на мутации в 26-м экзоне гена апо В-100 был проведен среди 111 пациентов с клиническим диагнозом гетерозиготной СГ. При анализе дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) использовали аллельспецифическую полимеразную цепную реакцию, рестрикционный анализ, анализ полиморфизма конформации одноцепочечного фрагмента ДНК (SSCP) и секвенирование участков ДНК с аномальной электрофоретической подвижностью.

Результаты. Среди больных с клиническими проявлениями гетерозиготной СГ у 4,5% была обнаружена мутация гена апо В-100. Мутация R3500Q была единственным видом нарушения в структуре гена апо В-100 у обследованных пациентов. Больные с дефектом апо В-100 по сравнению с носителями мутации рецептора липопротеина низкой плотности (ЛНП-рецептора) характеризовались менее выраженной ГХС.

Заключение. Мутация R3500Q гена апо В-100 наряду с мутациями ЛНП-рецептора является одной из причин высокого уровня ХС у российских пациентов, в то время как другие мутации 26-го экзона гена этого белка, по-видимому, очень редки.

Ключевые слова: семейный дефект апо В-100, гиперхолестеринемия, ксантомы.

Aim. To identify character and prevalence of apolipoprotein (apo) B-100 gene mutation in patients with clinical diagnosis of heterozygote familial hypercholesterolemia (FH); to describe its phenotypical features in mutation carriers.

Material and methods. In 111 patients with clinical diagnosis of heterozygote FH, screening for exon 26 apo B-100 gene mutations was performed. For DNA analysis, allele-specific PCR, restriction analysis, analysis of DNA single-strand conformation polymorphism (SSCP), and sequestering of DNA fragments with anomaly electrophoretic activity were used.

Results. In patients with clinics of heterozygote FH, 4,5% had apo B-100 gene mutation. R3500Q mutation was the only apo B-100 gene structure anomaly observed in these individuals. Compared to patients with low-density lipoprotein (LDL) receptor mutation, subjects with apo B-100 defect had less manifested HCH.

Conclusion. R3500Q mutation of apo B-100 gene, together with LDL receptor mutations, partially explain high CH levels in Russian patients. Other mutations of this protein's exon 26 could be very rare.

Key words: Familial apo B-100 defect, hypercholesterolemia, xanthomas.

Введение

Когда в середине 70-х годов прошлого века стало известно, что повышенная концентрация липопротеинов низкой плотности (ЛНП) плазмы при семейной гиперхолестеринемии (СГ) вызывается наследственным дефектом рецептора ЛНП (ЛНП-Р), появилась гипотеза, что причиной гиперхолестеринемии (ГХС) может быть и зеркально противоположная ситуация — генетический дефект лиганда при нормальном рецепторе. В 1986г появилось сообщение о группе пациентов, у которых был нарушен катаболизм собственных ЛНП, тогда как катаболизм ЛНП от здоровых доноров не был изменен [1]. Затем было показано, что ЛНП этих пациентов связывались с ЛНП-Р *in vitro* только на 30%, а у некоторых родственников 1 степени родства диагностировали ГХС вследствие дефектных ЛНП, что соответствовало доминантной мутации, предположительно в гене аполипопротеина (апо) В-100. Это нарушение предложили называть “familial defective apolipoprotein В-100” [2]. Поиск причинной мутации в гене апо В в области, кодирующей рецептор-связывающий домен белка, выявил однонуклеотидную замену в кодоне 3500, в результате чего одна аминокислота (аргинин) замещалась на другую (глутамин) [3].

Принято считать, что распространенность семейного дефекта (СД) апо В в популяции составляет приблизительно 1 на 500-700 человек [4,5]. Результаты популяционных исследований, а также данные изучения групп высокого риска в Европе показали значительную вариабельность распространенности этого СД в разных популяциях — от 1:71 [6] до 1:1250 [7]. К настоящему времени идентифицировано несколько мутаций в гене апо В-100, которые ведут к укорочению белка или аминокислотным заменам в составе белка, что приводит к развитию ГХС: R3480W, R3500Q, R3500W и R3531C [3,8-10]. Мутация R3500Q является наиболее частым СД и изучена лучше прочих [6].

В 1998г был опубликован первый случай выявления СД апо В в России [11]. Исключая данные авторов, с тех пор не сообщалось о других пациентах с этим заболеванием. Таким образом, СД апо В является по существу не изученной в России патологией. Не известны ни распространенность этого нарушения, ни характер и частота возможных мутаций, лежащих в основе его возникновения, ни особенности течения заболевания у российских пациентов.

Материал и методы

Пациенты. Скрининг на СД апо В был проведен среди группы пациентов с клиническими признаками гетерозиготной формы СГ (критерии MED-PED — Make Early Diagnosis to Prevent Early Deaths) [12], наблюдающихся в Институте клинической кардиологии им. А.Л.Мясникова, у кого были доступны образцы крови для анализа ДНК. В исследование включали пробандов, не связанных между собой родством; при выявлении мутации апо В-100 обследовали всех доступных родственников пациентов.

Определение липидного профиля (ЛП). Уровни общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ) и ХС липопротеинов высокой плотности (ЛВП) определяли стандартными ферментативными методами. Содержание ХС ЛНП рассчитывали по формуле Friedewald W 1972.

Анализ дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). При анализе 26-го экзона гена апо В-100 методика выделения ДНК, условия проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием соответствующих праймеров и анализа полиморфизма подвижности конформаций одноцепочечной ДНК (SSCP), а также секвенирования аномальных фрагментов ДНК были теми же самыми, как описано ранее [13]. Детекцию мутации апо В3500 осуществляли методом аллельспецифической ПЦР. Метод основан на создании в ходе ПЦР дополнительного фрагмента длиной 144 пар нуклеотидов (п.н.) с помощью дополнительного праймера, комплементарного мутантному аллелю. В норме амплифицируется лишь один фрагмент длиной 320 п.н., который служит внутренним контролем эффективности ПЦР. Мутацию апо В3531 определяли методом анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. Метод основан на создании в ходе ПЦР естественного сайта рестрикции Mph1103I в мутантном, но не в нормальном аллеле. Последующая обработка рестриктазой ПЦР-продукта длиной 320 п.н. в случае данной мутации приводит к образованию двух фрагментов длиной 102 и 218 п.н. В отличие от мутантного аллеля нормальный не чувствителен к рестриктазе. Продукты рестрикции анализировали электрофорезом в 3%-ном агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия. Размер фрагментов определяли с помощью стандартов 50 bp-Ladder (“Life Technologies”, Великобритания).

Результаты

Характеристика обследованной группы пациентов представлена в таблице 1.

Генетическое тестирование

Поскольку все известные мутации, вызывающие СД апо В, затрагивают рецептор-связывающий домен апо В-100, для выявления возможных мутаций исследовали 26-й экзон этого гена. Такой подход заключался в следующем: при использовании одного и того же набора праймеров мутацию R3500Q исключали методом аллельспецифической ПЦР, мутацию R3531C — методом рестрикционного анализа; ДНК всех обследуемых пациентов подвергали SSCP с последующим секвенированием аномальных образцов.

Таблица 1

Клинико-биохимические характеристики пробандов (n=111) с клиническим диагнозом СГ, тестированных на мутации апо В

Клинически «несомненный»/«вероятный» диагноз СГ согласно критериям MED-PED	103/8
Пол (м/ж)	44/67
Возраст, годы	44 (диапазон 5–73)
Ксантомы сухожилий, %	86
Ксантелазмы, %	35
Дуга роговицы, %	42
ИБС, %	68
ОХС, ммоль/л	11,5 (2,5) (диапазон 7,1–20,7)
ТГ, ммоль/л	1,8 (0,8) (диапазон 0,3–4,5)

Примечание: данные ЛП представлены как средние и (стандартное отклонение).

Аллельспецифическая ПЦР для детекции мутации R3500Q. При электрофорезе продуктов аллельспецифической ПЦР у 5 больных была обнаружена аномальная миграция ДНК.

Рестрикционный анализ. Этим методом с использованием рестриктазы Mph1103I не было выявлено ни одного носителя мутации R3531C.

SSCP-анализ. Смещение полос при электрофорезе ПЦР-продукта 26-го экзона гена апо В-100 в полиакриламидном геле наблюдалось у всех 5 пациентов, которые уже были идентифицированы методом аллельспецифической ПЦР. В то же время другие аномальные образцы в исследуемой коллекции при SSCP отсутствовали.

Секвенирование аномальных фрагментов ДНК. Для уточнения природы генного дефекта, точнее, подтверждения мутации R3500Q, нуклеотидную последовательность продуктов ПЦР-образцов, показавших аномальную миграцию при SSCP, секвенировали. В норме в положении 10708 гена апо В имеется только нуклеотид G, тогда как все 5 пациентов оказались гетерозиготными по указанному положению, где одновременно присутствовали нуклеотиды G и A.

Фенотипическая характеристика пациентов с гетерозиготной формой СД апо В

Первоначально при генетическом скрининге были идентифицированы 5 пациентов (все женского пола) с СД апо В, в последующем при анализе ДНК родственников этих больных выявлено еще 3 носителя мутации. В целом, в двух семьях идентифицировано 3 и 2 носителя, в остальных — по одному. 7 пациентов из 4 семей были русской национальности, в одном случае национальность пробанда не выяснена. Установлено, что в 3 семьях больные родители были родом из Центральной России, в одной семье мать пробанда, предположительно носитель мутации, была по национальности литовкой. Еще в одной семье данные о происхождении родителей отсутствовали. 6 из 8 пациентов в разное время были госпитализированы в клинику.

В таблице 2 отражены клиническая характеристика и ЛП этих пациентов. Ишемическая болезнь сердца (ИБС) при первом обращении в клинику была выявлена у 4 больных (все женщины); у 2 из них в возрасте 46 и 48 лет была выполнена коронароангиография, на которой в обоих случаях было обнаружено гемодинамически значимое поражение (стенозы >75% по

Таблица 2

Клинико-лабораторные характеристики гетерозиготных пациентов с СД апо В

№ семьи	Степень родства с пробандом	Возраст/пол	ИМТ (кг/м ²)	ОХС	ТГ	ХС ЛВП	Начало ИБС, годы	Ксантомы сухожилий	Ксантелазмы
1	пробанд	21/ж	-	8,31	1,07	1,6	-	-	-
	отец	41/м	27,4	8,05	0,76	1,19	-	-	-
	бабушка	75/ж	25,6	7,7	2,07	-	59	?	-
2	пробанд	46/ж	22,6	9,49	0,99	-	29	+	-
	дочь	37/ж	23,4	8	-	-	-	?	-
3	пробанд	50/ж	27,9	8,84	1,52	-	-	+	-
4	пробанд	48/ж	19,2	7,1	1,28	0,98	48	+	-
5	пробанд	65/ж	22,2	10,4	-	-	65	+	-

Примечание: представленные данные получены при первоначальном обследовании пациентов в клинике; ИМТ — индекс массы тела; липиды даны в ммоль/л.

диаметру сосуда) коронарного русла. У одной из этих пациенток отмечали раннее появление стенокардии напряжения (в возрасте 29 лет), у другой коронарный атеросклероз сочетался с гемодинамически значимым атеросклеротическим поражением сонных артерий (стенозы >70% по диаметру сосуда). Известно, что третья пациентка, страдавшая ИБС, впоследствии умерла в возрасте 78 лет от острого инфаркта миокарда (ИМ). Ксантомы сухожилий, преимущественно ахилловых, были обнаружены у 4 из 5 больных, в т.ч. у 3 – ИБС; ксантелазм не было ни у кого.

Обсуждение

СД апо В – генетическое заболевание, которое в большинстве случаев связано с заменой аргинина глутамином в кодоне 3500 (R3500Q) [3,14]. Другие миссенс-мутации, вызывающие это заболевание, такие как R3480W, R3500W и R3531C, встречаются значительно реже. Мутация R3500Q идентифицирована во многих популяциях по всему миру [15]. Полученные в последние годы данные указывают на распространение мутации R3500Q также и в популяциях стран Восточной Европы, в т.ч. у лиц славянского происхождения [16].

Первый случай мутации R3500Q в России был описан в 1998г [11]. В этой работе мутация апо В была обнаружена при анализе 27 образцов ДНК пациентов с ИБС и ГХС. У носителя мутации, мужчины 42 лет, наблюдались повышенный уровень ХС сыворотки (9,6 ммоль/л) и документированная ИБС. Усилия других отечественных исследователей в этом отношении не увенчались успехом: никаких мутаций в гене апо В-100 не было обнаружено в других работах [17–19], несмотря на то, что эти исследования проводились в разных группах больных, как с ИБС, так и с клиническим фенотипом СГХС. Таким образом, к настоящему времени мутация R3500Q в России обнаружена в 6 семьях, включая данные авторов от 5 семей.

Клинически разграничить СГ от СД апо В невозможно, поскольку оба заболевания имеют большое сходство. В большинстве липидных клиник 2–5% пациентов с клиническим диагнозом СГ на самом деле имеют СД апо В [4]; например, в Нидерландах СД апо В был выявлен у 1,85% из 970 пациентов с клиническим диагнозом СГ [20], в Великобритании – у 3% в группе из 562 больных с СГ [21]. В настоящей работе у

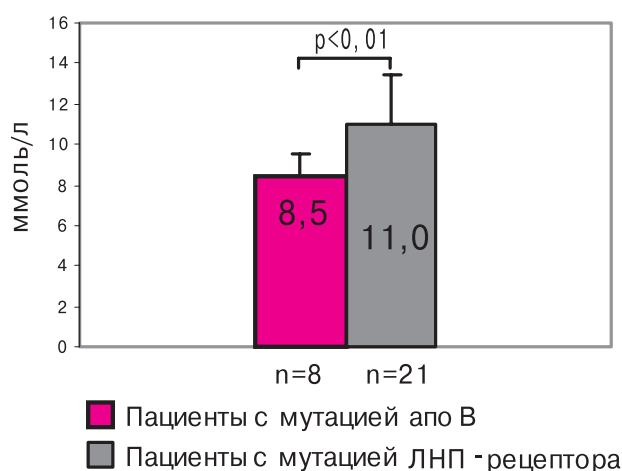


Рис. 1 Уровень ОХС сыворотки у гетерозигот с мутацией апо В-100 (R3500Q) и мутациями ЛНП-Р, выявленными в исследовании.

93% из 111 обследованных пробандов диагноз гетерозиготной СГ соответствовал «несомненному» согласно критериям MED-PED, и в этой группе было выявлено 5 случаев СД апо В. Среди последних «вероятный» диагноз заболевания отмечен только у 1 из 5 больных, причем это была самая молодая пациентка данной группы и без ксантом сухожилий. Во всех случаях причиной заболевания была мутация R3500Q. Таким образом, в популяции больных с клиническим диагнозом СГ мутация R3500Q объясняла 4,5% случаев заболевания, что, в общем, согласуется с зарубежными оценками.

Низкий процент выявления СД апо В среди пациентов с клиническими признаками СГ при приблизительно одинаковой распространенности обоих заболеваний в общей популяции объясняется определенными фенотипическими различиями, которые были обнаружены при анализе данных большего числа пациентов. В ряде зарубежных исследований были продемонстрированы некоторые количественные фенотипические отличия этих заболеваний, касающиеся, прежде всего, липидных показателей. В частности, было показано, что у гетерозигот с СД апо В средний уровень ХС ЛНП существенно ниже, чем у гетерозигот с СГ [22]. ГХС умеренной степени и даже нормальный уровень ХС плазмы у больных с СД апо В зафиксированы несколькими авторами [22]. В настоящей работе у больных с СД апо В средний уровень ОХС также был достоверно ниже по сравнению с пациентами с ДНК-верифицированным диагнозом СГ (рисунок 1). При даже небольшом числе наблюдений (n=8), по-

лученные данные указывают на то, что ГХС более выражена при дефекте рецептора, чем при дефекте лиганда.

Распространенность СД апо В сильно зависит от обследуемого контингента пациентов. Помимо ГХС, другой категорией повышенного риска является популяция больных ИБС. Показано, что частота СД апо В у больных, перенесших ИМ, вдвое выше, чем у лиц без этого заболевания [23]. ИБС при СД апо В наблюдается у 40% пациентов мужского и у 20% женского пола в возрасте < 50 лет. Хотя эта ситуация похожа на ту, которая наблюдается при СГ, однако имеются некоторые различия. У пациентов мужского пола > 40 лет ИБС развивается чаще при СГ, чем при СД апо В. Обратная ситуация наблюдается у больных женщин: в возрасте > 50 лет ИБС чаще возникает при мутации апо В, чем при мутации ЛНП-Р [24]. В настоящей работе у всех 4 больных ИБС также отмечалось раннее развитие заболевания (в возрасте 29-65 лет). В одном случае коронарный атеросклероз сочетался со значимым каротидным атеросклерозом. Вследствие малого числа наблюдений нельзя провести прямое сравнение частоты развития ИБС между СД апо В и СГ.

Большинство пациентов с СД апо В в исследовании были русской национальности. Недостаточное количество случаев этого заболевания не позволяет сделать выводы о географическом распределении мутации R3500Q, однако известно, что большая часть пациентов была родом из Центральной России.

По данным SSCP-анализа возможно исключить мутацию R3500W гена апо В-100 как одну из причин ГХС у пациентов. В исследованиях, проведенных за рубежом, эту мутацию находили как в азиатских, так и в европейских популяциях. По-видимому, мутация R3500W является редкой в западных популяциях; так, в исследовании [25] она была идентифицирована лишь у 2 из 907 пациентов с гиперлипидемией.

В ряде работ мутация R3531C ассоциировалась с развитием ГХС, но менее выражен-

ной, чем при мутации R3500Q. Частота этого дефекта в избирательных популяциях пациентов, обследованных при липидных клиниках, составляет 1:206-987 [26]. В этом исследовании методами рестрикционного анализа и SSCP не было выявлено ни одного пациента с мутацией R3531C. Этот результат не явился неожиданным, поскольку исследуемая группа пациентов соответствовала самым строгим критериям клинического диагноза СГ, т.е. состояла из больных с выраженным, а не с умеренным повышением ХС.

Таким образом, в настоящем исследовании мутации R3531C и R3500W не являлись причиной ГХС ни у одного из 111 пробандов со средним уровнем ОХС 11,5 ммоль/л – 95% доверительный интервал: 11,05-12,0.

Следует отметить, что в работе была амплифицирована и подвергнута скринингу на возможные мутации область гена апо В-100 длиной 320 п.н. Этот фрагмент покрывает и предполагаемое местоположение мутации H3543Y, которая, как показали исследования последних лет в Германии, может быть наиболее частой мутацией апо В. Ее частота в популяции оценивается гораздо выше, чем мутации R3500Q (0,47% vs 0,12% соответственно) [27]. Однако для выяснения физиологической и функциональной роли мутации H3543Y необходимы дальнейшие исследования. В работе по данным SSCP не было выявлено ни одного случая этой мутации.

В заключение, по данным выполненного исследования у 4,5% больных с клинической картиной гетерозиготной СГХС была обнаружена мутация R3500Q гена апо В-100. Носители этого дефекта характеризовались менее выраженной ГХС по сравнению с носителями мутации ЛНП-Р. Таким образом, мутация R3500Q в гене апо В-100, наряду с мутациями гена ЛНП-Р, является одной из причин высокой ГХС у российских пациентов, в то время как другие мутации 26-го экзона гена этого белка, по-видимому, очень редки.

Литература

1. Vega GL, Grundy SM. In vivo evidence for reduction binding of low density lipoprotein to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1986; 78: 1410-8.
2. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6919-23.
3. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HRG, et al. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 587-91.
4. Myant NB. Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparisons with familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1993; 104: 1-18.
5. Rauh G, Keller C, Schuster H, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: a common cause of primary hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1992; 70: 77-84.
6. Fisher E, Scharnagl H, Hoffmann MM, et al. Mutations in the apolipoprotein (apo) B-100 receptor binding region: detection of apo B-100 (Arg3500Gln) associated with two new haplotypes and evidence that apo B-100 (Glu3405Gln) diminishes receptor-mediated uptake of LDL. *Clin Chem* 1999; 45: 1026-38.
7. Hansen PS. Familial defective apolipoprotein B-100. *Dan Med Bull* 1998; 45: 370-82.
8. Gaffney D, Reid JM, Cameron IM, et al. Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidaemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1025-9.
9. Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, et al. Familial ligand-defective apolipoprotein B: identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J Clin Invest* 1995; 95: 1225-34.
10. Boren J, Ekstrom U, Agren B, et al. The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100. *J Biol Chem* 2001; 276: 9214-8.
11. Pogoda T, Metelskaya V, Perova N, et al. Detection of apoB-3500 mutation in a Russian family with coronary heart disease. *Hum Hered* 1998; 48: 291-2.
12. WHO-Human Genetics, DoNDP, Familial Hypercholesterolaemia — Report of a second WHO Consultation, ed. WHO. 1999, Geneva
13. Мешков А.Н., Стамбольский Д.В., Крапивнер С.Р. и др. Мутации гена рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с клиническим диагнозом семейной гиперхолестеринемии. *Кардиология* 2004; 9: 58-61.
14. Boren J, Lee I, Zhu W, et al. Identification of the low-density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo B-100. *J Clin Invest* 1998; 101: 1084-93.
15. Miserez AR, Muller PY. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation emerged in the Mesolithic ancestors of Celtic peoples? *Atherosclerosis* 2000; 148: 433-6.
16. Kalina A, Csaszar A, Czeizel A, et al. Frequency of the R3500Q mutation of the apolipoprotein B-100 gene in a sample screened clinically for familial hypercholesterolemia in Hungary. *Atherosclerosis* 2001; 154: 247-51.
17. Schwartz EI, Shevtsov SP, Kuchinski AP, et al. Approach to identification of point mutation in apolipoprotein B-100 gene by means of PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 3752.
18. Шевцов С.П. Отсутствие ДНК-полиморфизмов на участке гена АРОВ, кодирующем предполагаемый домен связывания белка АРов-100 с рецептором липопротеидов низкой плотности. *Генетика* 1996; 2: 295-7.
19. Zakharova FM, Damgaard D, Mandelshtam MY, et al. Familial hypercholesterolemia in St.-Petersburg: the known and novel mutations found in the low density lipoprotein receptor gene in Russia. *BMC Med Genet* 2005; 6: 6.
20. Defesche JC, Pricker LK, Hayden RM, et al. Familial defective apolipoprotein B-100 is clinically indistinguishable from familial hypercholesterolemia. *Arch Intern Med* 1993; 153: 2349-56.
21. Talmud P, Tamplin JO, Heath K, et al. Rapid testing for three mutations causing familial defective apolipoprotein B100 in 562 patients with familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1996; 125: 135-7.
22. Miserez AR, Keller N. Differences in the phenotypic characteristics of subjects with familial defective apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1719-29.
23. Brousseau T, Arveiler D, Cambou JP, et al. Familial defective apolipoprotein B-100 and myocardial infarction. The ECTIM study. *Atherosclerosis* 1995; 116: 267-71.
24. Tybjaerg-Hansen A, Humphries SE. Familial defective apolipoprotein B-100: a single mutation that causes hypercholesterolemia and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1992; 96: 91-107.
25. Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Meinertz H, et al. Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1998; 338: 1548-77.
26. Vrablik M, Ceska R, Horinek A. Major apolipoprotein B-100 mutations in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Physiol Res* 2001; 50: 337-43.
27. Soufi M, Sattler AM, Maerz W, et al. A new but frequent mutation of apoB-100 - apoB His3543Tyr. *Atherosclerosis* 2004; 174: 11-6.

Поступила 24/04-2007