

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт медицины, экологии и физической культуры
Экологический факультет
Кафедра биологии, экологии и природопользования

КУРСОВАЯ РАБОТА

по дисциплине:

«Современные методы биологического исследования»
на тему:

**«ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С
ВОЗНИКНОВЕНИЕМ НАСЛЕДСТВЕННОЙ
ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ, МЕТОДОМ ПЦР»**

Студентка
Верхоглядова Д.П.
2 курс, направление подготовки
06.04.01 - Биология
(уровень магистратуры)

(подпись, дата) *25.12.2017*

(оценка) *отлично*

Научный руководитель,
д.б.н., профессор кафедры
БЭиПП Саенко Ю.В.

25.12.17
(подпись, дата)

Ульяновск, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
1 Обзор литературы.....	6
1.1 Метаболизм холестерина.....	6
1.2 Понятие наследственной гиперхолестеринемии. Признаки	12
1.3 Формы наследственной гиперхолестеринемии	14
1.4 Генетические мутации, ассоциированные с возникновением наследственной гиперхолестеринемии	18
1.5 Мутации в генах LDLR, apoB, PCSK9, LDLRAP1	23
1.6 Метод ПЦР при определении генов, расположенных к развитию СГХ	26
2 Материалы и методы	29
3 Результаты и их обсуждение.....	30
3.1 Генетические дефекты, ассоциированные с возникновением наследственной гиперхолестеринемии.....	30
3.2 Нуклеотидный состав генов предрасположенности к развитию семейной гиперхолестеринемии.....	31
3.3 Определение генов, расположенных к развитию семейной гиперхолестеринемии методом полимеразно-цепной реакции	32
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	34
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	35

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

СГХ – семейная гиперхолестеринемия

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

НГХ – наследственная гиперхолестеринемия

LDLR – липопротеины низкой плотности-рецептор

АРОВ – аполипопротеин В

PCSK9 - пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9

LDLRAP1 - адаптерного белка первого типа липопротеины низкой плотности-рецептора

ВВЕДЕНИЕ

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 достаточно важной задачей в настоящее время.

Актуальность: 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.

Цель курсовой работы: исследовать на основе анализа литературных данных выявление генов, ассоциированных с возникновением

наследственной гиперхолестеринемии, методом полимеразной цепной реакции.

Предмет исследования – генетическое заболевание, характеризующееся высоким уровнем холестерина в крови у населения.

Задачи, решаемые в курсовой работе:

- на основе литературных данных проанализировать генетические мутации, ассоциированные с возникновением наследственной гиперхолестеринемии;
- используя литературные данные, проанализировать нуклеотидный состав генов предрасположенности к развитию семейной гиперхолестеринемии;
- на основе литературных данных проанализировать основные пункты постановки метода ПЦР при определении генов, расположенных к развитию СГХ.

1 Обзор литературы

1.1 Метаболизм холестерина

Холестерин — органическое соединение, природный жирный (липофильный) спирт, содержащийся в клеточных мембранах всех живых организмов, за исключением грибов и безъядерных (прокариоты) [2, с. 63]

В растительных жирах содержание холестерина невелико.

Холестерин нерастворим в воде, растворим в жирах и органических растворителях. Около 80% холестерина вырабатывается самим организмом человека: (печенью, кишечником, почками, надпочечниками, половыми железами), остальные 20% поступают с пищей. 80% холестерина в организме свободные, а 20% — связанные.

Холестерин обеспечивает устойчивость клеточных мембран в широком интервале температур. Он необходим для выработки витамина D, выработки надпочечниками различных стероидных гормонов (включая кортизол, альдостерон, половые гормоны: эстрогены, прогестерон, тестостерон), жёлчных кислот, играет важную роль в деятельности нервной и иммунной системы [6, с. 178]

Норма холестерина в крови у женщин

Холестерин в крови представительниц женского пола по возрасту варьирует следующим образом (показатели указаны в ммоль/л):

- 20 лет – 3,11-5,17;
- 30 лет – 3,32-5,8;
- 40 лет – 3,9-6,9;
- 50 лет – 4,0-7,3;
- 60 лет – 4,4-7,7;

- 70 лет и старше – 4,48-7,82.

Повышение данного показателя с возрастом у женщин обуславливается гормональной перестройкой, происходящей в организме с приближением менопаузы и особенно после ее наступления. [5, с.146]

Норма холестерина в крови у мужчин

У мужчин также существуют возрастные колебания нормального уровня данного показателя (указан в ммоль/л):

- 20 лет – 2,93-5,1;
- 30 лет – 3,44-6,31;
- 40 лет – 3,78-7;
- 50 лет – 4,1-7,15;
- 60 лет – 4,04-7,14;
- После 60 лет – 4,0-7,0.

Молекулы холестерина, вещества с общей формулой $C_{27}H_{46}O$, могут синтезироваться почти всеми клетками из более простых органических компонентов. Однако для комплексных структурных функций, например нервных тканей или костного мозга, холестерин образуется в печени и доставляется в разные ткани тела по кровеносной системе. Холестерин нерастворим в воде и поэтому переносится по кровеносной системе в составе сферических липопротеиновых частиц — хиломикронов. Молекулы холестерина находятся внутри такого микрошарика в жировом растворе. На поверхности клеток имеются особые белки — рецепторы, которые, взаимодействуя с крупной белковой молекулой хиломикрона, включают особый процесс поглощения хиломикрона клеткой — эндоцитоз. Все такие процессы происходят динамически как самообновление. Хиломикроны, образуемые в печени, доставляются к клеткам, но другие хиломикроны, образуемые внутри клетки, удаляются из неё путем процессов экзоцитоза (выделения клеткой веществ), доставляются в печень, где они включаются в процесс образования желчных кислот, и в итоге удаляются из организма. В животных организмах удаление отработанных, но растворимых в воде

продуктов происходит в основном через почки, а нерастворимых в воде — через кишечник.

Липопротеиновые частицы, которые образуются в печени и доставляются через кровь в ткани, являются относительно крупными; они бывают двух размеров — от 425 до 444 ангстрем и от 208 до 237 ангстрем. Их часто называют «липопротеины с очень низкой и низкой плотностью». Из клеток и тканей обратно в печень транспортируются очень мелкие хиломикроны, диаметром от 106 до 124 ангстрем. Поскольку у них отношение поверхности к объёму намного выше, они обозначаются как липопротеины с высокой плотностью. Эти три типа холестериновых частиц известны в популярной литературе как «плохой» холестерин, который идёт из печени в ткани, и как «хороший» холестерин, который удаляется из тканей [1, с. 209]

В действительности существуют не три, а намного больше форм и разновидностей циркулирующих в крови липопротеиновых частиц. Разные ткани имеют свои специфические особенности и в метаболизме холестерина. В медицинских исследованиях приняты определение общего холестерина в крови и отдельные измерения холестерина из липопротеиновых частиц с очень низкой (VLDL), низкой (LDL) и высокой (HDL) плотностью. Эти анализы не относятся к числу простых и требуют многих процедур. Тотальное обследование населения на уровень холестериновых фракций, причём начиная с 20-летнего возраста, проводится только в США.

Биологическое значение холестерина. Холестерин в составе клеточной плазматической мембраны играет роль модификатора бислоя, придавая ему определённую жёсткость за счёт увеличения плотности «упаковки» молекул фосфолипидов. Таким образом, холестерин — стабилизатор текучести плазматической мембраны [7, с. 148]

Холестерин открывает цепь биосинтеза стероидных половых гормонов и кортикостероидов, служит основой для образования желчных кислот и

витаминов группы D, участвует в регулировании проницаемости клеток и предохраняет эритроциты крови от действия гемолитических ядов.

Чтобы лучше понять биологическую роль холестерина, следует вспомнить, что основные жидкости организма (кровь и лимфа) состоят из воды, а клетки могут сохранить свою индивидуальность только в том случае, если будут иметь надежную защиту от их проникновения.

Именно такой защитой он и является, входя в состав межклеточных мембран, обеспечивающий их жесткость и препятствующий слиянию клетки со свободно циркулирующими межклеточными жидкостями [3, с. 40]

Но не только в обеспечении строения клетки состоит биологическая роль и главное значение холестерина в организме. Он также участвует в синтезе многих гормонов, выработке витамина D, в обеспечении нервной деятельности и в работе головного мозга. Более того, считается, что огромное значение он имеет в поддержании иммунитета и в борьбе с раковыми клетками в организме.

В функции холестерина в организме входит также защита эритроцитов крови от негативного воздействия неизменно присутствующих в кровотоке гемолитических ядов. Можно смело сказать, что без этого уникального вещества нормальная жизнедеятельность клеток невозможна.

Именно по этой причине он вырабатывается сразу несколькими органами: печенью, почками, надпочечниками и половыми железами. Как правило, организм не нуждается в поставке холестерина извне и с успехом синтезирует его самостоятельно. Между тем, до 20 % этого вещества может поступать с продуктами питания. Для здорового человека с нормальным весом и обменом веществ в этом нет никакой опасности. Его синтез регулируется автоматически.

Питание косвенно связано с показателями холестерина. Учитывая особое значение холестерина для каждой клетки, можно предположить, что он поступает к ним вместе с кровотоком. Но в то же время в начале статьи

уже говорилось, что он не растворяется в воде, а значит его транспортировка кровью, состоящей в большей части именно из воды, невозможна [8, с. 99]

Холестерин нерастворим в воде и в чистом виде не может доставляться к тканям организма при помощи основанной на воде крови. Вместо этого холестерин в крови находится в виде хорошо растворимых комплексных соединений с особыми белками-транспортёрами, так называемыми аполипопротеинами. Такие комплексные соединения называются липопротеинами.

Существует несколько видов аполипопротеинов, различающихся молекулярной массой, степенью сродства к холестерину и степенью растворимости комплексного соединения с холестерином (склонностью к выпадению кристаллов холестерина в осадок и к формированию атеросклеротических бляшек). Различают следующие группы: высокомолекулярные (HDL, ЛПВП, липопротеины высокой плотности) и низкомолекулярные (LDL, ЛПНП, липопротеины низкой плотности), а также очень низкомолекулярные (VLDL, ЛПОНП, липопротеины очень низкой плотности) и хиломикрон [4, с. 78]

К периферийным тканям холестерин транспортируется хиломикроном, ЛПОНП и ЛПНП. К печени, откуда затем холестерин удаляется из организма, его транспортируют аполипопротеины группы ЛПВП [10, с. 205]

Исследования установили зависимость между содержанием различных групп липопротеинов и здоровьем человека. Большое количество ЛПНП сильно коррелирует с атеросклеротическими нарушениями в организме. По этой причине такие липопротеины часто называют «плохими». Низкомолекулярные липопротеины малорастворимы и склонны к выделению в осадок кристаллов холестерина и к формированию атеросклеротических бляшек в сосудах, тем самым повышая риск инфаркта или ишемического инсульта, а также других сердечно-сосудистых осложнений.

С другой стороны, большое содержание ЛПВП в крови характерно для здорового организма, поэтому часто эти липопротеины называют «хорошими». Высокомолекулярные липопротеины хорошо растворимы и не склонны к выделению холестерина в осадок, и тем самым защищают сосуды от атеросклеротических изменений (то есть не являются атерогенными).

Уровень холестерина в крови измеряется либо в ммоль/л (миллимоль на литр — единица, действующая в РФ) либо в мг/дл (миллиграмм на децилитр, 1 ммоль/л равен 38,665 мг/дл). Идеально, когда уровень «плохих» низкомолекулярных липопротеинов ниже 2,586 ммоль/л (для лиц с высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний — ниже 1,81 ммоль/л). Такой уровень, однако, у взрослых достигается редко. Если уровень низкомолекулярных липопротеинов выше 4,138 ммоль/л, рекомендуется использовать диету для снижения его ниже 3,362 ммоль/л. Если этот уровень выше 4,914 ммоль/л или упорно держится выше 4,138 мг/дл, рекомендуется рассмотреть возможность лекарственной терапии [12, с. 25]. Для лиц с высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний эти цифры могут снижаться. Доля «хороших» высокомолекулярных липопротеинов в общем уровне холестерин-связывающих липопротеинов чем выше, тем лучше. Хорошим показателем считается, если он гораздо выше 1/5 от общего уровня холестерин-связывающих липопротеинов.

Факторы, влияющие на повышение и понижение уровня холестерина в крови. К факторам, повышающим уровень «плохого» холестерина, относятся:

- курение; избыточный вес или ожирение, переедание;
- гиподинамия или недостаточная физическая активность;
- неправильное питание с высоким содержанием транс-жиров (содержащихся в частично гидрогенизированных жирах), высоким содержанием в пище углеводов (особенно легкоусваиваемых, вроде сладостей и кондитерских изделий), недостаточным содержанием клетчатки и

пектинов, липотропных факторов, полиненасыщенных жирных кислот, микроэлементов и витаминов;

- застой жёлчи в печени при различных нарушениях работы этого органа (также ведёт к желчнокаменному холециститу). Возникает при злоупотреблении алкоголем, некоторых вирусных заболеваниях, приёме некоторых лекарств; также некоторые эндокринные нарушения — сахарный диабет, гиперсекреция инсулина, гиперсекреция гормонов коры надпочечников, недостаточность гормонов щитовидной железы, половых гормонов [9, с. 389]

Повышенный уровень «плохого» холестерина также может наблюдаться при некоторых заболеваниях печени и почек, сопровождающихся нарушением биосинтеза «правильных» липопротеидов в этих органах. Он может также быть наследственным, наследственно обусловленным при некоторых формах так называемых «семейных дислипидопроteinемий». К факторам, снижающим уровень «плохого» холестерина, относятся физкультура, спорт и вообще регулярная физическая активность, отказ от курения и употребления алкоголя, еда, содержащая мало насыщенных животных жиров и легкоусваиваемых углеводов и богатая клетчаткой, полиненасыщенными жирными кислотами, липотропными факторами (метионином, холином, лецитином), витаминами и микроэлементами [11, с. 13]

1.2 Понятие наследственной гиперхолестеринемии и её признаки

Наследственная гиперхолестеринемия (сокращенно НГХ) - генетическая болезнь, характеризующаяся высоким уровнем холестерина в

крови, в частности, очень высоким уровнем липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), а также ранним возникновением сердечно-сосудистых заболеваний. Является относительно распространенным аутосомно-доминантным наследственным заболеванием.

Обычно, высокий уровень холестерина, особенно в молодом возрасте, не вызывает никаких симптомов [17, с. 54] Холестерин может откладываться в различных частях тела и может быть видимым снаружи, например, в желтоватых пятнах вокруг век (ксантелазма), на внешней границе радужной оболочки глаза (роговичная дуга) и в виде комков в сухожилиях рук, локтей, коленей и стоп, особенно ахилловом сухожилии (ксантома сухожилия). Изменения в системе кровообращения. Ускоренное отложение холестерина на стенках артерий приводит к атеросклерозу, который является основной причиной сердечно-сосудистых заболеваний. Самой распространенной проблемой при СГ является развитие ишемической болезни сердца (атеросклероз коронарных артерий, поставляющих сердце кровью) в более раннем возрасте, чем можно было бы ожидать в общей популяции. Это может привести к стенокардии (сжатие в груди при физической нагрузке) или сердечного приступа [20, с. 140] Реже страдают артерии головного мозга, что может привести к транзиторной ишемической атаке (короткие эпизоды слабости в одной стороне тела или неспособность говорить), а иногда к ишемическому инсульту. Периферический облитерирующий эндартериит (закупорка артерий ног) происходит в основном у людей с СГ, которые курят, что может вызвать боль в икроножных мышцах при ходьбе, и во время отдыха (перемежающаяся хромота) и проблемы связанные с уменьшением кровоснабжения ног (например гангрена).

Если липиды начали проникать в аортальный клапан (клапан сердца между левым желудочком и аортой) или восходящую аорту (непосредственно над клапаном), утолщение стенок аорты может привести к сужению прохода, что называется аортальным стенозом. Надклапанный аортальный стеноз (отвердения аорты выше уровня аортального клапана)

может проявляться более чем в половине гомозиготных пациентов, в то время как гетерозиготные реже бывают пораженными. Аортальный стеноз характеризуется одышкой, болями в груди, временными головокружениями или потерей сознания и часто симптомы напоминают стенокардию.

С возрастом увеличивается риск заболевания атеросклерозом и у тех, кто курит, имеет диабет, высокое кровяное давление и семейную историю сердечно-сосудистых заболеваний.

1.3 Формы наследственной гиперхолестеринемии.

Гетерозиготная форма наследственной гиперхолестеринемии часто остаётся невыявленной до взрослого состояния, пока не развивается сердечно-сосудистая недостаточность. У таких больных отмечаются гиперхолестеринемия, липоидная дуга на роговице, ксантелазмы или холестериновые отложения в коже, ксантомы сухожилий. К 50 годам у 50% мужчин - гетерозигот по семейной гиперхолестеринемии - развивается ишемическая болезнь сердца (на 20 лет раньше, чем у остальных людей). У женщин - гетерозигот по наследственной гиперхолестеринемии - первые признаки ишемической болезни сердца появляются на 9-10 лет раньше, чем у мужчин. Гетерозиготная форма заболевания встречается в общей европейской популяции у одного из пятисот (1:500) человек [23, с. 264]

В настоящее время идентифицировано 4 разных класса мутаций рецептора ЛПНП. В результате этих мутаций нарушается:

- 1) синтез
- 2) транспорт

3) связывание

4) кластеризация ЛПНП в клетке.

Мутации 1-го класса делают соответствующие аллели «недействительными», что выражается в полном отсутствии иммунологически обнаруживаемых рецепторов. При наличии мутантных аллелей 2-го класса нарушается транспорт любых синтезируемых рецепторов ЛПНП. Мутантные аллели 3-го класса вызывают образование функционально дефектных рецепторов, неспособных связывать ЛПНП.

При наличии мутаций в аллелях 4-го класса формируются рецепторы, во всех отношениях нормальные, кроме того, что они не могут собираться в группы (кластеризоваться) в окаймленных ямках, а это препятствует их «втягиванию» в клетку (интернализации) после связывания ЛПНП [16, с. 159] СГ, как правило, в стандартных ситуациях, лечится препаратами из группы статинов.

Статины действуют путем ингибирования фермента С-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим-А редуктазы (ГМГ-КоА-редуктазы) в печени. Одновременно в печени образуется больше ЛПНП-рецепторов, которые способствуют удалению циркулирующих ЛПНП с кровотока. Статины эффективно снижают уровень холестерина и уровень ЛПНП, хотя иногда требуется дополнительное лечение другими лекарственными препаратами, например, секвестрантами желчных кислот (холестирамином или колестиполом), препаратами никотиновой кислоты или фибратами.

Необходим контроль и за другими факторами риска сердечнососудистых заболеваний, поскольку риск остается несколько повышенным, по сравнению с общей популяцией, даже если уровень холестерина контролируется. Специалисты рекомендуют, чтобы решения приняты насчёт лечения пациентов больных СГ с помощью статинов не базировались на обычных средствах прогнозирования риска, поскольку они склонны недооценивать риск сердечнососудистых заболеваний у этой группы больных [21, с. 625]

В отличие от остального населения, СГ имеет высокий уровень холестерина от рождения, увеличивая риск возникновения болезни в семье. До введения статинов, клофибрат, пробукол (особенно в случае образования больших ксантом) и тироксин, использовались для снижения уровня холестерина-ЛПНП. Неоднозначным является использование эзетимиба, препятствующего абсорбции холестерина в кишечнике. Хотя он снижает уровень холестерина-ЛПНП, это не проявляется в улучшении маркера атеросклероза известного как утолщение комплекса интима-медиа. На сегодняшний день нет интервенционных исследований, которые бы непосредственно показывали преимущества снижения смертности от уменьшения уровня холестерина у больных СГ [13, с. 117]

Клиническая картина полной (гомозиготной) формы наследственной гиперхолестеринемии характеризуется необычно высокой гиперхолестеринемией и появлением уже в детском возрасте ксантом на коже, на сухожилиях. Появляется липоидная дуга роговицы. В период полового созревания формируются атероматозное поражение устья аорты, а также стеноз венечных артерий сердца, что проявляется систолическим шумом на аорте и ангиографически определяемым сужением корня аорты и стенозом коронарных артерий. Клинически развивается типичная картина ишемической болезни сердца [14, с. 33]

Причины гомозиготной формы заболевания сходны с этиологией гетерозиготной наследственной гиперхолестеринемии. Гомозиготная форма заболевания проявляется намного реже, и встречается у одного из миллиона (1:1000000) новорожденных.

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

Гомозиготная СГ труднее поддается лечению. ЛПНП-рецепторы функционируют минимально, если вообще действуют. Только высокие дозы

статинов, часто в сочетании с другими препаратами являются умеренно эффективными для улучшения уровня липидов. Если с помощью медикаментозной терапии не удастся снизить уровень холестерина, может быть использован аферез ЛПНП, то есть удаление ЛПНП из крови в процессе, который напоминает диализ.

В очень тяжелых случаях может рассматриваться вопрос о трансплантации печени, это обеспечит печень нормальными действующими ЛПНП-рецепторами и приведет к быстрому улучшению уровня холестерина, но тогда увеличивается риск появления осложнений от самой трансплантации (таких, как реакция отторжения трансплантата, инфекция или негативное влияние от цитостатического лечения необходимого для прекращения реакции организма на трансплантат) [18, с. 387]

Другие хирургические методы включают: частичное шунтирование подвздошной кишки, в которой часть тонкой кишки не участвует в всасывании питательных веществ, отсюда и холестерина, кроме того, порток вальный анастомоз, при котором воротную вену связывают с нижней полую вену, позволяющей крови с питательными веществами из кишечника обходить печень.

Торможение микросомального белка трансфера триглицеридов, например, с помощью препарата AEGR-733, который на сегодня исследуется и вливания рекомбинантного человеческого белка аполипопротеина А1 исследуемого как вариант лечения. Генная терапия, предположительно, является будущей альтернативой в лечении [15, с. 63]

1.4 Генетические мутации, ассоциированные с возникновением наследственной гиперхолестеринемии

Мутации - это внезапные стойкие скачкообразные изменения в структуре генов.

Генные (точковые) мутации затрагивают, как правило, один или несколько нуклеотидов, при этом один нуклеотид может превратиться в другой, может выпасть (делеция), продублироваться, а группа нуклеотидов может развернуться на 180 градусов [19, с. 568] Например, широко известен ген человека, ответственный за серповидно - клеточную анемию, который может привести к летальному исходу. Соответствующий нормальный ген кодирует одну из полипептидных цепей гемоглобина. У мутантного гена нарушен всего один нуклеотид (ГАА на ГУА).

В результате в цепи гемоглобина одна аминокислота заменена на другую (вместо глутамина - валин). Казалось бы, ничтожное изменение, но оно влечет за собой роковые последствия: эритроцит деформируется, приобретая серповидно - клеточную форму, и уже не способен транспортировать кислород, что и приводит к гибели организма. Генные мутации приводят к изменению аминокислотной последовательности белка.

Наиболее вероятное мутация генов происходит при спаривание тесно связанных организмов, которые унаследовали мутантный ген у общего предка. По этой причине вероятность возникновения мутации повышается у детей, чьи родители являются родственниками [22, с. 485] Генные мутации приводят к таким заболеваниям, как амавротическая идиотия, альбинизм, дальтонизм и др. Интересно, что значимость нуклеотидных мутаций внутри кодона неравнозначна: замена первого и второго нуклеотида всегда приводит к изменению аминокислоты, третий же обычно не приводит к замене белка.

К примеру, «Молчащая мутация» - изменение нуклеотидной последовательности, которая приводит к образованию схожего кодона, в результате аминокислотная последовательность белка не меняется.

Хромосомные мутации. Хромосомные мутации приводят к изменению числа, размеров и организации хромосом, поэтому их иногда называют хромосомными перестройками. Хромосомные перестройки делятся на внутри - и межхромосомные.

К внутрехромосмным относятся:

Дубликация - один из участков хромосомы представлен более одного раза.

Делеция - утрачивается внутренний участок хромосомы.

Инверсия - повороты участка хромосомы на 180 градусов.

Межхромосомные перестройки (их еще называют транслокации) делятся на:

Реципрокные - обмен участками негомологичных хромосом.

Нереципрокные - изменение положения участка хромосомы.

Дицентрические - слияние фрагментов негомологичных хромосом.

Центрические - слияние центромер негомологичных хромосом.

Хромосомные мутации проявляются у 1% новорожденных [24, с. 7] Однако интересно, исследования показали, что нестабильность соматических клеток здоровых доноров не исключение, а норма. В связи с этим была высказана гипотеза о том, что нестабильность соматических клеток следует рассматривать не только как патологическое состояние, но и как адаптивную реакцию организма на измененные условия внутренней среды. Хромосомные мутации могут обладать фенотипическими явлениями. Наиболее распространенный пример – синдром «Кошачьего крика» (плачь ребенка напоминает мяуканье кошки). Обычно носители такой делеции погибают в младенчестве. Хромосомные мутации часто приводят к патологическим нарушениям в организме, но в то же время хромосомные перестройки сыграли одну из ведущих ролей в эволюции. Так, у человека 23 пары

хромосом, а у обезьяны - 24. Таким образом различие составляет всего одна хромосома. Ученые предполагают, что в процессе эволюции произошла хотя бы одна перестройка. Подтверждением этого может служить и тот факт, что 17 хромосома человека отличается от такой же хромосомы шимпанзе лишь одной перцентрической инверсией. Такие рассуждения во многом подтверждают теорию Дарвина.

Геномные мутации. Главная отличительная черта геномных мутаций связана с нарушением числа хромосом в кариотипе. Эти мутации так же подразделяются на два вида: полиплоидные анеуплоидные. Полиплоидные мутации ведут к изменению хромосом в кариотипе, которое кратно гаплоидному набору хромосом. Этот синдром впервые был лишь обнаружен в 60-ых годах. Вообще полиплоидия характерна в основном для человека, а среди животных встречается крайне редко. При полиплоидии число хромосом в клетке насчитывается по 69 (триплоидия), а иногда и по 92 (тетраплоидия) хромосомы [28, с. 6] Такое изменение ведет практически к 100% смерти зародыша

Триплоидия имеет не только многочисленные пороки, но и приводит к потере жизнеспособности. Тетраплоидия встречается еще реже, но так же зачастую приводит к летальному исходу. Анеуплоидные же мутации приводят к изменению числа хромосом в кариотипе, некротное гаплоидному набору. В результате такой мутации возникают особи с аномальным числом хромосом. Как и триплоидия, анеуплоидия часто приводит к смерти еще на ранних этапах развития зародыша. Причиной же таких последствий является утрата целой группы сцепления генов в кариотипе. В целом же, механизм возникновения геномных мутаций связан с патологией нарушения нормального расхождения хромосом в мейозе, в результате чего образуются аномальные гаметы, что и ведет к мутации. Изменения в организме связаны с присутствием генетически разнородных клеток. Такой процесс называется мозаицизм.

Геномные мутации одни из самых страшных. Они ведут к таким заболеваниям, как синдром Дауна (трисомия, возникает с частотой 1 больной на 600 новорожденных), синдром Клайнфельтера и др.

Спонтанные мутации. Мутации, помимо качественных свойств, характеризует и способ возникновения. Спонтанные (случайные) - мутации, возникающие при нормальных условиях жизни. Спонтанный процесс зависит от внешних и внутренних факторов (биологические, химические, физические). Спонтанные мутации возникают у человека в соматических и генеративных тканях. Метод определения спонтанных мутаций основан на том, что у детей появляется доминантный признак, хотя у его родителей он отсутствует. Проведенное в Дании исследование показали, что примерно одна из 24000 гамет несет в себе доминантную мутацию. Ученый же Холдейн рассчитал среднюю вероятность появления спонтанных мутаций, которая оказалась равна $5 \cdot 10^{-5}$ за поколение. Другой ученый Курт Браун предложил прямой метод оценки таких мутаций, а именно: число мутаций разделить на удвоенное количество обследованных индивидов.

Индукцированные мутации. Индуцированный мутагенез - это искусственное получение мутаций с помощью мутагенов различной природы.

Известно, что возникновение заболевания связано с мутациями в генах ЛПНП-рецептора (LDLR), аполипопротеина Б (APOB), пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9), адаптерного белка первого типа ЛПНП-рецептора (LDLRAP1). Поэтому представляется важным выявить мутации этих генов для постановки правильного диагноза. По данным исследования эффективности генетического скрининга в Нидерландах (на 2004 год) своевременная диагностика позволила сэкономить 8700 евро на человека в год. Согласно отчету Стенфордского Центра наследственных сердечно-сосудистых заболеваний (сентябрь 2013) своевременная диагностика значительно сокращает смертность в общей популяции.

ЛПНП-рецептор (LDLR). В LDLR ген содержит инструкции по созданию белков, называемого липопротеин низкой плотности рецептор. Этот рецептор связывает частицы, называемые липопротеины низкой плотности (ЛПНП), которые являются основными переносчиками холестерина в крови. Холестерин-это воскообразное, жироподобные вещества, которое вырабатывается в организме и поступает из продуктов, которые приходят от животных. Липопротеин низкой плотности рецепторов сидеть на наружной поверхности многих типов клеток, где они подбирают липопротеидов низкой плотности, циркулирующие в крови и их транспорта в клетку. Оказавшись внутри клетки, липопротеинов низкой плотности разбивается выпустить холестерина. Холестерин затем используется клеткой, хранятся или удаляются из организма. После липопротеинов низкой плотности рецепторов довести свой груз, они снова возвращают в ячейку поверхности, чтобы подобрать более липопротеидов низкой плотности. Липопротеин низкой плотности рецепторов играют важную роль в регуляции количества холестерина в крови. Особенно часто они встречаются в печени, которая является органом, отвечающим за удаление наиболее избытка холестерина из организма. Количество липопротеинов низкой плотности рецепторов на поверхности клеток печени определяет, насколько быстро холестерина (в виде липопротеидов низкой плотности) удаляется из кровотока [25, с. 107]

1.5 Мутации в генах LDLR, apoB, PCSK9, LDLRAP1

Мутации в гене LDLR могут вызвать наследуемый виде высокого уровня холестерина называемой семейной гиперхолестеринемией. Более 1000 были обнаружены мутации в этом гене. Некоторые из этих генетических изменений уменьшает количество липопротеинов низкой плотности рецепторов, произведенных в клетках. Другие мутации нарушают способность приемного устройства для удаления липопротеидов низкой плотности из крови. В результате, люди с мутациями в гене LDLR Гена имеют очень высокий уровень холестерина в крови. Как избыток холестерина циркулирует в крови, он откладывается в тканях аномально, таких как кожа, сухожилия и артерии, которые снабжают кровью сердце (коронарные артерии). Накопление холестерина в стенках коронарных артерий существенно увеличивает риск возникновения инфаркта миокарда. Большинство людей с семейной гиперхолестеринемией наследовать один измененный копию LDLR Гена от пораженного родителя и один нормальный аллель Гена от второго родителя [26, с. 168] Эти случаи связаны с увеличенным риском ранней болезни сердца, обычно начало в человеке сороковых или пятидесятих. Редко, человек с семейной гиперхолестеринемией рождается с двумя мутировавшими копиями LDLR Гена. Такая ситуация возникает, когда человек имеет два пострадавших родителей, каждый из которых проходит на одной измененной копии Гена. Наличие двух LDLR мутации результатов в более тяжелой форме гиперхолестеринемии, которая обычно появляется в детстве.

Аполипопротеин В (apoB, англ. apolipoprotein B, apoB) — единственный аполипопротеин липопротеинов низкой плотности, носитель «плохого холестерина», вызывающего накопление холестерина в стенках кровеносных сосудов. АпоВ является также основным

аполипопротеином хиломикрон, липопротеинов очень низкой плотности и их остатков. АпоВ является лигандом для ЛПНП-рецептора, что важно для деградации липопротеинов низкой плотности в печени. Однако, накопление апоВ в крови приводит к развитию атеросклероза. Концентрация апоВ в крови является даже более достоверным индикатором риска атеросклероза, чем общий холестерин или холестерин ЛПНП.

В организме синтезируется две изоформы апоВ: апоВ-100 и апоВ-48. АпоВ-100 синтезируется в печени и соответствует полному 100% гену АПОВ. В кишечнике, однако, синтезируется изоформа, соответствующая лишь половине (точнее около 48% — отсюда и название) гена АПОВ — апоВ-48. АпоВ-100 — белок, состоящий из 4536 аминокислот с молекулярной массой 512 кДа и является одним из самых больших белков организма. АпоВ-48 примерно в 2 раза меньше. Обе изоформы апоВ очень гидрофобны и глубоко погружены в липидный слой липопротеина, не растворимы в воде и без липида не существуют. АпоВ-48 является компонентом липопротеинов кишечного происхождения — хиломикронов и остатков хиломикронов. Так как апоВ-48 не содержит участка, распознающегося ЛПНП-рецептором, эти частицы деградируют за счёт апоЕ, другого лиганда данного рецептора. АпоВ-100 — компонент липопротеинов печёночного происхождения — ЛПОНП, ЛППП и ЛПНП. АпоВ-100 определяет захват и последующую деградацию ЛПНП печенью [29, с. 108]

Пропотеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9, или PCSK9 (англ. proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) — фермент-гидролаза, продукт гена человека PCSK9. Относится к семейству пропротеиновых конвертаз, которые активируют ферменты, отщепляя от них пептид, ингибирующий их каталитическую активность. PCSK9 играет важную роль в гомеостазе холестерина и является важной потенциальной мишенью для агентов, снижающих уровень холестерина липопротеинов низкой плотности в крови.

Пропроотеиновая конвертаза относится к подсемейству протеиназ К семейства секреторных субтилаз. Белок синтезируется в виде растворимого неактивного зимогена, который аутокаталитически (самопроизвольно) активируется во время внутримолекулярного процессинга в эндоплазматическом ретикулуме и действует как пропротеиновая конвертаза [27, с. 347]

PCSK9 играет важную регуляторную роль в гомеостазе холестерина. Связывание PCSK9 с EGF-A доменом рецептора липопротеинов низкой плотности приводит к деградации рецептора. Снижение уровня рецептора липопротеинов низкой плотности, в свою очередь, вызывает пониженный метаболизм липопротеинов низкой плотности, что может привести к гиперхолестеринемии.

Кроме этого PCSK9 играет роль в дифференциации кортикальных нейронов.

Некоторые мутации гена PCSK9 могут приводить как к снижению, так и к увеличению холестерина крови. Мутации, которые нарушают связывание PCSK9 с LDLR, приводят к увеличению эффективности работы рецептора и, как следствие этого, к понижению концентрации холестерина в крови. У таких носителей наблюдается пониженный холестерин липопротеинов низкой плотности и снижение риска инфаркта миокарда.

Адаптерный белок первого типа ЛПНП-рецептора (LDLRAP1).

В LDLRAP1 белок взаимодействует с белком и называется липопротеин низкой плотности рецептор. Этот тип рецептора связывает частицы, называемые липопротеины низкой плотности (ЛПНП), которые являются основными переносчиками холестерина в крови. Рецепторы находятся на наружной поверхности клетки, где они подбирают липопротеидов низкой плотности, циркулирующие в кровотоке. В LDLRAP1 появляется белок, который играет решающую роль в продвижении этих рецепторов вместе с их прикрепленными липопротеидов низкой плотности, от клеточной поверхности внутрь клетки. Оказавшись внутри клетки,

липопротеины низкой плотности выпускают холестерин. Холестерин затем используется клеткой, хранится или удаляется из организма [29, с. 986]

Более 10 мутаций в LDLRAP1 гена было показано, что форма унаследовала высокий уровень холестерина называют аутосомно-рецессивная гиперхолестеринемия. Эти мутации приводят к продукции аномально мелких, нефункциональных версия LDLRAP1 белка или предотвратить клетки от каких-либо этого белка. Без LDLRAP1 белка, липопротеинов низкой плотности рецепторов не смогли удаления липопротеидов низкой плотности из кровотока эффективно. Хотя рецепторы можно еще привязать нормально к липопротеины низкой плотности, эти молекулы не правильно транспортируется в клетки (особенно клетки печени). В результате, множество дополнительных липопротеидов низкой плотности остаются в крови.

Потому что липопротеины низкой плотности являются основными переносчиками холестерина в крови, люди с мутациями в LDLRAP1 Гена имеют очень высокий уровень в крови холестерина. Как избыток холестерина циркулирует в крови, он откладывается в тканях аномально, таких как кожа, сухожилия и артерии, которые снабжают кровью сердце (коронарные артерии). Накопление холестерина в стенках коронарных артерий существенно увеличивает риск возникновения инфаркта миокарда.

1.6 Метод ПЦР при определении генов, расположенных к развитию СГХ

Подбор праймеров. Начальным этапом при подготовке постановки полимеразной цепной реакции является подбор праймеров к определенному

гену, для успешной реализации которого необходим опыт работы с информационными базами данных, нуклеотидными последовательностями и владение основами методики подбора праймеров [26, с.169]. Наряду с подбором праймеров к целевым генам необходимо выбрать контрольный ген и праймеры к нему. В качестве контроля рекомендуется использовать ген или гены «домашнего хозяйства» (конститутивный ген), экспрессия которых является относительно постоянной вне зависимости от внешних условий, что позволит исследователю оценить изменение экспрессии целевых генов [20, с. 140]. Несомненно, процедуру по подбору праймеров начинающий исследователь может доверить профессионалу или, еще проще, найти готовые последовательности в научной статье. Однако в последнем случае никто не может гарантировать достоверность и правильность опубликованных в статье последовательностей праймеров. Значительно упростить положение позволит освоение некоторых начальных подходов биоинформатики, не требующих финансовых вложений и особых навыков работы с компьютером.

Для поиска последовательностей генов, к которым необходимо подобрать праймеры, удобно использовать биоинформационную базу данных NCBI. NCBI (National Center for Biotechnological Information, USA) – национальный центр биотехнологической информации, в числе прочего предоставляет сведения о структуре генома живых организмов – о нуклеотидных и аминокислотных последовательностях. Для подбора праймеров и условий проведения ПЦР с ними использовали программу «Vector NTI 10». Для поиска праймеров для нескольких последовательностей генов использовали компонент программы «Vector NTI 10» – AlignX.

Синтез праймеров на синтезаторе ДНК. Синтез праймеров осуществляется на автоматических синтезаторах и не представляет собой технической сложности.

Очистка праймеров для ПЦР. Очистка праймеров осуществляется с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле (100 мл: 42 г

мочевины (7М), 10 мл десятикратного TBE буфера, 37.5 мл 40% акриламида/2% бисакриламида, 330 мкл 10% раствора персульфата аммония, 50 мкл TEMED). TBE-буфер: 89 мМ Tris, 89 мМ борной кислоты, 2 мМ ЭДТА-Na, pH 8.0. Полосу, соответствующую олигонуклеотиду, вырезают из геля и элюируют 1 мл 12% водного перхлората натрия в течение ночи. После центрифугирования (3000 об/мин, 5 мин), супернатант отбирают и добавляют к нему 9 объемов ацетона. Инкубируют 20 мин при комнатной температуре, центрифугируют (3000 об/мин, 10 мин), промывают осадок 96% этанолом и высушивают. Осадок растворяют в 200 мкл деионизированной воды, центрифугируют 10 мин (14000 об/мин). Супернатант переносят в новую пробирку. Концентрацию выделенных праймеров измеряют на спектрофотометре при длине волны 260 нм.

Реакционная смесь для ПЦР. Праймеры - пара искусственно синтезированных олигонуклеотидов, имеющих, как правило, размер от 15 до 30 п. н., идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. [17, с. 54] Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы.

Taq-полимераза - термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности [25, с. 110]

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) - дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфат (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфат (дТТФ) - "строительный материал", используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК [29, с. 90]

Буфер - смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH [19, с. 568]

Анализируемый образец - подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, служащую мишенью для последующего многократного копирования (например, ДНК микроорганизмов). При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется [28, с. 6]

2 Материалы и методы

Методом исследования являются выделение из целого объекта отдельных его составляющих (свойств, признаков, функций и т.п.) для получения максимальной информации о нем:

Библиотеки:

1. Ульяновская областная научная библиотека им. В.И. Ленина. Ульяновск, Карамзина пер., 3/2.

2. Библиотека Ульяновского государственного педагогического университета. Ульяновск, Площадь 100-летия со дня рождения В. И. Ленина, 4

3. Библиотека №10. Ульяновск, ул. Минина, 25

4. Библиотека №12. Ульяновск, Заводской пр-д, 27а

Электронные сайты:

1. <http://elibrary.ru/item.asp?id=17684272>

2. <http://cyberleninka.ru/article/n/sposoby-deteksii-rezultatov-polimeraznoy-tsepnoy-reaktsii-v-rezhime-realnogo-vremeni>

3. <http://cyberleninka.ru/article/n/uroven-pcsk9-v-semyah-patsientov-s-semeynoy-giperholesterinemiye>

4. <http://cyberleninka.ru/article/n/semeynaya-giperholesterinemiya-skrining-dagnostika-i-lechenie-detey-i-vzroslyh-patsientov-klinicheskoe-rukovodstvo-podgotovlennoe>
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27264249>
6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27250613>

3 Результаты и их обсуждение

3.1 Генетические дефекты, ассоциированные с возникновением наследственной гиперхолестеринемии

На основе литературных данных были проанализированы генетические мутации, ассоциированные с возникновением наследственной гиперхолестеринемии:

- генные (точковые) мутации затрагивают, как правило, один или несколько нуклеотидов, при этом один нуклеотид может превратиться в другой, может выпасть (делеция);
 - хромосомные мутации приводят к изменению числа, размеров и организации хромосом (дубликация);
 - инверсия (повороты участка хромосомы на 180 градусов);
 - реципрокные мутации (обмен участками негомологичных хромосом);
 - центрические - слияние центромер негомологичных хромосом.
- Хромосомные мутации, ассоциированные с семейной гиперхолестеринемией проявляются у 1% новорожденных [24, с. 7];

- геномные мутации приводят к изменению числа хромосом в кариотипе, некротное гаплоидному набору (анеуплоидные мутации)

3.2 Нуклеотидный состав генов предрасположенности к развитию семейной гиперхолестеринемии

Используя литературные данные, был проанализирован нуклеотидный состав генов предрасположенности к развитию семейной гиперхолестеринемии:

- LDLR - люди с мутациями в данном гене имеют очень высокий уровень холестерина в крови. Так как избыток холестерина циркулирует в крови, он откладывается в тканях аномально, таких как кожа, сухожилия и артерии, которые снабжают кровью сердце (коронарные артерии). Накопление холестерина в стенках коронарных артерий существенно увеличивает риск возникновения инфаркта миокарда. Большинство людей с семейной гиперхолестеринемией наследовать один измененный копию LDLR-гена от пораженного родителя и один нормальный аллель гена от второго родителя. Наличие двух LDLR мутации результатов в более тяжелой форме гиперхолестеринемии, которая обычно появляется в детстве.

- LDLRAP 1 - адаптерный белок первого типа ЛПНП-рецептора, этот тип рецептора связывает частицы, называемые липопротеины низкой плотности (ЛПНП), которые являются основными переносчиками холестерина в крови.

- apoB - единственный аполипопротеин липопротеинов низкой плотности, носитель «плохого холестерина», вызывающего накопление холестерина в стенках кровеносных сосудов. ApoB является

также основным аполипопротеином хиломикрон, липопротеинов очень низкой плотности и их остатков.

- PCSK9 - пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа — фермент-гидролаза. PCSK9 играет важную роль в гомеостазе холестерина и является важной потенциальной мишенью для агентов, снижающих уровень холестерина липопротеинов низкой плотности в крови.

3.3. Определение генов, расположенных к развитию семейной гиперхолестеринемии методами полимеразно-цепной реакции.

На основе литературных данных были проанализированы основные пункты постановки метода ПЦР при определении генов, расположенных к развитию СГХ:

- подбор праймеров - для поиска последовательностей генов, к которым необходимо подобрать праймеры, удобно использовать биоинформационную базу данных NCBI. NCBI (National Center for Biotechnological Information, USA) – национальный центр биотехнологической информации, в числе прочего предоставляет сведения о структуре генома живых организмов – о нуклеотидных аминокислотных последовательностях;

- синтез праймеров на синтезаторе днк – синтез праймеров выполняет автоматический синтезатор днк;

- очистка праймеров - осуществляется с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле (100 мл: 42 г мочевины (7М), 10 мл десятикратного TBE буфера, 37.5 мл 40% акриламида/2% бисакриламида, 330 мкл 10% раствора персульфата аммония, 50 мкл TEMED). TBE-буфер: 89 mM Tris, 89 mM борной кислоты, 2 mM ЭДТА-Na, pH 8.0. Полосу, соответствующую

олигонуклеотиду, вырезают из геля и элюируют 1 мл 12% водного перхлората натрия в течение ночи. После центрифугирования (3000 об/мин, 5 мин), супернатант отбирают и добавляют к нему 9 объемов ацетона. Инкубируют 20 мин при комнатной температуре, центрифугируют (3000 об/мин, 10 мин), промывают осадок 96% этанолом и высушивают. Осадок растворяют в 200 мкл деионизированной воды, центрифугируют 10 мин (14000 об/мин). Супернатант переносят в новую пробирку. Концентрацию выделенных праймеров измеряют на спектрофотометре при длине волны 260 нм.

- реакционная смесь для ПЦР: праймеры - пара искусственно синтезированных олигонуклеотидов, имеющих, как правило, размер от 15 до 30 п. н., идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации [17, с. 54]

Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы; taq-полимераза - термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности [25, с.110]; смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) - дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфат (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфат (дТТФ) - "строительный материал", используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК [29, с. 90]; буфер - смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH [19, с. 568]; анализируемый образец - подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, служащую мишенью для последующего многократного копирования (например, ДНК микроорганизмов) [28, с. 6]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе литературных данных было проанализировано и установлено, что наиболее частыми генетическими мутациями, ассоциированными с возникновением наследственной гиперхолестеринемии являются:

- генные мутации (делеция);
- хромосомные мутации (дубликация);
- инверсия;
- реципрокные мутации;
- центрические;
- геномные мутации (анеуплоидные мутации)

Используя литературные данные, был проанализирован и установлен нуклеотидный состав генов предрасположенности к развитию семейной гиперхолестеринемии: LDLR (липопротеины низкой плотности), LDLRAP1 (адаптерный белок первого типа ЛПНП-рецептора), apoB (аполипопротеин липопротеинов низкой плотности), PCSK9 (пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа — фермент-гидролаза)

На основе литературных данных были проанализированы и установлены основные пункты постановки метода ПЦР при определении генов, расположенных к развитию СГХ:

- подбор праймеров;
- синтез праймеров на синтезаторе днк;
- очистка праймеров;
- реакционная смесь для ПЦР: праймеры, taq-полимераза, смесь дНТФ, дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ, буфер и анализируемый образец, который содержит искомую ДНК.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Буценко, М.Т. Изучение рециркуляции холестерина / М.Т. Буценко – Москва: МГУ, 2006. – 207-210 с.
2. Вуликов, В.А. Концепция транспорта холестерина / В.А. Вуликов – Витебск: ВГМУ, 2007. – 58-67 с.
3. Дюримин, Я.Л. Физиология обмена холестерина / Я.Л. Дюримин – Сибирь: АМН, 2012. – 39-42 с.
4. Коски, Т.Г. Биологическое действие оксидов холестерина / Т.Г. Коски – Москва: МГУ, 2004. – 78 с.
5. Корнева, В.А. Семейная гиперхолестеринемия, обусловленная новой мутацией гена рецептора липопротеинов низкой плотности // Клиническая медицина. 2014. №7. С.146.
6. Липовецкий, Б. М. Гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия в Санкт-Петербурге вследствие дефекта гена рецептора липопротеидов низкой плотности / Б.М. Липовецкий – Санкт-Петербург: ВСП, 2005.-178 с.
7. Мерасименко, В.В. Холестерин в организме человека / В.В. Мерасименко – Оренбург: ГАУ, 2005. – 148 с.
8. Рыбакова, Г.В. Холестерин и его влияние на организм / Г.В. Рыбакова – Нижний Новгород: НГИЭИ, 2011. – 176-201 с.
9. Теплова, Л.В. Ревматические проявления семейной гиперхолестеринемии / Л.В. Теплова – Новосибирск: ВСП, 2012. – 389 с.
10. Шабарова, Н.А. Семейная гиперхолестеринемия // Клиническая медицина. 2013. №5. С.205.
11. Атеросклероз и дислипидемия: российская научно-исследовательская программа по своевременной диагностике и лечению больных семейной гиперхолестеринемией: обоснование и дизайн российского регистра семейной гиперхолестеринемии: учебник / Сафарова

М. С., Сергиенко И. В., Ежов М. В., Семенова А. Е., Качковский М. А., Шапошник И. И., Гуревич В. С., Воевода М. И., Никитин Ю. П., Кухарчук В. В., Карпов Ю. А; под общ. ред. Проф. Сафаровой М.С. Москва: МГУ, 2014. 13 с.

12. Диагностика семейной гиперхолестеринемии у детей в семьях сотягощенной наследственностью: учебник / Ф.М. Захарова, В.И. Голубков, Б.М. Липовецкий, В.О. Константинов, М.Ю. Манделъштам, В.Б. Васильев; под общ. ред. проф. Б.М. Липовецкого. Воронеж: ВСП, 2005. 25 с.

13. Уровень PCSK9 в семьях пациентов с семейной гиперхолестеринемией: учебник / А.Н. Мешков, М.В. Калинина, А.И. Ершова, Е.И. Косенков, Н.В. Щербакова, Т.А. Рожкова, В.П. Масенко, В.В. Кухарчук, С.А. Бойцов; под общ. ред. проф. А.Н. Мешкова. Москва: МГУ, 2012. 117 с.

14. Boldberg A. C. Familial hypercholesterolemia: screening, diagnosis and treatment of children and adult patients: clinical guidance prepared by the panel on familial hypercholesterolemia at the National lipid Association of the United States / Boldberg A. C., Hopkins P. N., Toth P. P., Ballantyne C. M., Rader D. J., Robinson J. G., Ito M. K., McGowan M. P., Moriarty P. M., Cromwell W. C., Ross J. L., Ziajka P. E. // *Atherosclerosis and dyslipidemia.*- 2012. №1. – P.33.

15. Canna C. Homozygous familial hypercholesterolemia in childhood: Genotype-phenotype description, established therapies and perspectives. / Canna C., Stéphane X., Revencu N., Smets F., Sassolas A., Di Filippo M., Descamps O.S., Sokal E.M. // *Atherosclerosis.* - 2016. - Vol. 247. - P. 63-35.

16. Dage M.M., Bell D.A., Hooper A.J., Watts G.F., Burnett J.R. Lipoprotein apheresis and new therapies for severe familial hypercholesterolemia in adults and children. - *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*- 2014. - Vol. 387. - P. 387- 403.

17. Esharifi M., Rakhit R.D., Humphries S.E., Nair D. / Cardiovascular risk stratification in familial hypercholesterolaemia. - *Heart.* 2016, - P.54.

18. Henry C.A., Clinical efficacy and safety of evolocumab for low-density lipoprotein cholesterol reduction. / Lyon R.A., Ling H.Henry C.A. // Vasc Health Risk Manag. - 2016. - Vol. 163. - P. 387.
19. 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. 568.
20. Kyrankiewicz U., Comprehensive MRI for the detection of subtle alterations in diastolic cardiac function in apoE/LDLR-/- mice with advanced atherosclerosis / Kyrankiewicz U., Skorka T., Orzylowska A., Jablonska M., Jasinski K., Jaształ A., Bar A., Kostogrys R., Chlopicki S.// NMR Biomed.- 2016. - Vol.325. - P. 140-142.
21. Kross J.J. Rapid Communication: Cholesterol deficiency-associated APOB mutation impacts lipid metabolism in Holstein calves and breeding bulls / Schwinn A.C, Schmitz-Hsu F, Menzi F, Drögemüller C, Albrecht C, Bruckmaier R.M., Kross J.J // J Anim Sci.- 2016. - Vol.94. - P. 625.
22. Lafarova M., Kullo I. My Approach to the Patient With Familial Hypercholesterolemia // World health report. – 2008. - №1. – P. 484-486.
23. Mo A. S., Mozaffarian D., Roger V. L. et al. Heart disease and stroke statistics // American Heart Association. Circulation. – 2014. - №2. – P. 264.
24. Mshanova S., Konradi A., Karpov Y. With Familial Hypercholesterolemia // Journal of cardiology. – 2012. - №5. – P. 7.
25. Müller-Wieland D., Marx N. Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolaemia: implications for clinical management // Medical journal. – 2009. - №7. – P. 105-112.
26. Nunt S., Williams R. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics // Journal of cardiology. - 2003. - №2. – P.168.
27. Nersmissen J., Oosterveer D., Yazdanpanah M. Efficacy of statins in familial hypercholesterolaemia: a long term cohort study // BMJ. - 2008. - № 337. – P.347.

28. Zakharova F., Damgaard D., Mandelshtam M., Golubkov V., Nissen P., Nilson G., Stenderup A., Lipovetsky B., Konstantinov V., Denisenko A., Vasilyev V., Faergeman O. Familial hypercholesterolemia in St.Petersburg: the known and novel mutations found in the low density lipoprotein receptor gene in Russia // BMC Med. Genet. – 2005. – № 6. – P.6.
29. Zustin M., Hutter C., Zimmern R. , Humphries S. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review // Am J Epidemiol. – 2004. - №1. – P.108.