

На правах рукописи

КОМАРОВА

Татьяна Юрьевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПРИРОДЫ СЕМЕЙНОЙ
ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ СРЕДИ ЖИТЕЛЕЙ ПЕТРОЗАВОДСКА И
САНКТ-ПЕТЕРБУРГА**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Мандельштам Михаил Юрьевич

Официальные оппоненты:

Денисенко Александр Дорوفеевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук, руководитель отдела биохимии.

Сироткина Ольга Васильевна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова», ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека.

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «___» _____ 2013 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.022.03 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук (197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12) по адресу: 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12.

Автореферат разослан «___» _____ 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

доктор биологических наук

Хныченко Людмила Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Семейная гиперхолестеринемия (СГ) – наследственная патология, приводящая к раннему развитию и тяжелому течению сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Сегодня ССЗ являются основной причиной смертности населения в большинстве развитых стран мира. В России показатели смертности от ССЗ среди людей трудоспособного возраста являются самыми высокими в Европе (Шальнова и др., 2012). В Северо-Западном Федеральном округе смертность мужчин трудоспособного возраста от ССЗ одна из самых высоких по стране и по последним опубликованным данным составляет 47% от общей смертности мужчин (Шальнова и др., 2012).

Дополнительными факторами риска ССЗ при гиперхолестеринемии являются: артериальная гипертония, ожирение, нарушение углеводного и липидного обмена, а также курение, чрезмерное употребление алкоголя и низкая физическая активность (Ford, Capewell, 2011). Некоторые из них можно скорректировать, изменив образ жизни, но не генетическую предрасположенность. Наиболее частой наследственной причиной ишемической болезни сердца является СГ, обуславливающая, по некоторым данным, 5 - 7% всех случаев инфаркта миокарда у пациентов моложе 60 лет (Кухарчук и др., 2009; Koivisto et al., 1993).

СГ – это аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся повышенным уровнем общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности в крови. У пациентов с СГ развивается ранний атеросклероз и его основные осложнения в виде ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда или мозговых инсультов. Чаще всего причиной СГ является снижение скорости катаболизма ЛНП вследствие количественной недостаточности или дисфункции их рецептора (OMIM *606945), вызванных мутациями в одноименном гене.

Значительная доля случаев аутосомно-доминантной гиперхолестеринемии может быть обусловлена мутациями в гене *APOB*, приводящими к развитию другого наследственного заболевания – семейного дефекта аполипопротеина В-100 (FDB) (Мандельштам, Васильев, 2008). Клинически отличить эти два заболевания достаточно трудно, несмотря на то, что общее течение FDB более мягкое. Частота СГ в большинстве популяций составляет 1:500, а частота FDB в некоторых популяциях Средней Европы – 1:500 - 1:700 (Мандельштам, Васильев, 2008). На сегодняшний день в мире описано более 1000 мутаций гена рецептора ЛНП (Dedoussis et al., 2004), причем спектр мутаций сильно отличается в различных популяциях и этнических группах. В гене *APOB* у людей белой расы удалось идентифицировать лишь одну широко распространенную мутацию R3500Q (CGG>CAG, g.10708 G>A).

Эффективная терапия при этих заболеваниях существует и позволяет значительно снизить риск развития атеросклероза и его тяжелых последствий. Но эффективность лечения во многом зависит от того, насколько рано оно было начато, а все основные клинические проявления СГ и FDB развиваются с возрастом (Кухарчук и др., 2009). У детей они могут отсутствовать, и даже уровень общего холестерина может быть в пределах нормы. Ранняя диагностика возможна только с помощью анализа ДНК, который позволяет определить носителей мутаций в генах рецептора ЛНП и *АРОВ* и провести консультирование среди родственников пациентов.

Степень разработанности темы. Важным фактором, который влияет на эффективность ДНК-диагностики любого заболевания, является наличие информации о типах мутаций, которые встречаются в изучаемой популяции (Мандельштам и др., 2004). Несмотря на то, что за рубежом накоплена огромная информация о мутациях в гене рецептора ЛНП (Dedoussis et al., 2004), в нашей стране такие исследования проведены в недостаточном объеме. Многие найденные в России мутации гена рецептора ЛНП являются новыми и за рубежом не обнаружены (Захарова и др., 2007; Мешков и др., 2004; Воевода и др., 2008), а исследования молекулярной природы СГ проводили только в крупных городах – Санкт-Петербурге, Москве и Новосибирске и не проводили в республиках с этнически своеобразным составом населения. Эти данные свидетельствуют в пользу генетических особенностей российского населения и необходимости изучения генетической структуры СГ в разных регионах России.

Цель исследования. Сравнительное изучение спектра и частоты встречаемости мутаций генов, обуславливающих развитие наследственной гиперхолестеринемии, в двух крупных городах Северо-Запада России: Санкт-Петербурге и Петрозаводске.

Задачи работы:

1. С помощью автоматизированного флуоресцентного анализа конформационного полиморфизма однонитевых фрагментов ДНК и прямого секвенирования отдельных экзонов идентифицировать мутации в группе из 110 пациентов с клиническим диагнозом СГ из числа жителей Петрозаводска.
2. Оценить диагностическую значимость обнаруженных мутаций и полиморфизмов в гене рецептора ЛНП.
3. Определить частоту встречаемости мутации R3500Q в гене аполипопротеина В-100 у пациентов с СГ из Петрозаводска.
4. Провести сравнение спектра и частоты встречаемости мутаций гена рецептора ЛНП среди пациентов с диагнозом СГ в Санкт-Петербурге и в Петрозаводске.

5. Разработать быстрые методы выявления мутаций с помощью рестрикционного анализа для скрининга мутаций в расширенных выборках пациентов с СГ из Санкт-Петербурга, Ленинградской области и из Карелии, а также у родственников пробандов.

Научная новизна полученных результатов. Впервые в России было проведено исследование молекулярной природы наследственной гиперхолестеринемии среди жителей Петрозаводска. В результате исследования в изученной группе из 110 пациентов было обнаружено 12 мутаций и 6 полиморфизмов в гене рецептора ЛНП. Семь мутаций охарактеризованы впервые в мире. Показано, что мутация R3500Q в гене *APOB* не характерна для населения Петрозаводска. Разнообразие мутаций и уникальность их спектра указывает на отсутствие выраженного эффекта основателя при СГ у жителей Петрозаводска.

Научно-практическая и теоретическая значимость работы. Теоретический интерес представляет своеобразие спектра мутаций гена рецептора ЛНП, охарактеризованного впервые для жителей Петрозаводска, а также наличие лишь одной общей мутации гена среди пациентов с СГ Петрозаводска, Санкт-Петербурга и Финляндии. Среди описанных мутаций и полиморфизмов ДНК пять приводят к сдвигу рамки считывания, шесть – к аминокислотным заменам, один – к нарушению сайта сплайсинга и шесть были признаны нейтральными заменами. Описана частота встречаемости вариантов полиморфных маркеров среди жителей Петрозаводска и проведено сравнение полученных результатов с данными по Санкт-Петербургу.

Практическая значимость работы заключается в разработке быстрых методов выявления генетических вариантов с помощью специфических эндонуклеаз рестрикции и гетеродуплексного анализа, которые могут быть применены при диагностике заболевания среди родственников пациентов. Своевременное выявление мутаций позволяет начать лечение на ранних стадиях заболевания и избежать атеросклероза и его осложнений.

Методология и методы исследования. Работа опирается на современную методологию анализа генома человека в норме и при патологии и использует такие общепринятые методы исследования ДНК как полимеразная цепная реакция, конформационно-чувствительный гель электрофорез, клонирование и секвенирование ДНК, рестрикционный анализ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Спектр мутаций гена рецептора ЛНП у пациентов с СГ из Петрозаводска отличается от спектра мутаций этого гена в Санкт-Петербурге и других регионах России.

2. У пациентов с СГ из Петрозаводска мутация FsE287:V348X (FH-North Karelia), характерная для восточной Финляндии, встречается редко, а мутация FH-Helsinki, типичная для южной и центральной Финляндии у обследованных пациентов не встречается вовсе.
3. Частоты встречаемости вариантов полиморфных маркеров, характерных как для жителей Санкт-Петербурга, так и для жителей Петрозаводска, существенно отличаются в этих двух городах.
4. Спектр мутаций гена рецептора ЛНП при СГ в Петрозаводске, как и в Санкт-Петербурге, достаточно широкий, мажорные мутации отсутствуют, а эффект основателя в отношении СГ на Северо-Западе России выражен слабо.
5. Мутация R3500Q в гене *APOB* не обнаружена у жителей Петрозаводска.
6. Предпочтительным способом ДНК-диагностики пациентов с СГ на Северо-Западе России является не скрининг экзонов с помощью метода анализа конформационного полиморфизма ДНК, а прямое секвенирование всех кодирующих участков гена рецептора ЛНП и его экзон-интронных границ.

Достоверность и надежность результатов. Основные выводы работы и выносимые на защиту положения являются обоснованными. Это определяется точностью и специфичностью методов секвенирования ДНК и рестрикционного анализа. Результаты, полученные с использованием различных методов генетического анализа (гетеродуплексный анализ, ПДРФ-анализ, SSCP-анализ и секвенирование), согласуются между собой. Количественные данные отражающие различия в частоте встречаемости вариантов полиморфных маркеров у жителей Петрозаводска и Санкт-Петербурга обработаны статистически с общепринятым уровнем достоверности 5%.

Личный вклад автора. Личный вклад автора в выполненную работу включал получение большинства экспериментальных результатов, обработку и анализ полученных данных, а также участие в написании статей.

Апробация работы. Основные материалы диссертации были доложены и обсуждены на 13 международных, всероссийских и региональных конференциях и опубликованы в тезисах материалов 13 конференций. Наиболее важные из них: VI Съезд Российского общества медицинских генетиков (14 – 18 мая 2010 г., Ростов-на-Дону); Российский Конгресс с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное», посвященный памяти профессора Евгения Иосифовича Шварца (июнь 2010 г., июнь 2012 г., Санкт-Петербург); Российский национальный конгресс кардиологов - 2010 (5 - 7 октября 2010 г., Москва); VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным

участием «Молекулярная диагностика - 2010» (24 - 26 ноября 2010 г., Москва); The 4th International IMBG Conference for Young Scientists “Molecular Biology: advances and perspectives” (14 - 17 сентября 2011 г., Киев, Украина); European Human Genetics Conference 2011 (28 -31 мая 2011 г., Амстердам, Нидерланды); V Всероссийская конференция с международным участием «Пренатальная диагностика и генетический паспорт – основа профилактической медицины в век нанотехнологий»; Московский международный форум кардиологов (14 - 15 июня 2012 г., Москва); Первый международный образовательный форум «Российские дни сердца» (4 – 6 апреля 2013 г., Москва.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в российских научных журналах, рекомендуемых ВАК. Исследование проводилось при поддержке грантов РФФИ № 10-04-00563 и № 13-04-00902, а также грантов администрации Санкт-Петербурга для студентов и аспирантов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 138 страницах машинописного текста, содержит из 17 таблиц и 49 рисунков. Диссертация состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Заключение». Список цитируемой литературы включает 166 источников, из них 13 на русском языке и 153 - на иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении к работе обоснована актуальность изучаемой темы, степень ее разработанности, сформулированы цели и задачи работы, отражена научная новизна полученных результатов, а также их практическая и теоретическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы. В данной главе работы на основании литературных данных рассмотрены основные виды моногенных гиперхолестеринемий, обусловленных мутациями в генах *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *ARH*, а также их встречаемость в разных популяциях. В главе подробно описано строение рецептора ЛНП, его клеточный цикл, ген, кодирующий рецептор ЛНП, виды мутаций в этом гене и спектры мутаций в разных популяциях в мире. Также в обзоре литературы приведены принятые в России рекомендации по диагностике и лечению СГ.

Материалы и методы. В данной главе подробно описаны критерии отбора пациентов для исследования, все молекулярно-генетические методы, использованные в работе, а также критерии анализа полученных данных и методы их статистической обработки.

В данной работе использовались образцы периферической венозной крови пациентов с клиническими признаками СГ (94 человека) и родственников некоторых из них (16 человек), проживающих на территории Петрозаводска. В работе для обозначения этой группы пациентов используется термин пациенты с СГ или больные СГ. Отбор пациентов и забор крови был осуществлен к.м.н. В. А. Корневой (Кафедра факультетской терапии, инфекционных болезней и эпидемиологии, Петрозаводский государственный университет). Пациенты вовлекались в исследование лишь после получения информированного согласия на его проведение.

Всем обследованным пациентам проводился анализ показателей липидного спектра, глюкозы и ЭКГ. Клинический диагноз СГ ставился на основании следующих критериев: уровень общего холестерина более 8 мм/л (в исследование включали пациентов с гиперлипидемией типа IIa и IIb), наличие сухожильных ксантом у обследуемого или родственников первой степени родства и отсутствие заболеваний, приводящих к развитию вторичной гиперлипидотеинемии, таких как сахарный диабет, гипотиреоз, нефротический синдром (Корнева и др., 2013). После обнаружения мутаций у пробандов исследование на наличие генетических дефектов предлагалось пройти и их родственникам.

Для поиска мутаций были использованы стандартные методы анализа ДНК. Выделение ДНК проводилось из замороженной крови по методу Кюнкеля (Kunkel et al, 1977) в модификации Белла (Bell et al., 1981) для небольших количеств крови. Для амплификации отдельных экзонов гена рецептора ЛНП использовали олигонуклеотидные праймеры, синтезированные по опубликованным последовательностям (Hobbs et al., 1992). Для детекции мутации R3500Q (с. 10658 G>A; CGG>CAG) в гене *APOB* был использован метод искусственного создания рестрикционного сайта для эндонуклеазы *Msp I* в процессе ПЦР в случае нормального, но не мутантного аллеля (Hansen et al., 1991). Для детекции мутации FH-Helsinki использовали мультиплексную ПЦР по схеме, предложенной финскими исследователями (Kontula et al., 1992).

SSCP-анализ проводили на автоматическом секвенаторе ALFexpress II (Amersham Biosciences, Великобритания) с использованием флуоресцентных Cy5 – меченных праймеров («Синтол», Москва). Обработку и последующий анализ полученных пиков осуществляли с использованием прилагаемого программного обеспечения ALFwin Fragment Analyzer.

Идентификацию мутаций осуществляли с помощью секвенирования ДНК по методу Сэнгера, осуществленного в компании «Евроген» (Москва). Образцы с делециями клонировали перед секвенированием в плазмиде pBlueScript II.

Анализ полученных после секвенирования последовательностей проводился с использованием компьютерной программы ApE-A plasmid editor v.2.0.39 by M. Wayne Davis. Мутации в гене рецептора ЛНП считали новыми, если они отсутствовали в базах данных (URL: <http://www.ucl.ac.uk/ldlr>, URL: <http://www.umd.be/LDLR>). Для предсказания эффекта новых миссенс-мутаций в последовательности гена рецептора ЛНП на его функцию использовали программу SiftBlink (URL: http://sift.jcvi.org/www/SIFT_BLink_submit.html). Все обнаруженные варианты последовательности, приводящие к изменению рестрикционной карты, подтверждали рестрикционным анализом. В работе были использованы ферменты, поставляемые фирмой «СибЭнизм» (Новосибирск).

Результаты. В результате проведенного исследования было идентифицировано 12 различных мутаций гена рецептора ЛНП у пациентов с СГ из Петрозаводска. Все мутации встречались в гетерозиготном состоянии. Результаты поиска мутаций в гене рецептора ЛНП, а также методы их быстрого тестирования представлены в таблицах 1 и 2. Также у обследованных пациентов было выявлено 6 полиморфных маркеров гена рецептора ЛНП, была оценена частота встречаемости вариантов полиморфных маркеров для жителей Петрозаводска и проведено сравнение полученных данных с имеющимися данными по пациентам с СГ и по контрольной группе из Санкт-Петербурга. Все результаты исследования по полиморфизмам, частоты их встречаемости, а также ферменты для их быстрого тестирования представлены в таблицах 3 и 4. Все полученные данные в работе подтверждены соответствующими иллюстрациями (результаты SSCP-анализа, секвенирования, и ПДРФ-анализа), примеры которых представлены на рисунках 1 - 3. Мутация R3500Q в гене аполипопротеина В-100 и мутация FH-Helsinki в гене рецептора ЛНП не были выявлены ни у одного из обследованных пациентов.

Обсуждение результатов. В результате проведенного исследования у пациентов с СГ из Петрозаводска было обнаружено 12 мутаций и 6 полиморфизмов в гене рецептора ЛНП. Причем семь мутаций (с.195-196insT, с.192del10/ins8, с.618 T>G, с.1340 C>G, с.1686del8/insT, с.1936 C>A, с.2191delG) были охарактеризованы впервые в мире, а другие пять (с.58 G>A, с.925-931del7, с.1194 C>T, с.1532 T>C, с.1920 C>T) описывались ранее в других странах.

Изначально предполагалось, что у жителей Петрозаводска будет выявлено большое количество мутаций, описанных ранее в Санкт-Петербурге, а также, из-за близости финской границы, ожидалось обнаружить мутации FH-Helsinki и FH-North Karelia, специфические для населения восточной Финляндии. Однако единственной общей мутацией, как с Санкт-Петербургом (Zakharova et al., 2005), так и с

Таблица 1 – Мутации в гене рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с диагнозом СГ из Петрозаводска

Экзон гена	Название мутации по кДНК	Название мутации по белку по старой номенклатуре	Название мутации по белку по новой номенклатуре	Число семей (число пациентов)
Экзон 1	c.58 G>A	G(-2)R	G20R	1(1)
Экзон 3	c.195-196 insT	FsV45:D108X	FsV66:D129X	1(1)
	c.192 del10/ins8	Fs S44:D108X	Fs S65:D129X	1(2)
Экзон 4	c.618T>G	S185R	S206R	1(1)
Экзон 6	c.925-931del7	FsE287:V348X	FsE308:V369X	1(2)
Экзон 9	c.1340 C>G	S426C	S447C	1(2)
	c.1194 C>T	I377I	I398I	4(4)
Экзон 10	c.1532 T>C	L490S	L511S	1(1)
Экзон 11	c.1686del8/insT	FsW541:L547X	FsW562:L568X	1(2)
Экзон 13	c.1936 C>A	L625I	L646I	2(2)
	c.1920 C>T	N619N	N640N	1(2)
Экзон 15	c.2191delG	FsV710:V715X	FsV731:V736X	1(2)

Финляндией (Koivisto et al., 1192), оказалась мутация FH-North Karelia, выявленная лишь в одной семье (у двух человек) из Петрозаводска. Делеция FH-North Karelia (c.925-931del7, Fs E308:V369X [Fs E287:V348X]), нарушает рамку считывания при трансляции и приводит к синтезу укороченного и нефункционального рецептора ЛНП. У обоих пациентов с данной мутацией наблюдались сильно повышенные уровни ХС, что согласуется с накопленными богатыми эпидемиологическими данными в пользу вовлеченности этой мутации в развитие атеросклероза. Примечательно, что среди больных СГ из числа жителей Петрозаводска мы не нашли носителей мутаций G218del, C160G и c.313+1G>A, которые повторно встречались у больных СГ – жителей Санкт-Петербурга (Захарова и др., 2007; Zakharova et al, 2005).

Мутация c.58 G>A (G20R [G(-2)R]) в данной работе была выявлена у одной пациентки из Петрозаводска. Данная мутация выявлялась ранее у пациентов из Франции (Amsellem et al., 2002), Новой Зеландии (Laurie et al., 2004), Нидерландов (Fouchier et al., 2005), Турции (Sözen et al., 2005) и Австрии (Widhalm et al., 2007) и описывалась как значимая для развития заболевания. Причем аминокислотный остаток глицина в сигнальной последовательности белка сохраняется у многих видов животных, таких как шимпанзе, мыши, крысы, кролики и хомячки. Однако в

Таблица 2 – Быстрые методы тестирования мутаций, выявленных у пациентов с СГ из Петрозаводска

Экзон гена	Название мутации по кДНК	Быстрый метод тестирования	Использованный изошизомер	ПДРФ варианты	
				Аллель	Размеры фрагментов
Экзон 1	с.58 G>A	Утрата сайта для <i>Fau I</i>	<i>Fau I</i>	G	59+132+44 п.н.
				A	59+176 п.н.
Экзон 3	с.195-196 insT	Нет	-	-	-
	с.192 del10/ins8	Утрата сайта для <i>Hph I</i>	<i>AsuHP I</i>	Нормальный	160+36 п.н.
		Мутантный	-	196 п.н.	-
Гетеродуплексный анализ	-	-	-	-	
Экзон 4	с.618T>G	Новый сайт для <i>Sau I</i>	<i>Bse21 I</i>	T	268 п.н.
				G	130+138 п.н.
Экзон 6	с.925-931del7	Утрата сайта для <i>Bcc I</i>	<i>Bcc I</i>	Нормальный	142+31 п.н.
		Мутантный	-	173 п.н.	-
		Гетеродуплексный анализ	-	-	-
Экзон 9	с.1340 C>G	Утрата сайта для <i>Fin I</i>	<i>BslF I</i>	C	192+81 п.н.
				G	273 п.н.
	с.1194 C>T	Новый сайт для <i>BsrD I</i>	<i>Bse3D I</i>	C	273 п.н.
				T	210+63 п.н.
Экзон 10	с.1532 T>C	Утрата сайта для <i>Acl I</i>	<i>Acl I</i>	T	80+83 п.н.
				C	163 п.н.
Экзон 11	del1686del8/insT	Утрата сайта для <i>Hae III</i>	<i>Hae III</i>	Нормальный	76+49+44 п.н.
		Мутантный	-	76+86 п.н.	-
		Гетеродуплексный анализ	-	-	-
Экзон 13	с.1936 C>A	Нет	-	-	-
	с.1920 C>T	Новый сайт для <i>Tsp509 I</i>	<i>Sse9 I</i>	C	218 п.н.
				T	101+117 п.н.
Экзон 15	с.2191delG	Нет	-	-	-

Таблица 3 – Полиморфизмы, выявленные в группе из 110 пациентов из Петрозаводска

Экзон гена	Название полиморфизма по кДНК	Название полиморфизма по белку по старой номенклатуре	Название полиморфизм по белку по новой номенклатуре	Аллель	Число аллелей/ общее число хромосом
Экзон 8	с.1171 G>A	A370T	A391T	G	207/220
				A	13/220
Экзон 10	с.1413 G>A	R450R	R471R	G	145/220
				A	75/220
Экзон 11	с.1617 C>T	P518P	P539P	C	208/220
				T	12/220
Экзон 12	с.1773 C>T	N570N	N591N	C	187/220
				T	33/220
Экзон 13	с.1959 C>T	V632V	V653V	C	111/220
				T	109/220
Экзон 15	с.2232 G>A	R723R	R744R	G	174/220
				A	46/220

Таблица 4 – Методы быстрого тестирования полиморфизмов, выявленных у пациентов с СГ из Петрозаводска, с помощью ПДРФ-анализа

Экзон гена	Название полиморфизма по кДНК	Фермент быстрого тестирования	Использованный изошизомер	Аллель	ПДРФ варианты
Экзон 8	с.1171 G>A	Утрата сайта для <i>Stu I</i>	<i>Stu I</i>	G	136+40 п.н.
				A	176 п.н.
Экзон 10	с.1413 G>A	Утрата сайта для <i>Fin I</i>	<i>BslFI</i>	G	113+89 п.н.
				A	202 п.н.
Экзон 11	с.1617 C>T	Утрата сайта для <i>Aci I</i>	<i>BspAC I</i>	C	115+54 п.н.
				T	169 п.н.
Экзон 12	с.1773 T>C	Новый сайт для <i>Hind II</i>	<i>Hind II</i>	T	64+146 п.н.
				C	64+36+110 п.н.
Экзон 13	с.1959 C>T	Утрата сайта для <i>Sau96 I</i>	<i>AspS9 I</i>	C	136+82 п.н.
				T	218 п.н.
Экзон 15	с.2232 G>A	Утрата сайта для <i>Msp I</i>	<i>Msp I</i>	G	140+21+86 п.н.
				A	161+86 п.н.

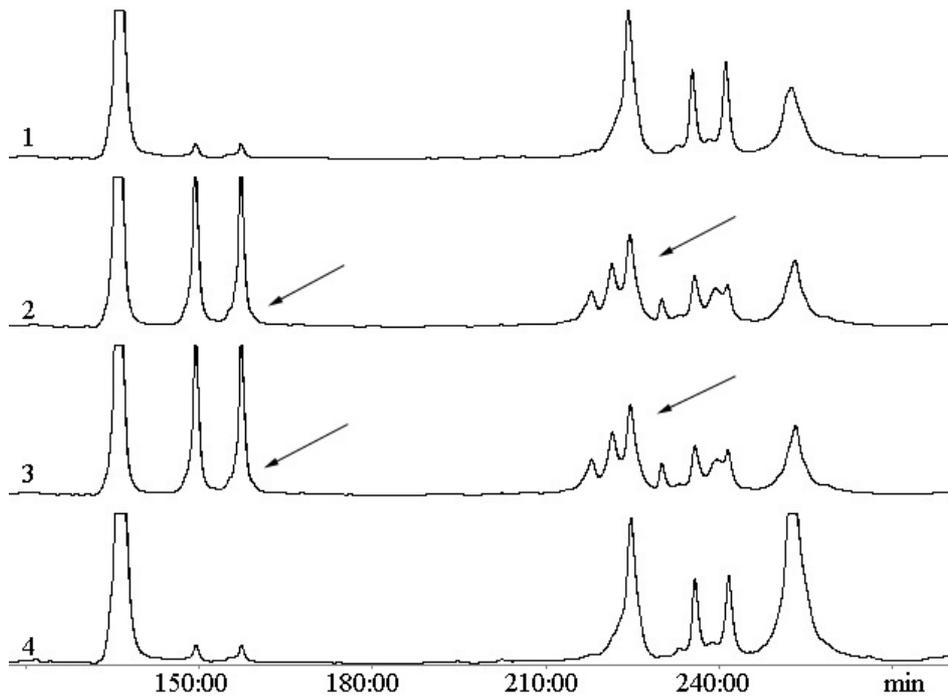


Рисунок 1 – Выявление образцов с мутацией с.192del10/ins8 (Fs S65:D129X [Fs S44:D108X]) в экзоне 3 гена рецептора ЛНП методом SSCP-анализа
Стрелками на дорожках 2 и 3 показаны гетеродуплексы и дополнительные одонитевые конформеры в образцах с мутацией с.192del10/ins8. SSCP-анализ проводился в 10% полиакриамидном геле при температуре 10°C.

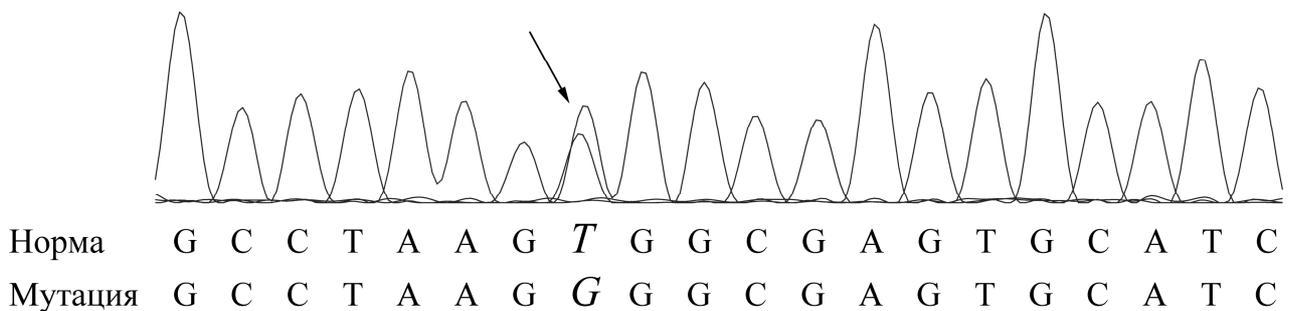


Рисунок 2 – Идентификация мутации с.618 T>G (S206R [S185R]) методом секвенирования
Показан результат секвенирования смысловой нити экзона 4 образца ДНК пациента – гетерозиготы по мутации. Под рисунком выписаны нормальная и мутантная последовательности гена рецептора ЛНП, место их несовпадения при наложении на хроматограмме указано стрелкой.

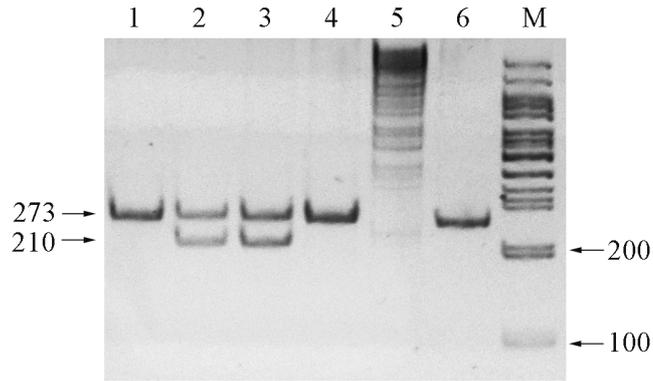


Рисунок 3 – Идентификация мутации с.1194 С>Т (I398I, [I377I]) методом ПДРФ-анализа с использованием эндонуклеазы рестрикции *Bse3D I*

В норме сайт узнавания для *Bse3D I* отсутствует, а при мутации продукты амплификации размером 273 п.н. расщепляются на два фрагмента: 210 и 63 п.н. Дорожки: 1 и 4 – образцы без мутации, 2 и 3 – образцы с мутацией с.1194 С>Т, 5 – результат ферментативного гидролиза ДНК фага λ эндонуклеазой рестрикции *Bse3D I*, 6 – образец амплифицированной ДНК, не обработанный рестриктазой, М – маркер молекулярного веса с шагом 100 п.н. Слева и справа подписаны размеры фрагментов, представленных на электрофореграмме. Электрофорез проводили в 8% ПААГ, окрашивание бромистым этидием.

последних публикациях (Pećin et al., 2013) эта нуклеотидная замена рассматривается как полиморфизм. У нашей пациентки, помимо мутации с.58 G>A, была выявлена мутация FH-North Karelia, связь которой с заболеванием установлена давно. Отец пациентки является носителем мутации FH-North Karelia, но не мутации с.58 G>A, а биохимические показатели атеросклероза у отца выражены значительно сильнее, чем у дочери. Вероятно, мутация с.58 G>A была унаследована от матери, которая по имеющимся у нас данным от гиперхолестеринемии не страдает. Однако ДНК матери для исследования не была доступна. Скорее всего, мутация с.58 G>A является нейтральным, непатогенным генетическим вариантом.

Нуклеотидная замена с.1194 С>Т (I398I [I377I]) не приводит к изменению аминокислотной последовательности белка и является молчащей мутацией. Причем у жителей Петрозаводска она была охарактеризована у четырех неродственных пациентов, таким образом, встречалась чаще, чем остальные мутации. Ранее эта мутация описывалась также в популяции Австрии (Widhalm et al., 2007).

Мутация с.1532 Т>С (L511S [L490S]) ранее была охарактеризована в Италии и получила название FH-Rome-4 (Cantafora et al., 2006). Данный дефект приводит к замене аминокислотного остатка лейцина на остаток пролина и по данным SiftBlink

является патогенным. Мутация локализована в экзоне 10 гена рецептора ЛНП и нарушает аминокислотную последовательность структуры бета-пропеллера домена, гомологичного предшественнику эпидермального фактора роста. Таким образом, мутация может способствовать нарушению связывания рецептора с лигандом. Данная нуклеотидная замена была выявлена у 56-летней пациентки с сильно повышенными липидами плазмы крови, что также свидетельствует в пользу значимости данной мутации. Однако, для однозначного подтверждения этого предположения необходимо исследование влияния данной мутации на функциональную активность белка.

Мутация с.1920 C>T (N640N [N619N]), выявленная у брата с сестрой из Петрозаводска, является молчащей заменой. Данная мутация была описана в Испании (Mozas et al., 2004) и Австрии (Widhalm et al., 2007). Интересно, что соответствующая аминокислотная последовательность белка консервативна и у разных видов животных: шимпанзе, макак резус, собак, мышей, крыс и хомячков.

Среди семи новых мутаций, выявленных в гене рецептора ЛНП у жителей Петрозаводска, четыре мутации (с.195-196insT, с.192del10/ins8, с.1686del8/insT, с.2191delG) приводят к изменению кодирующей последовательности рецептора ЛНП на число нуклеотидов, не кратное трем. Таким образом, происходит сдвиг рамки считывания при трансляции. Как предсказывает анализ нуклеотидной последовательности рецептора ЛНП, при каждой из этих мутаций происходит преждевременная терминация трансляции и образование рецептора без трансмембранного и цитоплазматического доменов, то есть белка, неспособного связать и интернализировать лиганд – апоВ и апоЕ содержащие липопротеины. У всех пациентов – носителей мутаций сдвига рамки считывания были зафиксированы высокие показатели ХС и ХС ЛНП. Можно утверждать, что именно эти мутации явились причиной развития СГ у пациентов. Все мутации были выявлены в разных семьях. Однако три из перечисленных мутаций (с.192del10/ins8, с.1686del8/insT, с.2191delG) встречались каждая в своей семье повторно. Мутация с.195-196insT была выявлена у одного пациента, родственники которого в исследовании не участвовали.

Однонуклеотидная замена с.618T>G, приводящая к замене кодона для серина на кодон для аргинина в 3'части экзона 4 (S206R [S185R]), была описана у одного пациента с тяжелыми проявлениями СГ. Любые замены в этом чрезвычайно консервативном участке, кодирующем лиганд-связывающий домен рецептора, как правило, приводят к развитию тяжелой гиперхолестеринемии. В норме лигандсвязывающие повторы цистеин-богатого домена рецептора ЛНП несут кластеры отрицательно заряженных аминокислот, необходимых для координации ионов кальция и удержания лиганда. Можно предположить, что замена серина,

аминокислоты с небольшим полярным радикалом, на аргинин с объемной положительно заряженной боковой цепью в этой области рецептора ЛНП будет вызывать мисфолдинг и дисфункцию рецептора.

Мутации с.1340C>G (S447C [S426C]) и с.1936 C>G (L646I [L625I]), также описанные впервые в мире, по данным SiftBlink не являются значимыми. Скорее всего, это справедливо относительно мутации с.1936 C>G (L646I [L625I]), приводящей к замене аминокислотного остатка лейцина на остаток изолейцина, в связи со сходством этих остатков. Однако мутация с.1340C>G (S447C [S426C]) приводит к образованию нового остатка цистеина, способного образовывать дополнительные дисульфидные связи в домене, гомологичном предшественнику эпидермального фактора роста, и таким способом влиять на функциональность белка.

Полиморфный сайт с.1171G>A (A391T [A370T]), выявленный в у пациентов из Петрозаводска, также известен как *Stu I* ПДРФ (Захарова и др., 2007; Vieira et al., 2006). Вариант А данного полиморфного маркера был найден в разных городах в России (Захарова и др., 2007) и во многих странах мира (Южная Африка (Kotze et al., 1989), Канада (Wang et al., 2001), Марокко (Messal et al., 2003), Дания (Brusgaard et al., 2006)). Несмотря на замену аминокислотного остатка при данном полиморфизме, в разных исследованиях было показано, что он не оказывает влияния на уровень липопротеинов крови (Vieira et al., 2006).

Все остальные полиморфизмы, встречающиеся у жителей Петрозаводска, не приводят к замене аминокислотного остатка в белке. Так полиморфизм с.1413 G>A (R471R [R450R]), являющийся довольно частым вариантом для жителей Петрозаводска, был ранее охарактеризован как *BsmA I* ПДРФ и встречался в разных странах, в том числе Южной Африке (Warnich et al., 1992), Норвегии (Leren et al., 1993) и России. Другая молчащая замена с.1959 C>T (V653V [V632V]), характерная для жителей Петрозаводска, описана в литературе как *Ava II* ПДРФ и встречается как в европейских популяциях, так и в популяции Китая (Mak et al., 1998).

Полиморфный маркер с.1617 C>T (P539P [P518P]) ранее описывался у жителей Санкт-Петербурга как молчащая мутация, так как был выявлен лишь у одного пациента с СГ. В обследованной группе пациентов из Петрозаводска этот вариант генетической замены встречается значительно чаще.

Особый интерес представляет установление молекулярной природы *Msp I* ПДРФ в 15-ом экзоне гена рецептора ЛНП. В базах данных он упоминается как замена с.2231 G>A (R744Q [R723Q]). Однако, как показало секвенирование образцов ДНК пациентов из Санкт-Петербурга и Петрозаводска, исчезновение *Msp I* сайта было связано с заменой с. 2232G>A (R744R [R723R]). Эта замена выявлялась в Санкт-

Петербурге со статистически достоверно не отличающейся частотой, что и в Петрозаводске в данном исследовании.

Полиморфизм с.1773C>T (N591N [N570N]), характерный для жителей Петрозаводска, также не меняет аминокислотный остаток белка, однако в литературе есть данные, свидетельствующие о его роли в альтернативном сплайсинге мРНК, приводящей к увеличению нонсенс-опосредованной деградации мРНК. Кроме того, при наличии данной замены было продемонстрировано 25% снижение связывания ЛНП, меченных флуоресцентной меткой. Этот полиморфизм был описан как значимая для развития СГ нуклеотидная замена в разных популяциях (Gao et al., 2013). Интересно, что в группе пациентов из Петрозаводска для этого полиморфизма не выполняется равновесие Харди-Вайнберга. Высокая частота встречаемости редкого аллеля Т данного полиморфного маркера среди больных СГ в Петрозаводске, среди больных СГ и особенно в группе контроля в Санкт-Петербурге все же указывает на нейтральный характер этой замены.

Данные по встречаемости в разных странах мира всех генетических вариантов, описанных у жителей Петрозаводска, представлены в таблице 5.

По результатам данной работы у пациентов с СГ из Петрозаводска было выявлено 18 различных генетических дефектов гена рецептора ЛНП, пять из которых являются миссенс-мутациями, пять сдвигают рамку считывания и приводят к образованию стоп-кодона в белке, одна мутация нарушает сплайсинг, одна является нейтральной аминокислотной заменой и шесть мутаций являются молчащими. Девять мутаций были оценены как патогенные варианты: с.618 T>G, с.1340 C>G, с.1532 G>A, с.192del10/ins8, с.195_196insT, с.925-931del7, с.1686del8/insT, с.2191delG и с.1773 C>T.

Подобранные в данной работе методы быстрого тестирования этих мутаций позволяют провести поиск соответствующих генетических дефектов в гене рецептора ЛНП среди родственников обследованных пациентов с целью ранней диагностики болезни и своевременной профилактики осложнений атеросклероза. Однако большое разнообразие встречающихся мутаций и отсутствие в обследованной группе пациентов мажорных вариантов не позволяет применять эти методы для диагностики всего населения Петрозаводска.

Почти полное отсутствие «финских» мутаций у пациентов с СГ из Петрозаводска согласуется с преобладанием славянского, а не карело-финского населения в этом крупном городе. Только одна мутация оказалась общей для пациентов с СГ из Петрозаводска и из Санкт-Петербурга. Частоты встречаемости вариантов двух из шести выявленных полиморфных маркеров (с.1617 C>T, с.1959 C>T) также отличаются в этих двух группах.

Таблица 5 - Встречаемость найденных в Петрозаводске генетических дефектов гена рецептора ЛНП в других популяциях мира

Название мутации	Экзон	Встречаемость в других странах
Миссенс-мутации		
c.58 G>A (G20R [G(-)R])	экзон 1	Франция, Австрия, Нидерланды, Новая Зеландия, Турция, Хорватия
c.618T>G (S206R [S185R])	экзон 4	Новая мутация
c.1340 C>G (S447C [S426C])	экзон 9	Новая мутация
c.1532 G>A (L511S [L490S])	экзон 10	Италия
c.1936 C>A (L646I [L625I])	экзон 13	Новая мутация
Мутации сдвига рамки считывания		
c.192del10/ins8 (FsS65: D129X [FsS44:D108X])	экзон 3	Новая мутация
c.195_196insT (FsV66: D129X [FsV45:D108X])	экзон 3	Новая мутация
c.925-931del7 (FsE308:V369X [FsE287:V348X]), FH-North Karelia	экзон 6	Финляндия, Швеция, США, Россия
c.1686del8/insT (FsW562:L568X [FsW541:L547X])	экзон 11	Новая мутация
c.2191delG (FsV731:V736X [FsV710:V715X])	экзон 15	Новая мутация
Мутации, нарушающие сплайсинг		
c. 1773 C>T (N591N [N570N])	экзон 12	США, Китай, Марокко
Нейтральные мутации/полиморфизмы		
c. 1171G>A (A391T [A370T])	экзон 8	Южная Африка, Англия, Франция
Молчащие мутации/полиморфизмы		
c.1194C>T (I398I [I377I])	экзон 9	Австрия
c.1413 G>A (R471R [R450R])	экзон 10	Южная Африка, Норвегия, Россия
c.1617 C>T (P539P [P518P])	экзон 11	Марокко, Китай, Россия.
p.1920 C>T (N640N [N619N])	экзон 13	Испания, Австрия
c.1959 C>T (V653V [V632V])	экзон 13	Нидерланды, США, Россия
c.2232 G>A (R744R [R723R])	экзон 15	Россия

В целом спектр мутаций гена рецептора ЛНП у пациентов с СГ из Петрозаводска характеризуется большим разнообразием и уникальностью по отношению к спектру мутаций этого гена у пациентов из Санкт-Петербурга и других городов России.

ВЫВОДЫ

1. Впервые было проведено исследование молекулярной природы семейной гиперхолестеринемии у жителей Петрозаводска. Всего у пациентов с СГ из этого города описано 12 мутаций и 6 полиморфизмов в гене рецептора ЛНП. Семь мутаций охарактеризованы впервые в мире.
2. Мутационный спектр гена рецептора ЛНП у пациентов с СГ из Петрозаводска и из Санкт-Петербурга существенно отличается: на сегодняшний день выявлена только одна мутация, общая для этих двух городов.
3. Все полиморфные сайты, выявленные среди больных СГ из Петрозаводска, встречались также и в Санкт-Петербурге, однако частоты вариантов полиморфных маркеров отличаются в изученных группах.
4. У пациентов с СГ из Петрозаводска практически отсутствуют мутации, характерные для популяции Финляндии, что согласуется с преобладанием славянского, а не карело-финского населения в Петрозаводске.
5. Мутация R3500Q в гене *APOB* не характерна для населения Петрозаводска, также как и для населения Санкт-Петербурга.
6. Спектр мутаций гена рецептора ЛНП при СГ в Петрозаводске, как и в Санкт-Петербурге, достаточно широкий, мажорные мутации отсутствуют, а эффект основателя в отношении СГ на Северо-Западе России выражен слабо.
7. Наиболее эффективным способом ДНК-диагностики пациентов с СГ на Северо-Западе России является прямое секвенирование всех кодирующих участков гена рецептора ЛНП и его экзон-интронных границ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как следует из основной части данной диссертационной работы, впервые была обследована группа больных с СГ, проживающих в городе Петрозаводске (Республика Карелия). Работа позволяет сделать два наиболее важных практических заключения. Первое состоит в том, что мутация R3500Q в гене *APOB*, характерная для стран Средней Европы, чрезвычайно редка или вовсе не встречается у пациентов с СГ в Карелии. Это означает, что при поиске генетических дефектов при СГ в Карелии, также как и в Петербурге, следует сосредоточиться на поиске мутаций в гене рецептора ЛНП, а не в гене *APOB*. Второе практически важное заключение состоит в том, что в Петрозаводске – городе со смешанным населением, не

обнаруживается мажорных мутаций в гене рецептора ЛНП или мутаций, привязанных к отдельным экзонам гена. Следовательно, лучшим методом для ДНК-диагностики СГ в Карелии является прямое секвенирование всех экзонов гена рецептора ЛНП и экзон-интронных стыков, а не сканирование отдельных экзонов этого гена. Чрезвычайно интересным представляется осуществить поиск мутаций в гене рецептора ЛНП в малых городах и поселках Карелии с сохранившимся этническим составом населения. Логическим продолжением исследований станет изучение спектра мутаций рецептора ЛНП в неизученных районах Северо-Запада России: Мурманской, Новгородской и Псковской областях.

Работы, опубликованные по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

- 1 “Финские” мутации в гене рецептора липопротеинов низкой плотности - редкая причина семейной гиперхолестеринемии в Санкт-Петербурге и в Петрозаводске / **Т. Ю. Комарова**, А. С. Головина, Н. А. Грудина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, № 3. – С. 359 - 362.
- 2 Новые мутации гена рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с семейной гиперхолестеринемией из Петрозаводска / **Т. Ю. Комарова**, А. С. Головина, Н. А. Грудина [и др.] // Генетика (Москва). - 2013. – Т. 49, № 6. – С. 772 - 776.
- 3 Случай семейной гиперхолестеринемии, вызванный новой мутацией p.Fs S65:D129X в гене рецептора липопротеинов низкой плотности человека / В. А. Корнева, Т. Ю. Кузнецова, **Т. Ю. Комарова** [и др.] // Кардиология. – 2013. – Т. 53, № 5 – С. 50 - 54.

Прочие работы, опубликованные по теме диссертации

1. Комплексное исследование семейной гиперхолестеринемии на Северо-Западе России / М. Ю. Мандельштам, **Т. Ю. Комарова**, А. С. Головина [и др.] // Медицинская генетика: материалы VI Съезда Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 14 – 18 мая 2010 г.). - 2010. - С. 109 - 110.
2. Сравнительное изучение генетики семейной гиперхолестеринемии в Санкт-Петербурге и Петрозаводске / М. Ю. Мандельштам, А. С. Головина, **Т. Ю. Комарова** [и др.] // Клинико-лабораторный консилиум. Специальный выпуск: материалы Российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное», посвященного памяти профессора Евгения Иосифовича Шварца. -2010. –Т. 2 – 3, № 33 - 34. – С. 177.

3. Сравнительное исследование семейной гиперхолестеринемии у жителей Санкт-Петербурга и Петрозаводска / М. Ю. Мандельштам, **Т. Ю. Комарова** [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика: материалы Российского национального конгресса кардиологов (Москва, 5 - 7 октября 2010 г.). – 2010. – Т.9, № 6, Приложение 1. – С. 202 - 203.
4. Первое исследование молекулярно-генетических основ семейной гиперхолестеринемии у жителей Петрозаводска: перспективы для молекулярной диагностики / М. Ю. Мандельштам, **Т. Ю. Комарова**, А. С. Головина [и др.] // VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2010». Сборник трудов / под ред. акад. РАМН В.И. Покровского. – Москва, 2010. - Т.3. – С. 87 - 89.
5. **Комарова, Т. Ю.** Поиск мутаций у больных семейной гиперхолестеринемией – жителей Санкт-Петербурга и Петрозаводска / **Т. Ю. Комарова**, А. С. Головина // Медицинский академический журнал. – 2010. – Т. 10, № 5 – С. 123.
6. Golovina, A. S. Study of mutation spectra in patients with familial hypercholesterolemia from two major cities in North-West Russia: St. Petersburg and Petrozavodsk / A. S. Golovina, **T. Y. Komarova** // Eur. J. Hum. Genet.: abstracts of European Human Genetics Conference (Amsterdam, The Netherlands May 28 – May 31, 2011) - Vol. 19, Suppl.2. - P. 453.
7. Golovina, A. S. Comparative study of mutation spectra in North-West Russia familial hypercholesterolemia: St.Petersburg versus Petrozavodsk / A. S. Golovina, **T. Y. Komarova** // Abstract book of the 4th International IMBG Conference for Young Scientists “Molecular Biology: advances and perspectives” (September, 14-17, 2011, Kyiv, Ukraine). – 2011.- P. 94.
8. Разнообразие мутаций в гене рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с семейной гиперхолестеринемией – жителей Карелии / М. Ю. Мандельштам, **Т. Ю. Комарова**, А. С. Головина [и др.] // Материалы Всероссийского научно-образовательного форума «Кардиология-2012» (28 февраля- 1 марта 2012 года, Москва).- Москва, 2012. – С. 99 - 100.
9. Спектр мутаций в гене рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с семейной гиперхолестеринемией – жителей Карелии / **Т. Ю. Комарова**, А. С. Головина, В. А. Корнева [и др.] // Материалы V Всероссийской конференции с международным участием «Пренатальная диагностика и генетический паспорт – основа профилактической медицины в век нанотехнологий» / под ред. чл.-корр. РАМН В. С. Баранова. – Новосибирск: «НСК Регион», 2012. – С. 51.

10. Финляндия и Карелия: смежные территории, разные мутации при семейной гиперхолестеринемии / М. Ю. Мандельштам, **Т. Ю. Комарова**, А. С. Головина [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. Специальный выпуск: материалы Московского международного форума кардиологов (14-15 июня 2012 г., Москва). – 2012 – Т.11 – С. 71.
11. Новые и известные мутации в гене рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с семейной гиперхолестеринемией - жителей Карелии / **Т. Ю. Комарова**, А. С. Головина, В. А. Корнева [и др.] // Материалы Российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное», посвященного памяти профессора Е.И. Шварца (18-20 июня 2012 г., Санкт-Петербург). – 2012 – С. 110.
12. **Комарова, Т. Ю.** Сравнительная характеристика спектров мутаций гена рецептора липопротеинов низкой плотности в Санкт-Петербурге и Петрозаводске / **Т. Ю. Комарова** // Сборник тезисов XVII Санкт-Петербургской ассамблеи молодых ученых и специалистов.- Санкт-Петербург, 2012. – С. 207 – 208.
13. Семейная гиперхолестеринемия у жителей Карелии / В. А. Корнева, Т. Ю. Кузнецова, **Т. Ю. Комарова** [и др.] // Российский кардиологический журнал: материалы Первого международного образовательного форума «Российские дни сердца» (4 – 6 апреля 2013 г., Москва). – 2013. - №2, Приложение 2. – С. 68 – 69.

Список принятых сокращений

ЛНП – липопротеины низкой плотности;

ПДРФ-анализ – анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов;

п.н. – пар нуклеотидов;

СГ – семейная гиперхолестеринемия;

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания;

ХС – холестерин;

ARH – autosomal-recessive hypercholesterolemia;

АРОВ – apolipoprotein B;

LDLR – low density lipoprotein receptor;

FDB – familial defective apolipoprotein B-100;

PCSK9 – proprotein convertase subtilisin/kexin-type 9;

SSCP-анализ – анализ конформационного полиморфизма однонитевых фрагментов ДНК (single-strand conformation polymorphism analysis).