

## **Разработка системы детекции SNP генов предрасположенности к развитию семейной гиперхолестеринемии на основе ПЦР**

**Зажома Д. А.**

*студентка 3 курса экологического факультета*

*Ульяновского государственного университета*

*E-mail: dashuntui@mail.ru*

**Хохлова А. В.**

*младший научный сотрудник*

*лаборатории молекулярной и клеточной биологии НИТИ им. С.П. Капицы;*

*аспирант 1 года обучения экологического факультета*

*Ульяновского государственного университета*

*Научный руководитель: **Мастиленко А. В.**, к.б.н., старший научный сотрудник*

*лаборатории молекулярной и клеточной биологии НИТИ им. С.П. Капицы*

*Ульяновский государственный университет*

Семейная гиперхолестеринемия (СГХ) — наследственное заболевание, ведущее к раннему, по сравнению с общей популяцией, развитию сердечно-сосудистой недостаточности, что серьёзно влияет на качество жизни и, зачастую, значительно сокращает её продолжительность. Возникновение заболевания ассоциировано с мутациями в генах, регулирующих метаболизм холестерина: гены ЛПНП-рецептора (LDLR), аполипопротеина В (ApoB), пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9) и адаптерного белка 1 ЛПНП-рецептора (LDLRAP1). По данным мировых исследований своевременная диагностика и начало терапии, направленной на нормализацию уровня холестерина в крови пациентов с наследственной гиперхолестеринемией, позволяет снизить смертность и заметно сократить расходы на здравоохранение. В связи с этим разработка простой и доступной системы детекции мутаций в генах предрасположенности к развитию СГХ представляется нам достаточно важной задачей.

Семейная (наследственная) гиперхолестеринемия — генетическая болезнь, характеризующаяся высоким уровнем холестерина в крови, в частности, очень высоким уровнем липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), а также ранним возникновением сердечно-сосудистых нарушений. Для данного заболевания характерно полное или частичное закупоривание сосудов, что ведет к развитию таких болезней, как атеросклероз, а он, как правило, лежит в основе многих других болезней сердца и сосудов. Кроме этого, СГХ может привести к появлению хронической недостаточности кровообращения в различных органах и тканях, в том числе и тканях головного мозга. [1]

Симптомы заболевания могут быть следующими: высокий уровень холестерина в крови пациента, холестериновые отложения на коленях, локтях и ягодицах, боль в груди, вызванная сужением коронарных сосудов, инфаркты, которые случаются в относительно раннем возрасте. [6]

Заболевание имеет две формы: гетеро- и гомозиготную. Гетерозиготная форма наследственной гиперхолестеринемии часто остаётся невыявленной до взрослого состояния, пока не развивается сердечно-сосудистая недостаточность. Данная форма встречается в общей европейской популяции у одного из пятисот (1:500) человек. [5]

Клинические признаки гомозиготной (полной) наследственной гиперхолестеринемии начинают проявляться уже в детском возрасте. Кроме характерных симптомов заболевания развивается типичная картина ишемической болезни сердца. Гомозиготная

форма заболевания проявляется намного реже, и встречается у одного из миллиона (1:1 000 000) новорожденных. [10]

205

Стоит отметить, что у пациентов с гетерозиготной формой СГХ сердечно-сосудистые заболевания чаще всего возникают в возрасте от 30 до 40 лет, тогда как при гомозиготной форме тяжелые сердечно-сосудистые заболевания развиваются уже в детском возрасте. [9] Существует несколько видов аполипопротеинов, различающихся молекулярной массой, степенью сродства к холестерину и степенью растворимости комплексного соединения с холестерином. Развитие сосудистой недостаточности зависит от двух типов липопротеинов: липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). [7]

Известно, что люди с мутациями в гене LDLR имеют очень высокий уровень холестерина в крови. [3] При этом стоит отметить, что концентрация аполипопротеина В (apoB) в крови является даже более достоверным индикатором риска атеросклероза, чем общий холестерин или холестерин ЛПНП. [4]

Пропотеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9, или PCSK9 — ферментгидролаза, который играет важную роль в гомеостазе холестерина и является важной

потенциальной мишенью для агентов, снижающих уровень холестерина липопротеинов низкой плотности в крови. [8] Важное значение в метаболизме липопротеинов низкой плотности имеет адаптерный белок первого типа ЛПНП-рецептора (LDLRAP1) — рецептор, связывающий частицы липопротеина низкой плотности. Мутации в гене LDLRAP1 также приводят к развитию семейной гиперхолестеринемии. [2]

В связи с вышеизложенным представляется важным своевременно поставить правильный диагноз и начать лечение. Основным способом диагностики СГХ в мире является секвенирование — дорогостоящая методика, требующая достаточного сложного оборудования. Также стоит отметить, что большинство систем диагностики, в том числе имеющихся на российском рынке, помимо сложностей в применении, позволяют идентифицировать мутации в трёх из четырёх известных генов, ассоциированных с развитием СГХ.

Целью нашего исследования является разработка диагностической системы для детекции наследственных форм гиперхолестеринемии для обнаружения полиморфизмов в генах LDLR, apoB, PCSK9, LDLRAP1 на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В процессе разработки диагностической системы предусмотрены следующие методики.

1. Подбор праймеров к SNP мутантных генов с применением инструментов BLAST.
2. Синтез праймеров на синтезаторе ДНК/РНК BIOSSET ASM-800.
3. Постановка полимеразной цепной реакции.

Доклинические исследования будут проводиться на биологическом материале культур клеток человека, далее планируются клинические испытания на биоматериале доноров.

В настоящее время система детекции находится на стадии разработки. Создана система праймеров и синтезированы праймеры к наиболее часто встречающимся SNP гена LDLR, на данный момент производится оптимизация условий полимеразной цепной реакции. После окончания этого этапа будет проведена апробация на биологическом материале.

Работа выполняется в рамках гранта «Участник молодежного научно-инновационного

конкурса» («УМНИК») Федерального государственного бюджетного учреждения «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере».

Список использованной литературы

1. Goldberg A. C. Семейная гиперхолестеринемия: скрининг, диагностика и лечение детей и взрослых пациентов: клиническое руководство, подготовленное группой экспертов по семейной гиперхолестеринемии при Национальной липидной ассоциации США / Goldberg A. C., Hopkins P. N., Toth P. P., Ballantyne C. M., Rader D. J., Robinson J. G., Daniels S. R., Gidding S. S., De Ferranti S.D., Ito M. K., McGowan M. P., Moriarty P. M., Cromwell W. C., Ross J. L., Ziajka P. E. // Атеросклероз и дислипидемии. - 2012. - №1 (6). - P. 206
2. Gross J.J. Rapid Communication: Cholesterol deficiency-associated APOB mutation impacts lipid metabolism in Holstein calves and breeding bulls / Gross J.J., Schwinn A.C, Schmitz-Hsu F, Menzi F, Drögemüller C, Albrecht C, Bruckmaier R.M. // J Anim Sci. - 2016. - Vol.94. - P. 61-76.
3. Henry C.A. Clinical efficacy and safety of evolocumab for low-density lipoprotein cholesterol reduction. / Henry C.A., Lyon R.A., Ling H. // Vasc Health Risk Manag. - 2016. - Vol. 163. - P. 9-12
4. Hughes D.P. Familial Hypercholesterolaemia in the Era of Genetic Testing / Viljoen A., Wierzbicki A.S., Hughes D.P.// Curr Cardiol Rep. - 2016. - Vol.723. - P. 107-123.
5. Page M.M. Lipoprotein apheresis and new therapies for severe familial hypercholesterolemia in adults and children. / Page M.M., Bell D.A., Hooper A.J., Watts G.F., Burnett J.R. // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. - 2014. - Vol. 387. - P. 387- 403.
6. Sanna C. Homozygous familial hypercholesterolemia in childhood: Genotype-phenotype description, established therapies and perspectives. / Sanna C., Stéphenne X., Revencu N., Smets F., Sassolas A., Di Filippo M., Descamps O.S., Sokal E.M. // Atherosclerosis. - 2016. - Vol. 247. - P. 97-104.
7. Sharifi M. Cardiovascular risk stratification in familial hypercholesterolaemia. / Sharifi M., Rakhit R.D., Humphries S.E., Nair D. // Heart. - 2016. // <http://heart.bmj.com/content/early/2016/04/28/heartjnl-2015-308845.long>
8. Tyrankiewicz U. Comprehensive MRI for the detection of subtle alterations in diastolic cardiac function in apoE/LDLR-/- mice with advanced atherosclerosis / Tyrankiewicz U., Skorka T., Orzylowska A., Jablonska M., Jasinski K., Jaształ A., Bar A., Kostogrys R., Chlopicki S. // NMR Biomed.- 2016. - Vol.325. - P. 24-35.
9. Захарова Ф. М. Диагностика семейной гиперхолестеринемии у детей в семьях с отягощенной наследственностью. / Захарова Ф. М., Голубков В. И., Липовецкий Б. М., Константинов В. О., Мандельштам М. Ю., Васильев В. Б. // ВСП. - 2005. - №1.
10. Липовецкий Б. М. Гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия в СанктПетербурге вследствие дефекта гена рецептора липопротеидов низкой плотности. / Липовецкий Б. М., Мандельштам М. Ю. // Атеросклероз и дислипидемии. 2012. №3.