

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННОГО СИНДРОМА ГИПОХОЛЕСТЕРИНЕМИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

А.И. Ершова, Н.В. Щербакова, А.А. Суворова, Э.Ю. Хлебус, И.В. Сидонец, А.Н. Мешков*, С.А. Бойцов

Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины
101990, Москва, Петроверигский пер., 10

Описан клинический случай пациента Д 55 лет, который обратился в Липидную клинику ГНИЦ ПМ в связи с низким уровнем холестерина крови. Представлены результаты дифференциальной диагностики синдрома гипохолестеринемии с применением метода экзомного секвенирования, позволяющего секвенировать большинство областей генома, содержащих экзоны – участки генов, кодирующие белки. При помощи экзомного секвенирования у пациента выявлена гетерозиготная мутация в гене APOB – делеция 5 нуклеотидов. Данная мутация приводит к преждевременному стоп-кодону с нарушением синтеза аполипопротеина В-100 и вызывает наследственное моногенное заболевание – семейную гипобеталипопротеинемию.

Ключевые слова: генетическая диагностика, семейная гипобеталипопротеинемия, экзомное секвенирование, мутация.

Рациональная фармакотерапия в кардиологии 2014;10(5):509-512

Differential diagnosis of hereditary syndrome of hypocholesterolemia by using exomic sequencing

A.I. Yershova, N.V. Shcherbakova, A.A. Suvorova, E.Y. Hlebus, I.V. Sidonets, A.N. Meshkov*, S.A. Boytsov
State Research Centre for Preventive Medicine. Petroverigsky per. 10, Moscow, 101990 Russia

Clinical case study is described. Patient D, 55 years old, applied to the Lipid clinic of State Research Centre for Preventive Medicine because of low blood cholesterol level. Results of the differential diagnosis of the hypocholesterolemia syndrome by using exomic sequencing are presented. This method allows to sequence the majority of regions of genome containing exons, protein-coding parts of genes. Heterozygous mutation in the gene for APOB (5 nucleotides deletion) was found out in the patient by using exomic sequencing. This mutation leads to a premature stop codon with violation of apolipoprotein B-100 synthesis and causes inherited monogenic disease - family hypobetalipoproteinemia.

Key words: genetic diagnosis, family hypobetalipoproteinemia, exomic sequencing, mutation.

Ration Pharmacother Cardiol 2014;10(5):509-512

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): meshkov@lipidclinic.ru

Введение

Синдром гипохолестеринемии может быть вызван как вторичными причинами – строгая вегетарианская диета, недоедание, кахексия, тиреотоксикоз, тяжелые заболевания печени и т.д., так и быть первичным генетическим моногенным заболеванием [1]. В настоящее время описано 5 генов, мутации которых вызывают синдром гипохолестеринемии – MTPP, APOB, PCSK9, SAR1B, ANGPTL3 [2].

Экзомное секвенирование – это современный генетический метод, позволяющий секвенировать большинство областей генома содержащих кодирующие белки участки генов – экзоны (экзом – совокупность всех экзонов у одного организма). Секвенирование экзомов

человека в настоящее время применяется как для индивидуального генетического обследования пациента, так при эпидемиологических исследованиях [3,4] С применением метода экзомного секвенирования нами выявлена гетерозиготная мутация в гене APOB del chr2:21237972-21237977 (T1222SfsX32) – делеция 5 нуклеотидов, приводящая к преждевременному стоп-кодону с нарушением синтеза аполипопротеина В-100 (апоВ-100) и вызывающая наследственное моногенное заболевание – семейную гипобеталипопротеинемию.

Клинический случай

В данной статье описывается клинический случай пациента Д. – 55-летнего мужчины, который обратился в липидную клинику ГНИЦ ПМ в июле 2013 г в связи с низким уровнем холестерина крови. Пациент предъявлял жалобы на метеоризм, светлый неоформленный стул до 2-3 раз в день.

Из анамнеза известно, что на протяжении всей жизни пациента беспокоил неоформленный стул. В возрасте 47 лет по данным УЗИ органов брюшной полости выявлены признаки жирового гепатоза, а в биохимическом анализе крови эпизодически регистрировалось небольшое повышение активности аланиновой трансаминазы (АЛТ). Пациент регулярно обследовался и ле-

Сведения об авторах:

Ершова Александра Игоревна – к.м.н., с.н.с. лаборатории молекулярной генетики ГНИЦ ПМ

Щербакова Наталья Владимировна – лаборант-исследователь той же лаборатории

Суворова Анастасия Александровна – м.н.с. той же лаборатории

Хлебус Элеонора Юрьевна – лаборант той же лаборатории

Сидонец Иван Витальевич – аспирант той же лаборатории

Мешков Алексей Николаевич – к.м.н., руководитель той же лаборатории

Бойцов Сергей Анатольевич – д.м.н., профессор, директор ГНИЦ ПМ, руководитель отдела клинической кардиологии и молекулярной генетики

чился у гастроэнтеролога, проводилась терапия гепатопротекторными средствами (урсодезоксихолевая кислота, адеметионин).

Клиническое обследование пациента проведено в соответствии с этическими положениями Хельсинкской декларации и Национальным стандартом Российской Федерации «Надлежащая клиническая практика (Good Clinical Practice)» ГОСТ Р 52379-2005. Пациентом подписано добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Пациенту проведен ряд лабораторно-инструментальных тестов.

Лабораторные тесты. Забор крови у пациента проводился после 12-часового периода голодания. Уровни общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), аполипопротеина А-1, апоВ-100, аспарагиновой трансминазы (АСТ), АЛТ определяли с помощью автоматического анализатора Architect 2000 (Abbott, США).

В общем анализе крови выявлен акантоцитоз эритроцитов, а в биохимическом анализе крови – снижение уровней ОХС до 2,5 ммоль/л, и ХС-ЛПНП – до 0,87 ммоль/л (табл. 1). При обследовании данных, позволяющих выявить вторичную причину гипохолестеринемии, получено не было.

При обследовании родственников пробанда – у отца и сына в анализах крови также выявлено снижение уровней ОХС и ХС-ЛПНП, а у матери пробанда уровни липидов были в пределах нормальных значений (табл. 1).

Инструментальные тесты. Нами было проведено обследование пациента Д. с целью оценки степени по-

ражения печени и атеросклеротического процесса и выявление мутации, ответственной за развитие гипохолестеринемии. Мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) печени и сердца выполнялась при толщине среза 0,75 мм; rich 0,7. Дуплексное сканирование брахиоцефальных артерий проводилось в В-режиме линейным датчиком высокого разрешения 9,3 МГц (PHILIPS iU22, Нидерланды).

МСКТ печени: печень обычной формы и положения, в размерах не изменена, контуры ровные, четкие. Плотность паренхимы резко диффузно снижена до -5-+4 ед. Н (нормальные показатели +50-+60 ед.Н). Очагов патологической плотности не выявлено. Заключение: КТ признаки резко выраженного жирового гепатоза.

При МСКТ коронарных артерий (скрининг коронарного кальция) определялись мелкие кальцинаты в передней межжелудочковой артерии объемом 5,1 куб. мм, в остальных коронарных артериях кальцинированных бляшек не выявлено. Суммарный коронарный индекс составляет 3,7 ед., что соответствует низкому кардиоваскулярному риску.

Дуплексное сканирование брахиоцефальных артерий: зарегистрированы плоская гетерогенная атеросклеротическая бляшка бифуркации брахиоцефального ствола, утолщение и уплотнение стенок бифуркации правой общей сонной артерии (ОСА) [толщина комплекса интима-медиа (ТИМ)=0,9 мм], стеноз 20% бифуркации левой ОСА за счет гетерогенной атеросклеротической бляшки, расположенной преимущественно по передней стенке.

Генетическое исследование. Проведено секвенирование экзома пациента по методике описанной нами ранее [5]. Кровь пациентов забиралась в пробирки

Таблица 1. Клиническая характеристика пробанда и его родственников

Параметр	Пробанд	Мать пробанда	Сын пробанда	Отец пробанда
Возраст, лет	55	83	32	84
ИМТ, кг/м ²	31,6	н.д.	30,6	23,1
Общий холестерин, ммоль/л	2,4	6,35	2,6	4,3
АпоВ-100, мг/дл	26	н.д.	36,8	50
ХС-ЛПНП, ммоль/л	1,19	4,32	1,43	2,06
ХС-ЛПВП, ммоль/л	0,99	1,52	1,05	2
Триглицериды, ммоль/д	0,48	1,14	0,27	0,53
АСТ, Е/л	29	18	70	17
АЛТ, Е/л	54	12	103	62
ГГТ, Е/л	8	14	15	32
Акантоцитоз	да	нет	нет	нет
Стеатоз печени	да	нет	нет	да
Стеаторея	да	нет	нет	нет

ИМТ – индекс массы тела, АпоВ-100 – аполипопротеин В-100, ХС-ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности, ХС-ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности, АСТ – аспарагиновая трансминаза, АЛТ – аланиновая трансминаза, ГГТ – гамма-глутамилтранспептидаза

с ЭДТА с последующей заморозкой до -20°C . Геномную ДНК выделяли из 1 мл крови с помощью QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, США). Из 4 мкг ДНК готовили геномные библиотеки по методике и с применением реактивов Life Technologies, США.

Экзомное обогащение производили с помощью гибридизации 500 нг смеси из 4-х библиотек с биотинилированными пробами TargetSeq Exome Enrichment System (Life Technologies, США).

4,2 нг смеси 8 экзомных библиотек брали для одной эмульсионной ПЦР. Эмульсионная ПЦР проводилась с помощью SOLiDTMMEZ BeadTM Systems (Life Technologies, США). Отбор магнитных частиц проводился на приборе Applied Biosystems SOLiDTMMEZ BeadTM Enricher (Life Technologies, США) согласно протоколу. Подготовленные магнитные частицы разводили в необходимом объеме буфера для нанесения и наносили в ячейку для секвенирования, которую затем инкубировали при 37°C 1 час. Секвенирование образцов проводили на приборе SOLiD 5500XL (Life Technologies, США) согласно протоколу.

Биоинформатическая обработка данных. Размер изучаемого экзома в данной работе составлял 37270000 нуклеотидов, 195282 экзона в 19911 генах. По завершении процесса секвенирования вся информация была записана в файлы с расширением .xsq, содержащие набор прочтений всего экзома (длина прочтения – 75 нуклеотидов).

Картирование и поиск однонуклеотидных полиморфизмов, коротких вставок и делеций были осуществлены с помощью пакета программ LifeScopeTM Genomic Analysis Software for SOLiD[®] Next-Generation Sequencing. Для анализа полученного набора прочтений экзома был использован набор операций для целевого ресеквенирования (targeted.resequencing.frag) с параметрами по умолчанию. В результате для каждого пациента были получены файлы, содержащие список однонуклеотидных полиморфизмов, коротких вставок и делеций, их координаты, данные о покрытии и прочие характеристики. Найденные мутации были проаннотированы с помощью программы ANNOVAR [6], и проведено сравнение с рядом специализированных баз данных:

dbSNP – база данных, содержащая описание однонуклеотидных полиморфизмов, коротких вставок и делеций, коротких tandemных повторов [7].

Reference Sequence (RefSeq) – аннотация замен по этой базе данных позволяет понять, как в кодирующую или некодирующую часть генома попала замена, если в кодирующую, то в какой ген попала замена, в какой экзон этого гена, и привела ли замена к смене аминокислоты или к сдвигу рамки считывания [8].

Sift – база данных позволяющая спрогнозировать

вред несинонимичных мутаций для последовательности белка, кодирующей геном, содержащим замену [9].

PolyPhen – база данных позволяющая спрогнозировать силу вреда замены [5].

ClinVar – база данных с клинически значимыми полиморфизмами и их ассоциациями с заболеваниями [10].

1000 Genomes, esp6500 – базы данных, содержащие информацию о частотах минорных аллелей, составленных на основании результатов секвенирования геномов и экзомов в рамках проектов «1000 genomes» [11] и «NHLBI Grand Opportunity Exome Sequencing Project» [12].

При генетическом обследовании пациента с применением метода экзомного секвенирования выявлена гетерозиготная мутация в гене APOB del chr2:21237972-21237977 (T1222SfsX32), делеция 5 нуклеотидов, приводящая к преждевременному стоп-кодону с нарушением синтеза апоВ-100 и вызывающая наследственное моногенное заболевание – семейную гипобеталипопротеинемию. В генах MTPP, PCSK9, SAR1B, ANGPTL3 патологических мутаций не выявлено.

Генетическая диагностика является золотым стандартом в диагностике моногенных наследственных заболеваний. С накоплением знаний в области молекулярной генетики человека стало понятно, что фенотипически схожие моногенные заболевания могут вызываться мутациями разных генов, иметь при этом разный прогноз и требовать разного лечения. В настоящее время описано 5 генов, мутации которых вызывают синдром гипохолестеринемии. Это ген MTPP – микросомального белка, переносчика триглицеридов, участвующего в формировании богатых триглицеридами липопротеинов, а именно, липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и хиломикрон (ХМ). Мутации в гене MTPP приводят к развитию аутомно-рецессивного заболевания – абеталипопротеинемии, также известной как синдром Бессена-Корнцвейга. Данное заболевание является очень редким (частота в популяции менее 1 на один миллион) и характеризуется практически полным отсутствием apoB-содержащих липопротеинов в плазме крови. Проявляется в начале жизни нарушением всасывания жиров, стеатореей, нарушением развития, офтальмологическими и неврологическими нарушениями [1, 2].

Мутации в гене SAR1B приводят к развитию аутомно-рецессивного заболевания – болезни задержки хиломикрон или болезни Андерсона. Данное заболевание также является очень редким (частота в популяции менее 1 на один миллион) и характеризуется отсутствием аполипопротеина В-48 в кишечнике и низким уровнем холестерина липопротеинов низкой

плотности. При данном заболевании нарушается секреция хиломикрон из энтероцитов. У пациентов определяются тяжелые кишечные симптомы в виде стеатореи, хронической диареи и задержки развития. Акантоцитоз встречается редко, а неврологические проявления – меньшей тяжести по сравнению с абеталипопротеинемией [2].

Мутации гена ANGPTL3 связаны с развитием семейной комбинированной гиподислипидемии – ауто-сомно рецессивного заболевания, характеризующегося снижением уровня всех липопротеинов крови [2].

Мутации в гене APOB приводят к развитию семейной гипобеталипопротеинемии. Семейная гипобеталипопротеинемия является частым (примерно один на 1000-3000) ко-доминантным заболеванием, характеризующимся низким уровнем ХС-ЛПНП и апоВ-100. Мутации в гене APOB, вызывающие семейную гипобеталипопротеинемию, приводят к синтезу укороченного аполипопротеина В. Заболевание, как правило, протекает бессимптомно, но пациенты находятся в группе повышенного риска жирового гепатоза. Наблюдение двух мутаций в гене APOB клинически неотличимо от абеталипопротеинемии [1,2].

PCSK9 – пятый ген, мутации которого приводят к развитию клинически схожего с семейной гипобеталипо-

протеинемией заболевания, при этом функция печени при данной форме не страдает. Гетерозиготные мутации гена PCSK9 вызывающие снижение его функции, встречаются примерно у 2% африканцев и афроамериканцев [2].

Заключение

Проведение генетического обследования с использованием метода экзомного секвенирования у данного пациента помогло поставить ему точный диагноз – семейная гипобеталипопротеинемия. Умеренная стоимость и высокая скорость проведения генетической диагностики делают возможным в скором времени создание персонализированной медицины, где назначения лекарственных препаратов будут производиться, исходя из результатов генетической диагностики.

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Благодарности. Выражаем благодарность профессору, в.н.с. ГНИЦ ПМ Наталье Владимировне Перовой за помощь в проведении клинического обследования пациента.

Литература

1. Burnett J.R., Hooper A.J. Common and Rare Gene Variants Affecting Plasma LDL Cholesterol. Clin Biochem Rev 2008; 29:11-26.
2. Burnett J.R. Hooper A.J. Update on Primary Hypobetalipoproteinemia. Curr Atheroscler Rep 2014; 16(423):1-7.
3. Green RC, Berg JS, Grody WW, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. Genet Med 2013; 15(7):565-74.
4. Fu W, O'Connor TD, Jun G et al. Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants. Nature 2013; 493(7431):216-20.
5. Meshkov AN, Boytsov SA, Ershov AI et al. The study ATEROGEN-IVANOVO "Study of the development and progression of atherosclerosis of various localization, including taking into account the genetic and epigenetic factors of cardiovascular risk - substudy ESSE-IVANOVO" - design, algorithms of bioinformatics analysis and results of exomic sequencing in pilot group of patients. Profilakticheskaya Meditsina 2013; 6; 11-20. Russian (Мешков А.Н., Бойцов С.А., Ершова А.И. и др. Исследование АТЕРОГЕН-ИВАНОВО «Изучение особенностей развития и прогрессирования АТЕРОсклероза различной локализации, в том числе с учетом ГЕНетических и эпигенетических факторов сердечно-сосудистого риска – субисследование ЭССЕ-ИВАНОВО» – дизайн, алгоритмы биоинформационного анализа и результаты секвенирования экзоменов пациентов пилотной группы. Профилактическая Медицина 2013; 6; 11-20).
6. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. Nucleic Acids Res 2010; 38(16):e164.
7. dbSNP Short Genetic Variations. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>. Accessed by 20.10.2014.
8. Pruitt K, Brown G, Tatusova T, et al. Chapter 18. The Reference Sequence (RefSeq) Database. 2002 Oct 9 [Updated 2012 Apr 6]. In: McEntyre J, Ostell J, editors. The NCBI Handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2002. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091>. Accessed by 20.10.2014.
9. Liu X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP: a lightweight database of human nonsynonymous SNPs and their functional predictions. Hum Mutat 2011;32(8):894-9.
10. ClinVar. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. Accessed by 20.10.2014.
11. The Phase 3 Variant set with additional allele frequencies, functional annotation and other datasets. Available at: <http://www.1000genomes.org/>. Accessed by 20.10.2014.
12. NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP). Available at: <https://esp.gs.washington.edu/drupal/>. Accessed by 20.10.2014.

Поступила: 17.10.2014
Принята в печать: 20.10.2014