

Идентификация патогенного варианта с.683_684insCTGCAAGGACAAATCTGACGA гена рецептора липопротеинов низкой плотности у пациента с семейной гиперхолестеринемией. Клинический случай

Корнева В. А.¹, Мандельштам М. Ю.², Орлов А. В.³, Васильев В. Б.², Кузнецова Т. Ю.¹, Захарова Ф. М.²

¹ФГБОУ ВО "Петрозаводский государственный университет". Петрозаводск; ²ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины". Санкт-Петербург; ³ФГБУ ГНЦ РФ "Институт медико-биологических проблем" РАН. Москва, Россия

Семейная гиперхолестеринемия (СГХС) — одно из наиболее часто встречающихся моногенных заболеваний, приводящее к раннему развитию атеросклероза и характеризующееся неблагоприятным прогнозом. При этом лишь около 1% случаев СГХС диагностируются в России. Целью данного исследования было определение генетического дефекта в семье с СГХС и проведение ДНК-диагностики у родственников пробанд. Исследование проводили на образцах крови, полученных с информированного согласия пациентов. В работе были использованы методы выделения ДНК из замороженной крови, полимеразная цепная реакция и электрофорез в полиакриламидном геле. Впервые в России был идентифицирован патогенный вариант нуклеотидной последовательности с.683_684insCTGCAAGGACAAATCTGACGA гена рецептора липопротеинов низкой плотности (*LDLR*) и показана его косегрегация в семье с высоким уровнем холестерина крови. Полученные данные позволяют рассматривать инсерцию с.683_684insCTGCAAGGACAAATCTGACGA как вероятную причину СГХС.

Ключевые слова: клинический случай, патогенный вариант, семейная гиперхолестеринемия, сердечно-сосудистые заболевания.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 26/04-2023

Рецензия получена 03/06-2023

Принята к публикации 23/06-2023



Для цитирования: Корнева В. А., Мандельштам М. Ю., Орлов А. В., Васильев В. Б., Кузнецова Т. Ю., Захарова Ф. М. Идентификация патогенного варианта с.683_684insCTGCAAGGACAAATCTGACGA гена рецептора липопротеинов низкой плотности у пациента с семейной гиперхолестеринемией. Клинический случай. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2023;22(7):3581. doi:10.15829/1728-8800-2023-3581. EDN KQYPVP

Identification of c.683_684insCTGCAAGGACAAATCTGACGA pathogenic variant of the low-density lipoprotein receptor gene in a patient with familial hypercholesterolemia: a case report

Korneva V. A.¹, Mandelshtam M. Yu.², Orlov A. V.³, Vasiliev V. B.², Kuznetsova T. Yu.¹, Zakharova F. M.²

¹Petrozavodsk State University. Petrozavodsk; ²Institute of Experimental Medicine. Saint Petersburg; ³Institute of Biomedical Problems. Moscow, Russia

Familial hypercholesterolemia (FH) is one of the most common monogenic diseases that leads to the early development of atherosclerosis and is characterized by a poor prognosis. However, only about 1% of FH cases are diagnosed in Russia. The aim of this study was to determine the genetic defect in the FH family and conduct DNA diagnostics in the proband relatives. The study was performed on blood samples obtained with the informed consent of the patients. Polymerase chain reaction and polyacrylamide gel electrophoresis were used. We report c.683_684insCTGCAAGGACAAATCTGACGA pathogenic variant of the low-density lipoprotein receptor (*LDLR*) gene for the first time in Russia and demonstrate its cosegregation in a family with high blood cholesterol. The c.683_684in

sCTGCAAGGACAAATCTGACGA insertion is considered as a probable cause of FH.

Keywords: case report, pathogenic variant, familial hypercholesterolemia, cardiovascular disease.

Relationships and Activities: none.

Korneva V. A. ORCID: 0000-0003-2231-4695, Mandelshtam M. Yu. ORCID: 0000-0002-7135-3239, Orlov A. V. ORCID: 0000-0003-1290-0113, Vasiliev V. B. ORCID: 0000-0002-9707-262X, Kuznetsova T. Yu. ORCID: 0000-0002-6654-1382, Zakharova F. M.* ORCID: 0000-0002-9558-3979.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: fzakharova@mail.ru

[Корнева В. А. — доцент кафедры факультетской терапии, фтизиатрии, инфекционных болезней и эпидемиологии медицинского института, ORCID: 0000-0003-2231-4695, Мандельштам М. Ю. — в.н.с. отдела молекулярной генетики, ORCID: 0000-0002-7135-3239, Орлов А. В. — н.с., ORCID: 0000-0003-1290-0113, Васильев В. Б. — зав. отделом молекулярной генетики, ORCID: 0000-0002-9707-262X, Кузнецова Т. Ю. — зав. кафедрой факультетской терапии, фтизиатрии, инфекционных болезней и эпидемиологии медицинского института, ORCID: 0000-0002-6654-1382, Захарова Ф. М.* — н.с. отдела молекулярной генетики, ORCID: 0000-0002-9558-3979].

*Corresponding author: fzakharova@mail.ru

Received: 26/04-2023

Revision Received: 03/06-2023

Accepted: 23/06-2023

For citation: Korneva V. A., Mandelshtam M. Yu., Orlov A. V., Vasiliev V. B., Kuznetsova T. Yu., Zakharova F. M. Identification of

c.683_684insCTGCAAGGACAAATCTGACGA pathogenic variant of the low-density lipoprotein receptor gene in a patient with familial hypercholesterolemia: a case report. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2023;22(7):3581. doi:10.15829/1728-8800-2023-3581. EDN KQYPVP

ВНП — вариант нуклеотидной последовательности, ДЛП — дислипидотеинемия, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ЛНП — липопротеины низкой плотности, Лп(а) — липопротеин (а), СГХС — семейная гиперхолестеринемия, ХС — холестерин.

Ключевые моменты

- Частота семейной гиперхолестеринемии (СГХС) в общей популяции составляет 1:200-1:500.
- Особой проблемой является диагностика СГХС у детей: выявляется только у 2% пациентов <18 лет, у лиц <40 лет в 40,2% случаев.
- Старт гиполипидемической терапии у лиц молодого возраста с СГХС определяется уровнем холестерина липопротеинов низкой плотности ребенка, возрастом дебюта ишемической болезни сердца у родственников и наличием других факторов сердечно-сосудистого риска (ожирение и уровень Лп(а)).
- Отсутствие своевременной диагностики и терапии СГХС чревато развитием у пациента раннего атеросклероза, сердечно-сосудистой патологии, приводящих к летальному исходу уже в 3-4 декаде жизни.
- Около 40% патогенных вариантов нуклеотидной последовательности, обнаруженных в России в гене рецептора липопротеинов низкой плотности, не описаны в других популяциях.

Key messages

- The frequency of familial hypercholesterolemia (FH) in the general population is 1:200-1:500.
- A particular problem is the diagnosis of FH in children, which is detected only in 2% of patients <18 years old, while in persons <40 years old — in 40,2% of cases.
- The initiation of lipid-lowering therapy in young adults with FH is determined by the child's low-density lipoprotein cholesterol level, the age at onset of coronary artery disease in relatives, and the presence of other cardiovascular risk factors (obesity and Lp(a) levels).
- The lack of timely diagnosis and treatment of FH is fraught with the development of early atherosclerosis, cardiovascular pathology in the patient, leading to death already in the 3rd-4th decade of life.
- About 40% of pathogenic nucleotide sequence variants found in the low-density lipoprotein receptor gene in Russia is not described in other populations.

Введение

Семейная гиперхолестеринемия (СГХС) — наследственное заболевание, вызываемое патогенными вариантами нуклеотидной последовательности (ВНП) генов, влияющих на обмен липопротеинов низкой плотности (ЛНП) и функционирование рецепторов к ним. Патогенные ВНП приводят к повышению уровня холестерина (ХС), транспортируемого ЛНП, к развитию атеросклеротического поражения сосудистого русла и клинической манифестации ишемической болезни сердца (ИБС) в молодом и детском возрасте [1-3].

Наследственные дефекты гена рецептора ЛНП (*LDLR*) приводят к нарушению удаления ХС из кровотока и повышению уровня ХС ЛНП. Однако признаки СГХС не всегда обнаруживаются у молодых пациентов биохимическими методами из-за отсутствия клинических проявлений [4, 5]. Важно также учитывать кумулятивное бремя ХС и обращать внимание не только на повышен-

ный уровень ХС ЛНП, но и на длительность такого повышения [2, 6]. Гомозиготная форма СГХС легко выявляется по высокому уровню ХС ЛНП, но при гетерозиготной форме уровень ХС ЛНП может значительно варьировать. Этим определяется актуальность генетической диагностики СГХС, когда диагноз может быть поставлен еще до развития осложнений. Чаще всего при СГХС генетические дефекты обнаруживаются в последовательности рецептора ЛНП, спектр которых широк и специфичен для каждого этноса. Поэтому необходимо знать национальный спектр патогенных ВНП для диагностики заболевания. В России к 2022г было известно 203 вида патогенных или вероятно патогенных ВНП в гене рецептора ЛНП (*LDLR*) [7].

Выявление наследственного дефекта помогает определить дальнейшую тактику как в отношении самого пациента, так и его ближайших родственников с целью вторичной и ранней первичной профилактики осложнений атеросклероза.

Таблица 1

Показатели биохимического анализа
пробанда и его сестер

	Пациент В., 14 лет (пробанд)	Сестра А., 15 лет	Сестра У., 16 лет
Общий ХС, ммоль/л	8,4	5,4	10,52
ХС ЛНП, ммоль/л	6,89	3,42	8,38
ХС ЛВП, ммоль/л	1,1	1,24	1,44
ТГ, ммоль/л	0,91	0,95	1,55
ХС неЛВП, ммоль/л	7,3	3,85	9,1
Лп(а), г/л	0,03	0,01	0,01
АЛТ, МЕ/л	15	10	13
АСТ, МЕ/л	35	25	34
Глюкоза, ммоль/л	4,3	4,5	4,4

Примечание: АЛТ — аланинаминотрансфераза, АСТ — аспартатаминотрансфераза, ЛВП — липопротеины высокой плотности, ЛНП — липопротеины низкой плотности, Лп(а) — липопротеин (а), ТГ — триглицериды, ХС неЛВП — ХС, не входящий в состав ЛВП, ХС — холестерин.

Клинический случай

Информация о пациенте

Пациент В, 14 лет, обратился в связи с появлением болей в области сердца, и периодически появляющейся болезненности в области коленных суставов, больше справа, преимущественно в вечернее время, скованности нет.

Анамнез жизни: многократно переносил трахеобронхит.

Аллергические реакции на шоколад, клубнику, цитрусовые в виде появления высыпаний на коже, зуда.

Занимается танцами, нагрузки 3-4 раза в нед. по 2-2,5 ч.

Имеет двух сестер, воспитывается некровными родителями, по анамнезу биологических родителей данных нет. Сестры пробанда не имеют стигм, характерных для СГХС (ксантом, ксантеллазм, липоидной дуги роговицы) и признаков ИБС.

Результаты физикального осмотра

При осмотре состояние удовлетворительное, по органам и системам без особенностей. Выявлена липоидная полудуга роговицы. Визуально коленные, голеностопные суставы, мелкие суставы кистей и стоп не изменены.

Диагностическая оценка

При выполнении биохимического анализа крови выявлена выраженная дислипидемия (ДЛП) с преимущественным повышением уровня ХС ЛНП, вторичные причины ДЛП были исключены (патология щитовидной железы, холестаза,

нефротический синдром), показатели липидного спектра пациента представлены в таблице 1. Биохимический анализ крови: общий белок 74,7 г/л, билирубин 14,1 мкмоль/л, аланинаминотрансфераза 13,1 МЕ/л, аспартатаминотрансфераза 30 МЕ/л, креатинфосфокиназа 113 мкмоль/л, глюкоза 5,1 ммоль/л, креатинин 57 мкмоль/л. Выявлено повышение иммуноглобулина Е до 168 МЕ/л (при норме 0-90 МЕ/л), остальные иммуноглобулины в норме. В клиническом анализе крови без патологии.

На электрокардиограмме — синусовая аритмия (частота сердечных сокращений 70-77 уд./мин). Неполная блокада правой ножки пучка Гиса. Укорочение PQ интервала.

По данным эхокардиографии: увеличение полости левого желудочка (конечно-диастолический размер — 47 мм), клапаны не изменены, септальных дефектов нет. Сократительная способность нормальная, фракция выброса — 75%, расчетное давление в правом желудочке 18,6 мм рт.ст. Выявлен врожденный порок сердца — открытый артериальный проток, диаметр 1,5 мм. Ложная хорда левого желудочка.

Ультразвуковое исследование коленных суставов: конфигурация суставов правильная, целостность и структура сухожилия четырехглавой мышцы бедра и собственной связки надколенника не нарушены. Патологии не выявлено.

Рентгенограмма коленных суставов без патологических изменений.

При обследовании сестер 15 и 16 лет — у одной из сестер также выявлена выраженная ДЛП (таблица 1). Уровни липопротеина (а) (Лп(а)) у пробанда и сестер в пределах нормы.

Генетический анализ: прямое секвенирование всех экзонов и промоторной области гена *LDLR* пробанда с клиническими признаками СГХС на платформе Illumina HiSeq 1500 в "Health in Code" (Испания). Для проведения генетического анализа у родственников пробанда были использованы образцы геномной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) его родной и единоутробной сестры. Геномную ДНК из замороженной крови выделяли методом высаливания белков [8] с модификациями. Для детекции инсерции с.683_684insCTGCAA GGACAAATCTGACGA проводили анализ миграции амплификатов экзона 4В гена рецептора ЛНП в 8% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием серебром. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с помощью стандартных праймеров [9].

При выполнении генетического анализа выявлена инсерция с.683_684insCTGCAAGGACAAA TCTGACGA. Данный ВНП был впервые описан в 1992г Hobbs НН; он приводит к дупликации в 4-м экзоне гена рецептора ЛНП в последовательности рецептора аминокислотных остатков с 221 по

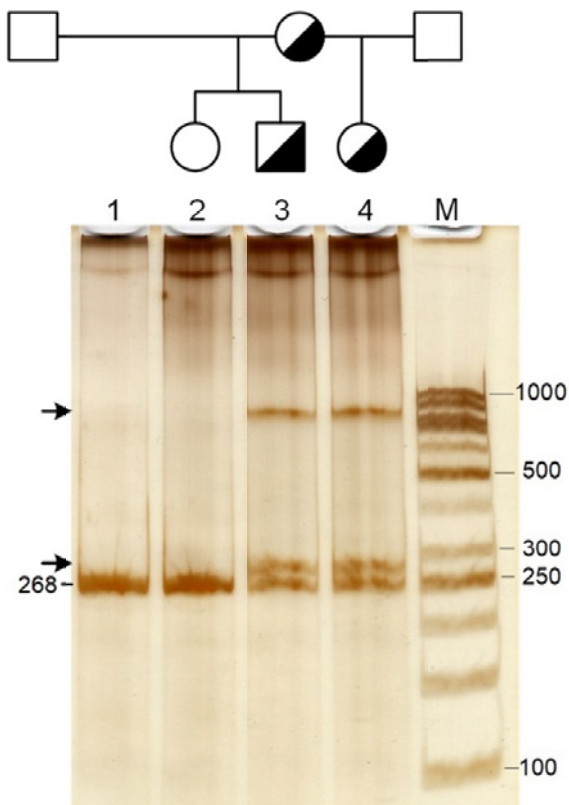


Рис. 1 Анализ наличия патогенного ВНП с.683_684insCTGCAAGG ACAATCTGACGA у родственников пробанда.

Примечание: на дорожках № 1–4 представлены ПЦР-продукты экзона 4В пробанда (дорожка 3), его двух сестер (дорожки 2, 4), пациента без СГХС (дорожка 1) (см. схему родословной в верхней части рисунка). Две дополнительные зоны, присутствующие на дорожках № 3 и № 4 (отмечены стрелками) кроме зоны основного амплификата (268 п.н.), свидетельствуют о наличии в данных образцах инсерции. М — маркер молекулярного веса, цифры справа от рисунка указывают размер фрагментов маркера в парах нуклеотидов.

227 (p.Asp221_Asp227dup) [9]. Кроме США этот ВНП был также обнаружен в Великобритании [10], Японии [11], Испании [12], и Нидерландах [13].

На рисунке 1 представлена родословная пробанда и электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных после амплификации последовательности экзона 4В пробанда, его двух сестер, и пациента без СГХС. В норме размер амплификата должен составлять 268 п.н. — ему соответствует зона гомодуплекса. Зона над ней имеет размер 289 п.н. и представляет собой зону гомодуплексов амплификата с дубликацией (нижняя стрелка). Верхняя стрелка указывает на зону гетеродуплексов, образующихся при спаривании мутантного и нормального аллелей. Клинические данные пробанда и его сестер соответствуют данным генетического анализа.

Клинический диагноз

Таким образом, у пробанда 14 лет диагностирована определенная СГХС согласно критериям

Саймона-Брума (у пациента <16 лет уровень общего ХС >6,7 ммоль/л или ХС ЛНП >4,0 ммоль/л в сочетании с позитивным ДНК-тестом) [14], носителем генетического дефекта исходя из представленных данных, видимо, является мать.

Обсуждение

К настоящему времени в России диагностирован лишь 1% пациентов с СГХС, при этом диагностика заболевания в детском и молодом возрасте, остается на крайне низком уровне [14].

Нами представлен клинический случай определенной СГХС согласно критериям Саймона-Брума. Результаты генетического исследования также подтвердили наличие СГХС у единоутробной сестры пробанда 16-ти лет. В гене рецептора ЛНП (*LDLR*) была обнаружена дупликация с.683_684insCTGCAAGGACAATCTGACGA, которая, как было показано с помощью теста на функциональную активность рецептора ЛНП в культивируемых фибробластах больного СГХС с данной мутацией, является патогенной и приводит к развитию СГХС [9]. Предложен быстрый способ идентификации этого варианта с помощью гелеэлектрофореза ДНК, позволяющего выявлять дополнительные зоны гомодуплексов с мутацией и гетеродуплексов мутантных и нормальных амплификатов экзона 4В. Данный ВНП в России, ранее не обнаруживали [7].

Заключение

В последние годы внимание мирового медицинского сообщества обращено к созданию, ведению и анализу регистров пациентов с СГХС с целью получения данных об особенностях диагностики, клинической картине, гендерных различиях в конкретной стране или регионе. В России также ведется регистр пациентов с СГХС-РЕНЕССАНС (Регистр пациентов с семейной гиперхолестеринемией и пациентов очень высокого сердечно-сосудистого риска с недостаточной эффективностью проводимой гиполипидемической терапии), однако в связи с недостаточной изученностью популяции России на предмет наличия мутаций в гене рецептора ЛНП у больных СГХС, а также ее гетерогенностью, необходимо проводить ее дальнейшее исследование.

Информированное согласие

От родителей пациента получено письменное добровольное информированное согласие на публикацию описания клинического случая (дата подписания 17.05.2022г).

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Representatives of the Global Familial Hypercholesterolemia Community, Wilemon KA, Patel J, Aguilar-Salinas C, et al. Reducing the clinical and public health burden of familial hypercholesterolemia. A global call to action. *JAMA Cardiol.* 2020;5(2):217-29. doi:10.1001/jamacardio.2019.5173.
2. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al. Familial hypercholesterolaemia 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):3478-90. doi:10.1093/eurheartj/ehd273.
3. EAS Familial Hypercholesterolaemia Studies Collaboration (FHSC). Global perspective of familial hypercholesterolaemia: a cross-sectional study from the EAS Familial Hypercholesterolaemia Studies Collaboration (FHSC). *Lancet.* 2021;398(10312):1713-25. doi:10.1016/S0140-6736(21)01122-3.
4. Zakharova FM, Golubkov VI, Lipovetsky BM, et al. Diagnostics of familial hypercholesterolemia in children from families with compromised inheritance. *Voprosy sovremennoj pediatrii (Current Pediatrics).* 2005;4(1):15-8. (In Russ.) Захарова Ф.М., Голубков В.И., Липовецкий Б.М. и др. Диагностика семейной гиперхолестеринемии у детей в семьях с отягощенной наследственностью. *Вопросы современной педиатрии* 2005;4(1):15-8.
5. Sadykova DI, Galimova LF. Familial hypercholesterolemia in children: clinical manifestations, diagnosis, treatment. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii (Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics).* 2017;62(5):119-23. (In Russ.) Садыкова Д.И., Галимова Л.Ф. Семейная гиперхолестеринемия у детей: клинические проявления, диагностика, лечение. *Российский вестник перинатологии и педиатрии.* 2017;62(5):119-23. doi:10.21508/1027-4065-2017-62-5-119-123.
6. Korneva V, Kuznetsova T, Julius U. The role of cumulative LDL cholesterol in cardiovascular disease development in patients with familial hypercholesterolemia. *J Pers Med.* 2022;12(1):71. doi:10.3390/jpm12010071.
7. Vasilyev VB, Zakharova FM, Bogoslovskaya TY, Mandelshtam MYu. Analysis of the low density lipoprotein receptor gene (*LDLR*) mutation spectrum in Russian familial hypercholesterolemia. *Vavilov Journal of Genetics and Selection* 2022;26(3):319-26. (In Russ.) Васильев В.Б., Захарова Ф.М., Богословская Т.Ю., Мандельштам М.Ю. Анализ спектра мутаций гена рецептора липопротеинов низкой плотности (*LDLR*) в России. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 2022;26(3):319-26. doi:10.18699/VJGB-22-38.
8. Suguna S, Nandal DH, Kamble S, et al. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non enzymatic salting out method. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014;6(6):198-9.
9. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1992;1(6):445-66. doi:10.1002/humu.1380010602.
10. Webb JC, Sun XM, McCarthy SN, et al. Characterization of mutations in the low density lipoprotein (LDL)-receptor gene in patients with homozygous familial hypercholesterolemia, and frequency of these mutations in FH patients in the United Kingdom. *J Lipid Res.* 1996;37(2):368-81.
11. Hattori H, Nagano M, Iwata F, et al. Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in Japanese familial hypercholesterolemia. Mutation in brief no. 248. Online. *Hum Mutat* 1999;14(1):87. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1999)14:1<87:AID-HUMU14>3.0.CO;2-N.
12. Mozas P, Castillo S, Tejedor D, et al. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in *LDLR*. *Hum Mutat.* 2004;24(2):187. doi:10.1002/humu.9264.
13. Fouchier SW, Kastelein JJ, Defesche JC. Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. *Hum Mutat.* 2005;26(6):550-6. doi:10.1002/humu.20256.
14. Russian guidelines on familial hypercholesterolemia diagnosis and treatment. The working group Ezhov MV, Sergienko IV, Rozhkova TA, et al. *Eurasian Heart J.* 2017;(2):6-12. (In Russ.) Российские рекомендации по диагностике и лечению семейной гиперхолестеринемии. Рабочая группа по подготовке текста рекомендаций. Ежов М.В., Сергиенко И.В., Рожкова Т.А. и др. *Евразийский кардиологический журнал.* 2017;(2):6-12.