УНИВЕРЗИТЕТ „ ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ “- ШТИП
Факултет за медицински науки – Висока здравствена школа
Втор циклус на студии

Специјалистички студии – Специјализација за хемиско-биохемиска лабораторија

Атанасовски Влатко

Молекуларно-дијагностички методи, ризици и превенција на фамилијарната хиперхолестеролемија

СПЕЦИЈАЛИСТИЧКИ ТРУД

Штип , 2013 год.

Атанасовски Влатко

Молекуларно-дијагностички методи, ризици и превенција на фамилијарната хиперхолестеролемија

Универзитет “Гоце Делчев”- Штип

Комисија за оцена и одбрана:

Ментор : Доц. д-р. Невенка Величкова

Факултет за медицински науки – Висока здравствена школа

Претседател: Проф. д-р Билјана Ѓорѓеска

Член: Доц. д-р Невенка Велчкова

Член: Доц. д-р Татјана Рушковска

Благодарност

Сакам искрено и длабоко да & се заблагодарам на мојата професорка и менторка доц. д-р Невенка Величкова, за нејзината помош и нејзините совети кои многу ми помогнаа во изработката на овој специјалистички труд.

Ви благодарам!

Наслов

Молекуларно-дијагностички методи, ризици и превенција на фамилијарната хиперхолестеролемија

Апстракт

Фамилијарната хиперхолестеролемија (FH – Familiar Hypercholesterolemia) претставува генетичко заболување на организмот предизвикана најчесто од мутација во генот за рецепторот за липопротеини со мала густина (LDLR) и аполипопротеин Б генот (apoB). Претставува наследно заболување и како такво се карактеризира со покачени количества на вкупен холестерол и LDL – холестерол, како резултат на присуство на дисфункционални рецептори за LDL – холестерол или недостаток од рецептори за LDL- холестерол во црниот дроб со кои организмот, поточно црниот дроб, би го чистел LDL – холестеролот од циркулацијата во организмот. Пациентите со оваа болест се со голем ризик на многу млада возраст да развијат кардиоваскуларна, цереброваскуларна или периферна васкуларна болест како резултат на атероматозни промени во крвните садови, а со тоа и голем ризик од фатален исход доколку состојбата не се открие и третира соодветно.

Во овој истражувачки труд се користени резултатите од лабораториски испитувања од амбулантскиот дневник на ПЗУ ДЛ „Павлина” – Виница, во временски период од две години 2010-2011 година. Трудот има за цел да ја прикаже преваленцата и ризикот од појава на можна хиперхолестеролемија, дефинирана по пол и возраст.

Според анализираните резултати, заклучивме дека кај машката популација најмногу пациенти со високи концентрации на холестерол има во возрасната група од 40 до 60 години, додека кај женскиот пол во возрасната групата на жени над 60 години има најмногу пациенти со покачени концентрации на холестерол. Утврдено е и генерациска врска, т.е. покачени концентрации на холестерол во две генерации во една фамилија.

Фамилијарната хиперхолестеролемија е болест која е проценето дека е присутна кај најмалку 250 милиони луѓе во светот и е од особена важност нејзината брза и рана детекција. Тоа се прави со помош на клиничко лабораториски методи и критериуми и молекуларно-дијагностички методи за откривање на генетската причина за појава на оваа болест. Со тоа на пациентите им се овозможува соодветен третман и продолжување на животниот век кај истите.

Клучни зборови: атеросклероза, кардиоваскуларна болест, цереброваскуларна болест, периферна васкуларна болест, скрининг, LDL- холестерол, вкупен холестерол.

Title

Molecular diagnostic methods, risk and prevention of familial hypercholeterolemia

Abstract

Familial Hypercholesterolemia (FH) represents a genetic disorder of the organisam , mostly induced by mutation of the gene for the receptor for low density lipoproteins (LDLR) and the gene for apolipoprotein B (apoB). FH is inherited disease and as such is characterized by elevated quantity of total cholesterol and LDL- cholesterol, as a result of the presence of dysfunctional receptors for LDL-cholesterol or deficiency of receptors for LDL-cholesterol in the liver, with which the liver will cleanse the LDL-cholesterol from the blood while it circulates in the organisam. Patients with this disease have a high risk of developing cardiovascular, cerebrovascular or peripheral vascular disease as a result of atheromatous changes in the blood vessels and with that they have a very high risk of fatality if the condition is not detected and treated accordingly.

In this specialized labor are used the results from the laboratory testing of the clinical register from PHI DL – “Pavlina” – Vinica, in the time span of 2 years (2010-2011). The purpose of this specialized labor is to show the prevalence and the risk of appearance of possible hypercholesterolemia defined by gender and age.

According to the analyzed results, we have concluded that in the male population most of the patients with high concentration of cholesterol are in the age group between 40 and 60, while in the female population most cases of elevated concentration of cholesterol are in the age group over 60. It has been established a generation link i.e. elevated concentration of cholesterol appearing in two generations in one family.

Familial hypercholesterolemia is a disease which is estimated that 250 million people are affected by it and it is of primary importance to be detected and treated accordingly in its early stages. It is done with help of clinical laboratory methods and criteria, and molecular diagnostic methods for detection of the gentic reason for the appearance of this disease. This makes it possible for patients to undergo appropriate treatment and extention of their life span.

Key words: atherosclerosys, cardiovascular disease, cerebrovascular disease, peripheral vascular disease, screening, LDL-cholesterol, total cholesterol.

Содржина

1. Вовед (Introduction)----------8

1.1. Фамилијарна хиперхолестеролемија----------10

1.1.1. Историја на фамилијарната хиперхолестеролемија----------10

1.2. Општи карактеристики на холестеролот и негов транспорт во организмот----------11

1.3. Атеросклероза и улога на липопротеините во атеросклерозата------14

1.4. Генетичка основа на фамилијарната хиперхолестеролемија ---------18

1.5. Молекуларни патишта на фамилијарната хиперхолестеролемија---21

1.6. Ризици кај фамилијарна хиперхолестеролемија----------22

1.7. Молекуларно-дијагностички методи за идентификација на фамилијарната хиперхолестеролемија ----------27

1.8. Превенција кај фамилијарната хиперхолестеролемија----------49

2.0. Цел на специјалистичкиот труд (The goal of the specialized labor) --------55

3.0. Материјал и метод за работа (Materials and method of work) ----------56

4.0. Резултати и дискусија (Results and discussion) ----------58

5.0. Заклучок (Conclusion) ----------64

6.0. Користена литература (Used literature and references) ----------66

1. Вовед (Introduction)

Се проценува дека во светот има околу 250 милиони луѓе кои се изложени на многу голем ризик да умрат на млада возраст, затоа што се носители на еден или повеќе гени кои се одговорни за наследни липидни нарушувања. Овие липидни нарушувања се фамилијарната хиперхолестеролемија (FH Familiar Hypercholesterolemia) со околу 10 милиони луѓе, фамилијарна комбинирана хиперлипидемија (FCH Familiar Combined Hyperlipidemia) со околу 40 милиони луѓе и полигенска хиперхолестеролемија (PH Polygenic Hypercholesterolemia) со околу 200 милиони луѓе кои се засегнати од оваа болест (Извештај од втората консултација на Светската здравствена организација во Женева, од 4 септември 1998 година). Фамилијарната хиперхолестеролемија е нарушување на метаболизмот на холестеролот кое се наследува автозомно доминантно. Ова нарушување на метаболизмот на холестеролот е предизвикано од мутација во генот кој го кодира LDL рецепторот (LDL Low Density Lipoproteins – липопротеини со ниска густина), а токму овој липопротеин е одговорен за хомеостазата на холестеролот. Фамилијарна хиперхолестеролемија се карактеризира со високи нивоа на LDL холестерол (Low Density Lipoproteins = липопротеини со мала густина). Високи количини на LDL - холестерол се присутни од самото раѓање на пациентот и го следат низ целиот живот на пациентот. Холестеролот е незаситен стероиден алкохол и неговата биосинтеза се одвива главно во црниот дроб, но и во други ткива како мозокот, периферниот нервен систем, кожата и продуцираат определени количества на холестерол. Холестеролот од црниот дроб се транспортира во вид на липопротеини со ниска густина -LDL (low density lipoproteins) од определни таргет ткива и органи каде што постојат специфични рецептори за LDL. Липопротеините со голема густина HDL (High Density Lipoproteins), го собираат холестеролот од организмот и го транспортираат назад кон црниот дроб. Може да се каже дека HDL – холестеролот (комплекс од сврзани липопротеини со голема густина HDL и холестерол) претставува „добриот холестерол” во организмот, додека LDL – холестеролот (комплекс од сврзани липопротеини со мала густина LDL и холестерол) претставува, условно кажано, „лошиот холестерол” во човечкиот организам.

Хиперхолестеролемијата, т.е. абнормалност во метаболизмот на холестеролот е многу блиску поврзана со срцево заболување познато како атеросклероза. Атеросклерозата претставува мултифакторијално заболување при чие настанување имаат улога генетските фактори, стилот на живеење и сл. Ова заболување е карактеристично за коронарните артерии чиј дијаметар е

поголем од 3 mm, при што настанува акумулирање на липиди во ѕидот на артерискиот крвен сад. Заради мошне бавната прогресија за атеросклерозата е карактеристична долга пресимптоматска фаза. Во крајната фаза на атеросклерозата се среќаваат нестабилни атероматозни плочи кои се подложни на руптура (Рушковска, 2010).

Како резултат на атеросклерозата, кај овие пациентите има појава на висок крвен притисок, болка во градите, срцеви напади, доколку се зафатени артериите во мозокот може да се случи и мозочен удар, потоа може да бидат зафатени артериите на екстремитетите кај пациентот. Појавата на артериски анеуризам исто така е голема, со голема веројатност за руптура и и сериозни крварења со што се доведува во опасност животот на пациентот. Кај овие пациенти се среќаваат и ксантоматози, односно жолтеникави наслаги од холестерол во кожата во различни делови од телото на пациентот.

Кај пациентите со фамилијарна хиперхолестеролемија животниот век е значително намален како резултат на високиот ризик од срцев напад во раните години од животот, мозочен удар, стеноза на аортата како резултат на липидни наслаги на валвата на аортата и нејзината основа, зголемен крвен притисок како резултат на стеснувањето на артериските крвни садови. Порано пацинтите со фамилијарна хиперхолестеролемија имале мошне краток животен век, но денес благодарение на современата медицина животниот век на пациентите со оваа болест кои се благовремено дијагностицирани и третирани е значително зголемен. Без рана дијагноза и соодветен третман, најголем дел од пациентите со оваа болест ќе умрат на возраст од 35 – 65 год. Но, со рана дијагноза и соодветен третман тие би живееле подолго и продуктивно без срцеви удари (Извештај од втората консултација на Светската здравствена организација во Женева, од 4 септември 1998 година).

1.1. Фамилијарна хиперхолестеролемија

1.1.1. Историја на фамилијарната хиперхолестеролемија

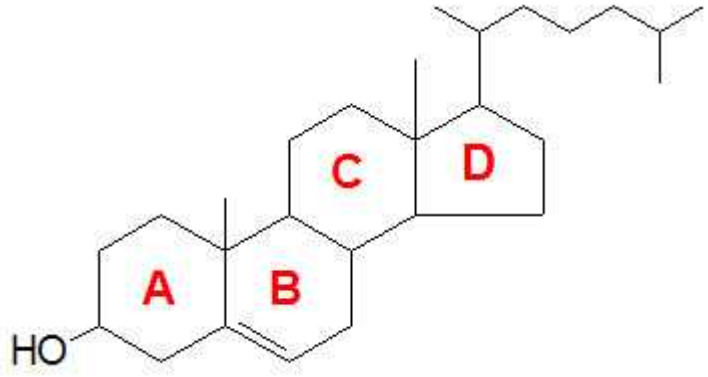
Кон крајот на 18-от век, за првпат биле опишани првите пациенти со симптоми на фамилијарна хиперхолестеролемија кај кои се констатирани кардиоваскуларни нарушувања и ксантоматози на кожата. Во периодот 1925 година до 1938 година, патологот Франџис Харбитц (Francis Harbitz 1867-1950) публикувал неколку извештаи во кои опишува пациенти со ксантоматоза и ненадејна смрт. Неговото внимание било насочено кон ксантоматозата и нејзините особини. Со микроскопски истражувања на оваа појава, утврдил постоење на т.н. пенасти клетки кои биле карактеристични за атеросклерозата.

Во 1939 година норвешкиот лекар Карл Мулер (Carl Müller 1886-1983), публикувал труд како резултат на кратките проучувања на 17 фамилии во Осло. Во овој труд тој опишал наследно срцево заболување проследено со ксантоматози и хиперхолестеролемија. Мулер-Харбиц (Müller-Harbitz) синдром претставува име кое повеќе не се користи во медицината, а го означува синдромот на фамилијарна хиперхолестеролемија.

При крајот на 1970-тите години и почетокот на 1980-тите во Далас, Тексас (Соединетите Американски Држави) докторите Џозеф Л.Голдстин и Мајкл С.Браун, ја откриле и опишале генетичката причина за фамилијарната хиперхолестеролемија. Првенствено тие откриле зголемена активност на HMG-CoA редуктазата, но студиите покажале дека зголемената актвност на оваа редуктаза не ја објаснува состојбата со покачени количества на холестерол. Овие двајца научници својот фокус го насочиле кон ЛДЛ и ЛДЛ-рецепторот, нивното поврзување и ефектите од ова поврзување на метаболизмот на холестеролот. Мутациите кај овој протеин биле причина за појавата на фамилијарната хиперхолестеролемија. Со неможноста на ЛДЛ-холестеролот да се поврзе со целните рецептори на одредени органи во човековиот организам, предизвикале зголемени количини на холестерол т.е. појавата на хиперхолестеролемија. Токму ова бил механизмот на фамилијарната хиперхолестеролемија. Во 1985 година тие ја добиваат Нобеловата награда за медицина за откривање на ЛДЛ- рецепторот и неговата улога во метаболизмот на липопротеините.

1.2. Општи карактеристики на холестеролот и негов транспорт во организмот

Холестеролот е незаситен стероиден алкохол кој содржи 4 прстени (A,B,C и D) и има еден страничен S-N синџир како опашка. Хидрофилниот дел од холестеролот е хидроксилната група и затоа се наоѓа сместен на површината на липидниот слој заедно со фосфолипидите. Холестеролот е ориентиран кон липидниот слој така што четирите прстени и страничниот синџир како опашка се закопани во мембраната во паралелна ориентација на ацилниот синџир на масната киселина соседните фосфолипидни молекули. Поларната хидроксилна група на прстенот А е насочена кон надвор, подалеку од липидниот слој со што се овозможува да реагира со водата со нековалентни водородни врски.



Сл.1. Структурна формула на холестеролот
Fig.1. Structural formula of cholesterol

Спаѓа во групата на соединенија со стероидна структура (во оваа група спаѓаат стероидите, жолчните киселини, липосолубилните витамини, стероидните хормони и др.).

Помалку од половина од вкупното количество на холестеролот во организмот потекнува од De Novo синтеза, односно синтеза која се случува во цитоплазмата и рибозомите на Ендоплазматичниот ретикулум од две ацетил-КоА кои што претставуваат основни градбени блокови во синтезата на стеролите. Околу 10% од оваа синтеза се одвива во хепатоцитите на црниот дроб, а околу 15% од вкупната синтеза на холестерол се одвива во интестенумот. Но, холестеролот се внесува преку храната особено преку храна со животинско потекло (жолчки од јајца, месо, млечни производи, живина, риба и сл.). Холестеролот е потребен на организмот поради тоа што влегува во составот на клеточните мембрани. Во црниот дроб, холестеролот може да се претвори во примарна жолчна киселина како што е холната киселина и во хенодеоксихолна киселина, која ја забрзува апсорпцијата на мастите во

цревата дејствувајќи како детергент. Во одредени ткива како што е надбубрежната жлезда, тестисите и јајниците, мало количество на холестерол може да се претвори во стеродини хормони како на пример глукокортикоидите, минералкортикоидите и естрогени хормони. Мало количество на холестерол откако ќе се претвори во 7-дехидрохолестерол, се трансформира во витамин $Д_3$ при изложеност на кожата на сончева светлина.

Холестеролот во плазмата е транспортиран од страна на липопротеините. Липопротеините можат да се поделат на основа на 2 критериуми:

- Густината
- Електрофоретската подвижност

Според нивната густина тие се делат на 4 класи и тоа:

1. Хиломикрони со густина од 0.93 – 0.96 g/ml;
2. VLDL (Very Lov Density Lipoproteins – протеини со многу мала густина) со густина од 0.96 – 1.006 g/ml;
3. LDL (Low Density Lipoproteins – протеини со мала густина) со густина од 1.006 – 1.063 g/ml;
4. HDL (High Density Lipoproteins – липопротеини со висока густина) со густина од 1.063 – 1.210 g/ml.

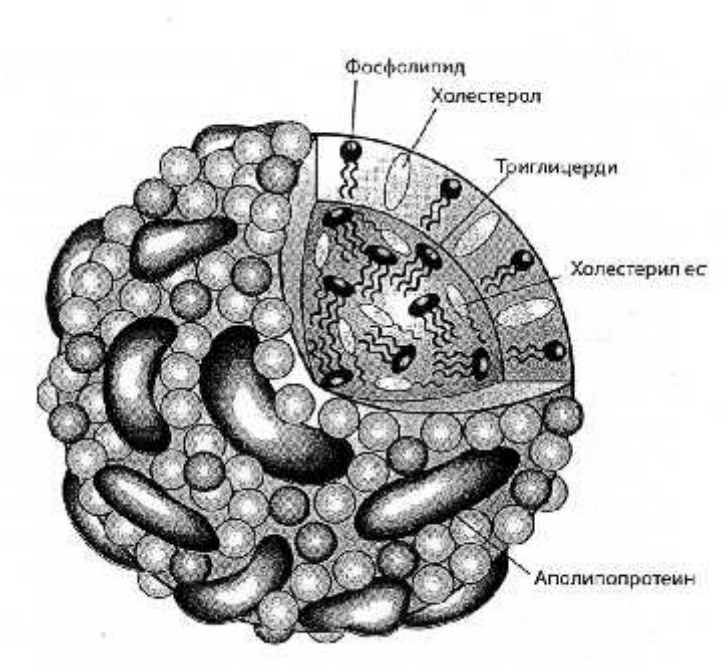
Втората поделба се базира на нивната местоположба при електрофоретско раздвојување бидејќи содржат протеини. Врз основа на локализацијата на глобулините, липопротеините се делат на 4 класи и тоа:

1. α – липопротеини, а тоа се всушност липопротеините со висока густина HDL – липопротеините;
2. пре – β- липопротеините, тоа се липопротеините со многу мала густина VLDL- липопротеините;
3. β- липопротеините, тоа се липопротеините со мала густина LDL – липопротеините;
4. хиломикрони.

Липопротеините имаат сферичен облик со големина од 10 до 1200 nm (нанометри) и се составени од липиди дел и протеини наречени аполипопротеини. Холестеролот и фосфолипидите се наоѓаат примарно на површината на липопротеините како единечен монослој, додека хидрофобните триглицериди и холестерол естрите се наоѓаат во центарот на липопротеинската структура. Големината на липопротеинската честичка корелира со нејзината содржина на липиди.

Главна улога на хиломикроните се доставување на липидите од храната до клетките на црниот дроб и периферните органи. Липопротеините со многу мала

густина (VLDL-липопротеините) се богати со триглицериди како и хиломикроните и задача на оваа фракција на липопротеини е да ги



Сл.2. Модел на липопротеинска структура

Fig.2. Model of lipoprotein structure

транспортираат ендогените триглицериди добиени во црниот дроб до перфирените клетки. Липопротеините со мала густина (LDL- липопротеините) се богати со холестерол и токму оваа фракција е одговорна за транспортот на холестерлот кон целните клетки со соодветни LDL рецептори. LDL- честичките според густината со ултрацентрифугирање или со гел електрофореза може да се поделат на 8 поткласи. Во последно време се зголемува интересот за квантификација на овие поткласи, бидејќи токму некои од нив се повеќе проатерогени, па можат да бидат подобри маркери за ризик од атеросклероза и коронарни срцеви заболувања. Липопротеините со голема густина (HDL-липопротеини) се најмали но најгусти липопротеински честички. Овие липопротеински честички учествуваат во отстранувањето на вишокот на холестерол од периферните клетки. HDL – липопротеинските честички имаат антиатерогено својство и играат голема улога во заштита на организмот од атеросклерозата.

Липопротеините со многу мала густина (VLDL-липопротеините) претставуваат средство за транспорт на ендогените липиди создадени во црниот дроб до останатите органи, а од црниот дроб се ослободуваат по пат на егзоцитоза. Во циркулацијата, под дејство на липопротеинска липаза, липопротеините со многу мала густина се добиваат липопротеини со средна густина (IDL-Intermediate Density Lipoproteins – липопротеини со средна густина). Од овие

честички под дејство на ензимот хепатална липопротеинска липаза се трансформираат во липопротеини со мала густина (LDL - липопротеини) кои се богати со холестерол. Липопротеините со мала густина го транспортираат на овој начин холестеролот до сите целни органи и клетки кои на својата клеточна површина имаат специфичен LDL-рецептор. Со ова поврзување на овие честички со соодветните рецептори на целните клетки, се овозможува нивно навлегување во овие клетки каде под дејство на ензимите од лизозомите тие се хидролизираат. Аполипопротеинскиот дел од липопротеините се хидролизира до амино-киселини, триацилглицеролите се разградуваат до глицерол и слободни киселини, а естрите на холестеролот до слободен холестерол и слободни масни киселини. Слободниот холестерол вака добиен преку специфични рецептори активира два регулаторни механизми и тоа:

- делува инхибиторно на синтеза на нови LDL – рецептори;
- ја инхибира активноста на HMG – CoA редуктазата (3-хидрокси-3-метилглутарил коензим А редуктаза) со што оневозможува ендогена синтеза на холестерол.

Слободниот холестерол во целната клетка се користи за потребите на истата клетка или се складира, ако има вишок со помош на ензимот ацил-холестерол-ацилтрансфераза (ACAT).

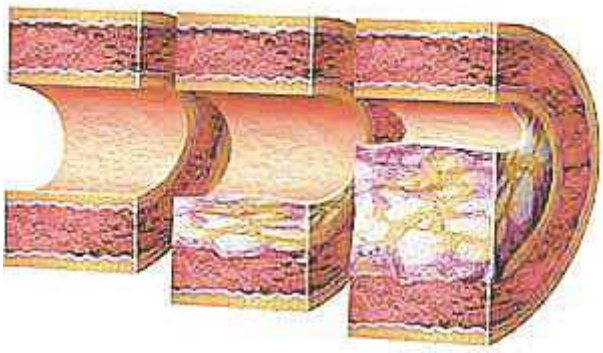
HDL-липопротеините се синтетизираат во црниот дроб и во тенкото црево и имаат клучна улога која се состои во врзување на вишокот на холестерол од ткивата и негов транспорт до црниот дроб. Во оваа функција, клучна улога игра ензимот лецитин-холестерол-ацилтрансфераза (LCAT). Ваквиот липопротеин поврзан со холестерол се разградува во црниот дроб.

Доколку има нарушување на метаболизмот на липопротеините од крвната плазма, тоа нарушување, без разлика дали е примарно или секундарно, претставува значаен фактор на ризик за појава на атеросклероза.

1.3. Атеросклероза и улога на липопротеините во атеросклерозата

Атеросклерозата претставува едно од почестите заболувања во денешно време. Тоа е заболување за чие настанување влијаат повеќе фактори почнувајќи од генетските, па сè до начинот на исхраната т.е. консумирање на храна богата со масти и холестерол, стилот на живеење, пушење, невежбање т.е. физичка неактивност и слично. Ова заболување е најкарактеристично за коронарните артерии, но се среќава и кај други видови артерии како феморалните, каротидните артерии кај кои надворешниот дијаметар е поголем од 3 mm (милиметри). Атеросклерозата претставува заболување каде што

доаѓа до акумулирање на липиди, холестерол, калциум и други слични материи во ѕидот на артериите. Ова акумулирање во артериите предизвикува зацврстување на артериите и губење на нивната еластичност. Освен тоа се намалува волуменот на артерискиот крвен сад. Во почетокот атероматозните промени се случуваат во субендотелниот простор во облик на тенки масни ленти. За овие масни ленти е карактеристично присуство на пенасти клетки кои се полни со липиди и нивното потекло е од циркулирачките моноцити. Со текот на времето масните ленти еволуираат во фиброзни плочи. Кај овие фиброзни плочи централниот дел кој е богат со липиди е покриен со сврзно ткиво и помалку или повеќе навлегува во луменот на артерискиот крвен сад. За атеросклерозата е карактеристична долга пресимптоматска фаза, а во крајната фаза се среќаваат атероматозни плочи кои се подложни на руптура.



Сл.3. Приказ на атеросклероза на артериски крвни садови.

Fig.3. Display of atherosclerosis in arteries.

Ефектите на атерсклерозата варираат во зависност кој крвен сад е зафатен. Можат да бидат зафатени артериите кои носат крв богата со кислород кон срцето, артериите во мозокот или артериите во екстремитетите или пак анеуризам. Многу често луѓето со атеросклероза не ги чувствуваат симптомите на оваа болест сè додека артериите кои се зафатени, волуменот на истите не е барем 40% намален од атероматозните промени. Па, во зависност од артеријата која е ефектирана, се јавуваат следните симптоми:

- Кај атеросклероза на коронарните артерии (Артериска коронарна болест) симптомите обично се јавуваат при физичка активност и се следните симптоми: болка во градите, болка во абдоменот, вратот, вилицата, грбот или рамото, ослабеност на организмот, потење, недостиг на воздух.

- Кај атеросклероза на артерии кои го снабдуваат мозокот со крв (Цереброваскуларна болест) се предизвикува намалување на дотокот на крв со кислород и недостаток на крв во мозокот – исхемија и мозочни

удари, а симптомите кои пациентите со ваква медицинска состојба би ги чувствувале се следните: слабост или парализа на една страна на телото, проблеми со говорење и разбирање на говор, губење на вид на едно око, мускулна слабост, несвестица, губење на рамнотежа и моментални и силни главоболки.

- Кај атеросклероза на периферните артерии (Периферна васкуларна болест) истата предизвикува намалување на дотокот на крв во екстремитетите и симптомите се следните: болка, грчеви во мускулите, отрпнување и губење на чувствата во мускулите на екстремитетите, гангрена, задебелени нокти, кожа која е ладна на допир.

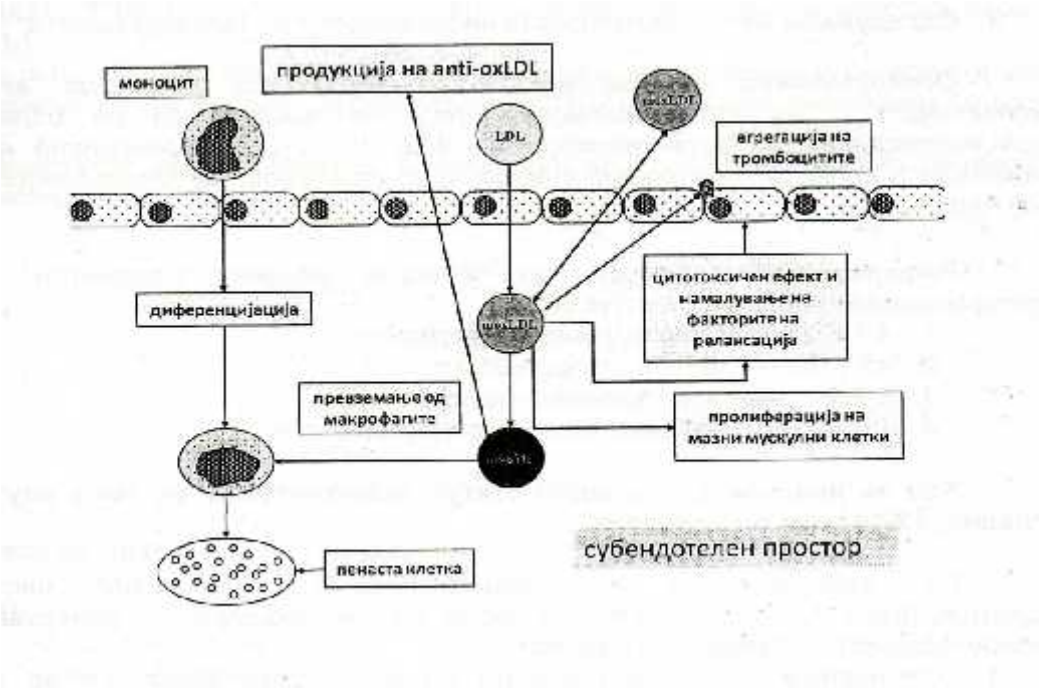
Епидемиолошките студии покажуваат позитивна корелација помеѓу вкупното количество на холестерол и морталитетот предизвикан од корноарни срцеви заболувања. Тоталното количество на холестерол не може со голема точност да го предвиди коронарното срцево заболување кај многу пациенти, бидејќи вкупното количество на холестерол го сочинуваат не само атерогените липопротеини (VLDL, LDL, IDL), туку и анти-атерогени липопротеини како што се липопротеините со голема густина – HDL. Липопротеините имаат голема улога во процесот на атеросклероза.

Ниски серумски концентрации HDL-холестеролот се мошне тесно поврзани со зголемениот ризик за појава на атеросклероза, додека високиот HDL-холестерол (над1.55mmol/l) е асоциран со намален атероген ризик (Рушковска, 2010).

Липопротеините навлегуваат во субендотелниот простор на артериските крвни садови со процесот на трансцитоза. Овој процес се одвива на тој начин што се формира везикула на површината на ендотелната клетка по пат на ендоцитоза, потоа оваа везикула мигрира на другиот крај на клетката и содржината на оваа везикула се ослободува во субендотелниот простор по пат на егзоцитоза. Големината на трансцитозните везикули изнесува околу 70 nm (нанометри). Хиломикроните поради своите димензии не можат да влезат во субендотелниот простор, односно тие не се директно атерогени (Рушковска, 2010).

Интезитетот на трансцитозата и внесувањето на липопротеините во субендотелниот простор е правопорционално на концентрацијата на циркулирачки липопротеини. Овој процес на трансцитоза е двонасочен, така што со тоа се објаснува делумната регресија на атероматозните плочи поради намалување на концентрацијата на циркулирачки липопротеини. Во субендотелниот простор на артериските крвни садови се случува процес на оксидативна модификација на липопротеинските честички. На почетокот се формираат минимално оксидирани LDL- честички (moxLDL). Овие минимално

оксидирани честички се карактеризираат со значајна оксидација на липидната компонента, но само мала незначителна модификација на молекулите на апо B-100. Заради тоа овие липопротеински честички сè уште можат да се метаболизираат со посредство на LDL-рецептори. Со понатамошна оксидација се случува и значителна оксидација на апо B-100 што деоведува до структурни промени и промени во својствата на овие аполипопротеини и истите не можат да бидат препознаени од страна на специфичните клеточни рецептори и добиваат својство на антиген. Тоа пак претставува импулс за хемотакса на циркулирачките моноцити и нивна диференцијација во макрофаги кои пак со помош на “scavenger” рецепторите (рецептори чистачи) ги внесуваат модифицираните LDL-честички во себе и притоа се трансформираат во пенасти клетки. Со внесување на големи количини на оксидирани LDL-честички се предизвикува оштетување на макрофагите и клеточна смрт. Како резултат на тоа што оксидираните LDL-честички се препознаваат како антигени, во циркулацијата се појавува и голема количина на антитела против оксидирани LDL-честички (anti-oxLDL). Ова претставува дополнителен маркер за степенот на атерогениот ризик и чие присуство говори за автоимуниот карактер на атеросклерозата (Рушковска,2010).



Сл.4. Транспорт на липопротеини во субендотелниот простор на артериски крвен сад.

Fig.4. Lipoprotein transport into the subendothelium of arteries.

1.4. Генетичка основа на фамилијарната хиперхолестеролемија

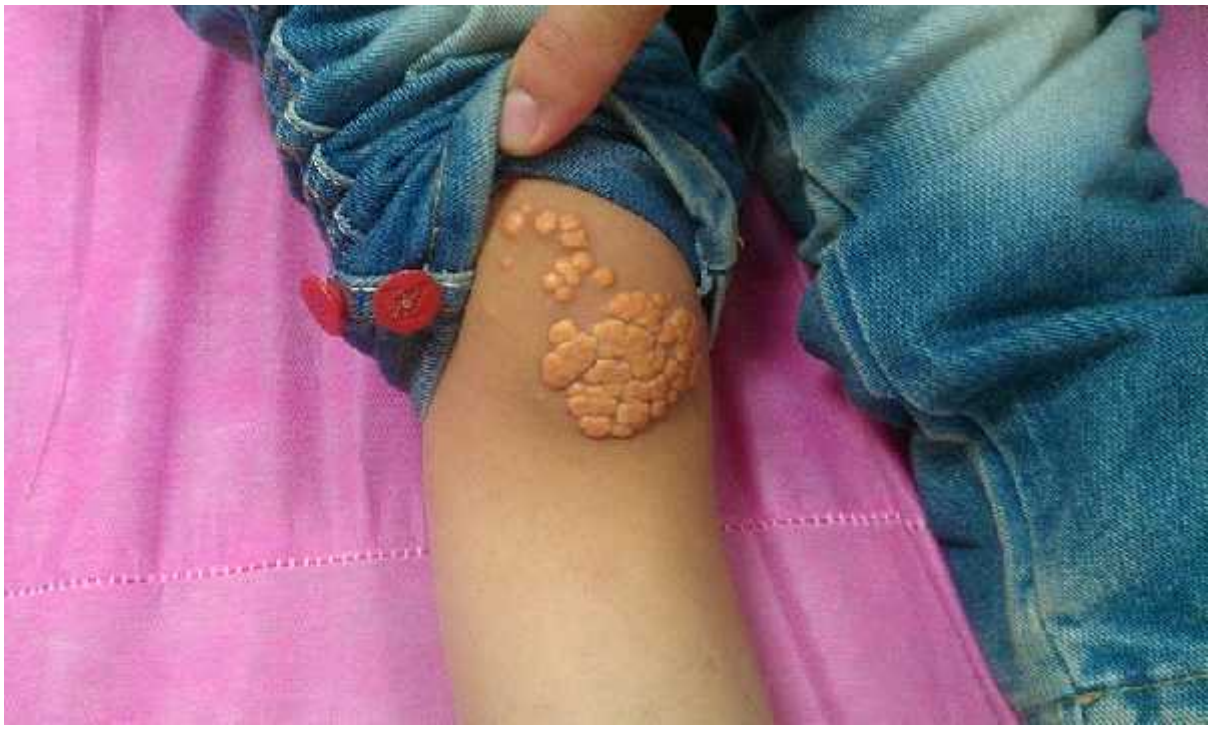
Фамилијарната хиперхолестеролемија е едно од честите генетски заболувања, кое афектира 1 на 500 индивидуи во светски рамки. Иаку фамилијарната хиперхолестеролемија може да биде рано детектирана, истражувањата покажуваат дека околу 20% од индивидуите со фамилијарна хиперхолестеролемија се дијагностицирани, а само 7% од нив се адекватно третирани (Williams et al., 1993).

Фамилијарната хиперхолестеролемија (FH–Familiar Hypercholesterolemia) претставува состојба на организмот предизвикана од мутација во генот за рецепторот за липопротеини со мала густина (LDLR) и аполипопротеин Б генот (apoB). Претставува автозомно доминантно заболување и како такво се карактеризира со покачени количества на вкупен холестерол и LDL – холестерол, како резултат на присуство на дисфункционални рецептори за LDL – холестерол или недостаток од рецептори за LDL- холестерол во црниот дроб со кои организмот поточно црниот дроб би го чистел LDL – холестеролот од циркулацијата во организамот.

Кај пациентите со фамилијарна хиперхолестеролемија (FH) се среќаваат хронично високи концентрации на вкупен холестерол и високи концентрации на LDL- холестерол. Пациентите со фамилијарна хиперхолестеролемија се предиспонирани кон прерани атеросклеротични кардиоваскуларни заболувања и ксантоми по површината на нивното тело. Рана дијагноза на ова заболување е можна и е во корист на пациентот. Конвенционално дијагностицирањето на оваа болест може да се изврши на било која возраст со клинички-биохемиски тестирања и доколку е потребно испитување на фамилијарната медицинска историја.

За да се избегнат рани кардиоваскуларни заболувања, кај пациентите со дијагноза на фамилијарна хиперхолестеролемија потребни се агресивни третмани за намалување на вкупниот холестерол и на LDL-холестеролот. Пациентите со ретка хомозиготна форма на оваа болест симптомите како што се ксантоми и компликации предизвикани од забрзана атеросклероза ги чувствуваат мошне рано, уште во раното детство. Без агресивна терапија, хомозиготните рецептор-негативни пациенти со фамилијарна хиперхолестеролемија ретко преживуваат после нивната втора декада од животот, додека хомозиготните пациенти со дефектни LDL-рецептори имаат малку подобра прогноза, но неизбежно развиваат клиничка атеросклеротична васкуларна болест до 30-тата година од нивниот живот (Rader, 2007).

Меѓутоа, некои студии покажале дека пациенти со потврдена фамилијарна хиперхолестеролемија, можат да немаат доволно покачени концентрации на холестерол за клиничка дијагноза. Во прилог на ова, некои студии пак покажале дека ксантомите не се секогаш распространети кај пациенти со фамилијарна хиперхолестеролемија и тие се ретко присутни сè до четвртата декада од животот. Затоа присуството на ксантоми не е веродостоен дијагностички критериум, особено кај деца (Austin et al., 2004a).



Сл.5. Ксантоми на кожата во пределот на коленото кај младо дете пациент со фамилијарна хиперхолестеролемија.

Fig.5. Xanthoma in skin in knee region at patient - child suffering from Familial hypercholesterolemia.

Генетските истражувања на полето на фамилијарната хиперхолестеролемија уште од 1970-те години, покажале дека FH фенотипот е предизвикан од мутации во генот за LDL- рецепторот (LDLR-генот).

До денес се идентификувани преку 850 мутации на генот за LDL- рецепторот (LDLR-генот). Меѓутоа не сите мутации се познати како функционални муатации. Преку 80 генски делеции и дупликации се идентификувани во генот за LDL- рецепторот (LDLR-генот), при што овие реангажмани се одговорни за околу 5% од FH мутациите во генетички хетерогените популации (Austin et al. 2004b).

Во 1980-те години дополнителни истражувања покажале дека клиничка манифестација на FH фенотипот може да биде како резултат на мутации во рецептор врзувачкиот регион на аполипопротеин Б-100 (апоВ-100), лиганд кој

се врзува за LDL-рецепторот. Мутации во apoB-генот ќе влијаат на врзувањето на лигандот и притоа ќе го забават чистењето на LDL-холестеролот од циркулацијата (Rader, 2007).

Ова нарушување, кое е како резултат на мутации на овој ген е наречено фамилијарен детектирачки аполипопротеин Б-100 “Familial Defective Apolipoprotein B-100 (FDB)”. Најчестата мутации која резултира со појава на фамилијарен детектирачки аполипопротеин Б-100 е супституција на глутамин со аргинин на позиција 3500 во аполипопротеин Б-100, меѓутоа треба да се спомене дека постојат повеќе мутации кои што имаат сличен ефект на врзувањето на аполипопротеин Б-100 со LDL-рецепторот (Rader, 2007).

Фенотипот на фамилијарна хиперхолестеролемија предизвикана со мутација на генот за аполипопротеин Б-100, е помалку изразен од фенотипот предизвикан од мутацијата на LDLR – генот за LDL-рецепторот. Мутацијата на генот за аполипопротеин Б-100 е покарактеристична за хуманата популација од Европа и Северна Америка.

Освен мутациии во гените на LDL-рецептор и аполипопротеин Б-100, откриени се и други мутации во други гени кои предизвикуваат покачени концентрации на LDL-холестерол. Во последните години се откриени 2 нови локуса кои се одговорни за рецесивни форми на хиперхолестеролемија и оваа состојба е позната под името автозомна рецесивна хиперхолестеролемија (Autosomal Recessive hypercholesterolemia - ARH). Клиничките истражувања покажуваат дека пациенти хомозиготи со автозомна рецесивна хиперхолестеролемија имаат количини на холестерол кои се движат помеѓу количините на холестерол кои ги имаат хетерозиготи со фамилијарна хиперхолестеролемија (FH) и хомозиготи со фамилијарна хиперхолестеролемија (FH). Додека хетерозиготи со автозомна рецесивна хиперхолестеролемија имаат ниво на липиди слично на нормалната популација, а ризикот од срцеви заболувања на долг рок за оваа подгрупа на пациенти е непознат (Austin et al. 2004a).

Исто така откривањето на мутација на PCSK9 генот придонесува во разбирање на фенотипот на фамилијарната хиперхолестеролемија. Мутациите во рамките на овој ген предизвикуваат фамилијарна хиперхолестеролемија, но треба да се спомене фактот дека овој ген е мошне полиморфен со популациски разлики. Овој факт го етаблира овој ген како „модифицирачки” ген во фамилијарната хиперхолестеролемија кој што придонесува за значајни фенотипски варијации кај пациентите.

Фамилијарната хиперхолестеролемија може да биде класифицирана во два фенотипа и тоа фенотип на хетерозиготи и фенотип на хомозиготи. Фенотипот на хетерезиготи се наследува автозомно доминантно и се карактеризира со концентрации на LDL-холестерол од 5 до 12 mmol/L, ксантоми на тетивите и кардиоваскуларни заболувања најчесто пред 55-та година од животот. Најчесто

овој фенотип е предизвикан од мутација на LDL-рецептор генот. Фенотипот на хомозиготите се далеку посериозен вид и се карактеризира со концентрација на LDL-холестерол над 12 mmol/L, ксантоми по кожата и тетивите и кардиоваскуларни заболувања на многу помлади години.

1.5. Молекуларни патишта на фамилијарната хиперхолестеролемија

Механизмот на настанување на фамилијарната хиперхолестеролемија за прв пат го опишале Браун и Голдстин во 1986 година. Тие докажале дека LDL-холестеролот во крвта содржи аполипопротеин Б-100 на неговата површина. На површината на хепатоцитите се наоѓа рецептор за LDL-холестерол кој претставува гликопротеин и го врзува аполипопротеин Б-100 од LDL-холестеролот. Притоа се формира комплекс LDL-холестеролот и LDL-рецепторот и со други протеини и со интеракција со LDLR адаптор протеин 1 (LDLRAP1) се внесуваат во клетката. Во клетката настанува дисоцијација на овој комплекс и рецепторот за LDL (LDLR) е рециклиран на клеточната мембрана, а LDL-холестеролот е хидролизиран од страна на ензимите на лизозомите до слободен холестерол и масни киселини. Генот PCSK9 служи како пост-транскрипциски LDLR инхибитор т.е. ја инхибира реакцијата на рецепторите за LDL-холестерол на површината на клетката. Со мутација во гените кои се вклучени во овој молекуларен пат на LDL-холестеролот, се предизвикува високи количини на LDL-холестерол и клиничка манифестација на фамилијарна хиперхолестеролемија.

Мутација на генот за рецепторот за LDL-холестерол (LDLR)-генот, е најчестата мутација која е причинител на фамилијарната хиперхолестеролемија. Во зависност од мутацијата, може воопшто да нема рецептори за LDL-холестерол или пак да има, но тие да не се ефективни и да не го врзуваат LDL-холестеролот или, ако го врзуваат, да не го интернализираат по врзувањето за истиот. На тој начин холестеролот останува во циркулацијата и како резултат на тоа има покачена концентрација на вкупен холестерол.

Генот за рецепторот за LDL-холестеролот (LDLR-генот) се наоѓа на пократкиот крак на 19-от хромозом (p13.1–p13.3), долг е 45kb (килобази) и е составен од 17 интрони и 18 егзони кои кодираат пептид кој е составен од 860 аминокиселини LDLR-протеин. Овој протеин има голем број различни домеини, како на пример лиганд-врзувачки домеин, домеин за

сигнален пептид и сл. Мутации во овие домеини се широко присутни и се предизвикувачи на различни видови на дисфункции. Бројот на мутации на генот за LDL-рецепторот е мошне голем. Меѓу нив се голем број nonsense мутации и големи делеции кои предизвикуваат недостаток на рецептори за LDL-холестерол, потоа голем број missense мутации кои се предизвикувачи на нефункционални рецептори и silent- мутации кои не предизвикуваат значајни промени во функцијата на рецепторот за LDL-холестеролот.

Аполипопротеин Б-100 е протеинска компонента на LDL-холестерлот. Генот кој го кодира овој протеин е долг 43kb (килобази), составен од 29 егзони и енкодира синтеза на 2 изоформи на овој протеин аполипопротеин Б-48 и аполипопротеин Б-100. Мутации на овој ген за синтеза на аполипоопротеин Б-100, кои би предизвикале фенотип на фамилијарна хиперхолестеролемија се во мал број и истите предизвикуваат LDL-холестеролот да не може да се поврзе со рецепторите на целните клетки и со тоа во циркулација да има големи количини на LDL-холестерол.

PCSK9 генот се простира на 25 kb (килобази) и има 12 егзони и кодира синтеза на ензим познат како пропротеин конвертаза субтилисин/кексин тип 9 или скратено PCSK9. Оваа пропротеин конвертаза PCSK9 се врзува за EGF-A домеинот на рецепторот за LDL-холестерол и со тоа предизвикува деградација на рецепторот. Со мутација на овој ген може да се предизвика редуциран број рецептори за LDL-холестерол и со тоа покачени количества на LDL-холестерол.

Автозомна рецесивна хиперхолестеолемија е предизвикана како резултат на мутација на LDL-рецептор адаптор протеин 1 *(*LDLRAP1) или познат уште како ARH – ген. Оовј ген е долг 25 kb (килобази) и има 9 егзони. Кај автозомна рецесивна хиперхолестеролемија, мутацијата во овој ген предизвикува неможност за интернализација на комплексот на рецептор – лиганд, со што имаме поврзување на LDL-холестеролот за рецепторите но тој останува на нив при што истиот се акумулира т.е. концентрацијата на LDL-холестеролот се зголемува. Оваа мутација е екстремно ретка и има многу мал број пациенти со дефект во ARH-генот.

1.6. Ризици кај фамилијарна хиперхолестеролемија

Фамилијарната хиперхолестеролемија е мошне често генетичко заболување со преваленца кај хетерозиготите од приближно 1 на 500 луѓе во повеќето западни земји, додека мошне тешките хомозиготни форми од оваа болест се случуваат приближно 1 на 1.000.000 луѓе (Leren, 2004). Се проценува

дека повеќе од 10.000.000 луѓе во светски рамки се афектирани од оваа болест, од кои околу 200.000 умираат годишно од прерано коронарно срцево заболување (Leren, 2004).

Ризикот и опасноста по здравјето кај пациенти со констатирана фамилијарна хиперхолестеролемија е мошне голем и како главен негативен фактор се јавува атеросклерозата. Симптомите на атеросклерозата се јавуваат дури кога повеќе од 40% од артерискиот сад е зафатен и од зависност кој вид на артериски сад е афектиран се јавуваат ризици од следните заболувања:

- Ризик од коронарно артериско заболување – кое се јавува како резултат на намален лумен на артериите на срцето и симптомите како што се болка во градите, болка во рамото/раката, вратот, грбот, стомакот, потоа симптом на слабост, потење, недостаток на воздух, се обично предизвикани од физичка, сексуална активност, изложување на ладно време, гнев или стрес состојба.
- Ризик од церебро-васкуларно заболување – кое се јавува како резултат на намалување на луменот на артериите кои го снабдуваат мозок со свежа артериска крв. Како резултат на ова заболување пациентите може да искусат исхемични напади (губење на мозочната функција како резултат на недостиг на крв и кислород со потполна закрепнување и враќање на функциите на мозокот за 24 часа) и мозочни удари. Симптомите кои пациентите со константирано церебро-васкуларно заболување се слабост и парализа на едната страна на телото, проблеми со говор и разбирање на говор, губење на вид на едно око, мускулна слабост и проблеми со одот и рамнотежата, вртоглавица и повремени силни главоболки.
- Ризик од периферно артериско заболување – како резултат на намалување на луменот на артериите кои ги снабдуваат екстремитетите со крв богата со кислород. Симптомите кај ова заболување се болка во екстремитетите, грчеви, отрпнатост, чувство на замор во мускулите, задебелени нокти, мазна блескава површина на кожата на екстремитетите, гангрена, кожа која е ладна на допир.

Во првите истражувања преваленцата на симптоматично периферно артериско заболување била докажана кај 8-16% од хетерозиготните форми на фамилијарна хиперхолестеролемија (Hutter et al., 2004). Подоцна со употреба на exo-Doppler, кој овозможува идентификација на пресимптоматички артериски лезии и редуциран проток на крв, било откриено дека периферно артериско заболување било присутно кај 30-45% од пациентите со фамилијарна хиперхолестеролемија (Postiglione et al., 1985, Kuo et al., 1987). Кај одредени пациенти, перферното артериско заболување се манифестирало дури кај 30 годишни хетерозиготни пациенти со фамилијарна хиперхолестеролемија.

Асоцијацијата на фенотипот на фамилијарната хиперхолестеролемија со мозочни удари е документирана во поголем број студии спроведени во неколку

географски локации (Austin et al., 2004). Кај една поголема студија спроведена помеѓу пациенти со фамилијарна хиперхолестеролемија кои се соодветно третирани, потврдено е дека процентната стапка на морталитет кај овие пациенти предизвикана од мозочен удар е многу слична со процентната стапка на морталитет од истата оваа причина кај генералната здрава популација (Huxley et al., 2003).

Во една студија во која биле набљудувани 282 мажи и 244 жени со хетерозиготна форма на фамилијарна хиперхолестеролемија во периодот 1980 – 1988 година во Англија и Велс, било утврдено дека кај овие пациенти се среќава стандардизирана стапка на морталитет од коронарно срцево заболување која била 3.9 пати поголема, споредена со стапката на морталитет кај општата популација на Англија и Велс од истото ова заболување (Simon Broome Register Group, 1991). Било утврдено дека стапката на морталитет била значајно поголема кај пациенти на возраст од 20-39 години, додека оваа стапка на морталитет била значајно намалена кај пациенти на возраст од 60-74 години. Ова имплицирало дека високата стапката на морталитет кај фамилијарна хиперхолестеролемија е асоцирана со младите пациенти со оваа болест, додека овој ризик е значително намален откако ќе го преживеат средовечниот период (Simon Broome Register Group, 1991). Истата оваа истражувачка група Simon Broome Register Group во периодот од 1980 година до 1995 година спроведена на 605 мажи и 580 жени на возраст од 20 – 79 години со фамилијарна хиперхолестеролемија. Резултатите на оваа поопширна студија само ги докажале резултатите на претходната студија дека кај младите пациенти со фамилијарна хиперхолестеролемија на возраст од 20-39 години морталитет е највисок, а после средовечниот период од нивниот живот овој ризик е значително опаднат (Simon Broome Register Group, 1999).

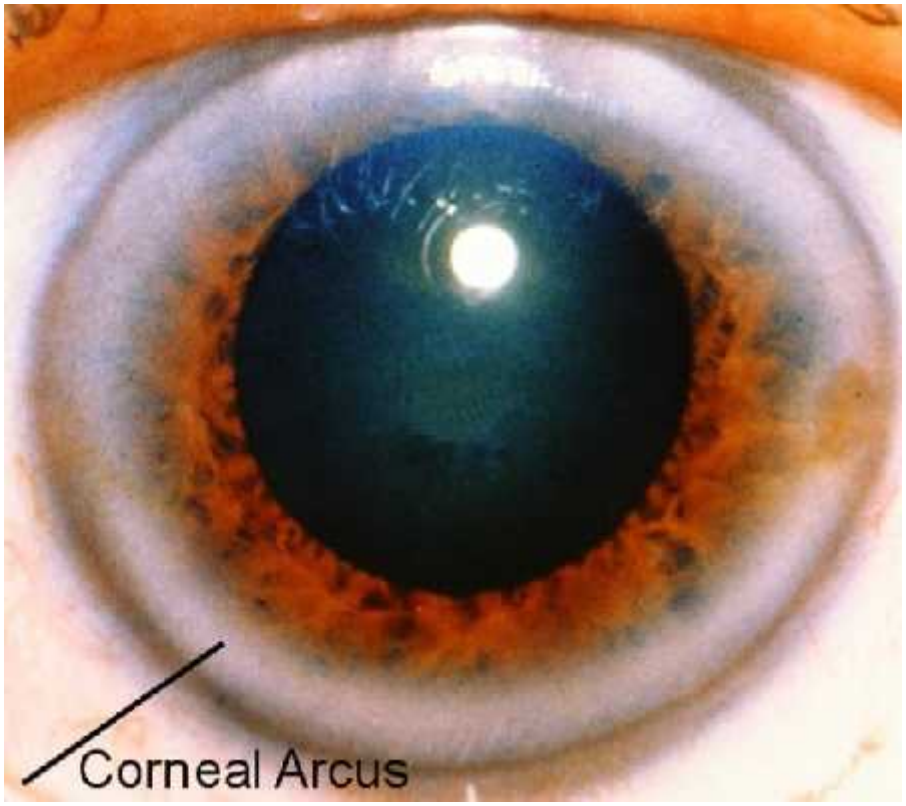
Кај пациентите со фамилијарна хиперхолестеролемија покрај високите концентрации на холестерол, има појава и на висок крвен притисок која е резултат на намалениот лумен на артериските крвни садови. Поради компликации од атеросклерозата освен срцево заболување се среќаваат абнормални срцеви ритми, слаба снабденост на одредени делови од телото како нозете, интестиналниот тракт, компликации и откажување на бубрезите. Сите овие ризици од заболувања и клинички состојби кај заболените водат кон прерана смрт на пациентите доколку соодветно не се третирани.

Поради високите концентрации на холестерол кај индивидуи со фамилијарна хиперхолестеролемија, холестеоролот може да се складира во вид на жолтеникави наслаги на различни делови од телото - ксантоми. Овие наслаги на холестерол се депонираат во разни делови на кожата. Жолтеникави наслаги на холестерол околу очните капаци се нарекуваат Xanthelasma Palpebrarum или ксантома.

Сл.6. Жолтеникави наслаги од холестерол во пределот на очните капаци - Xanthelasma Palpebrarum

Fig.6. Yellowish patches of cholesterol around the eyelids - Xanthelasma Palpebrarum

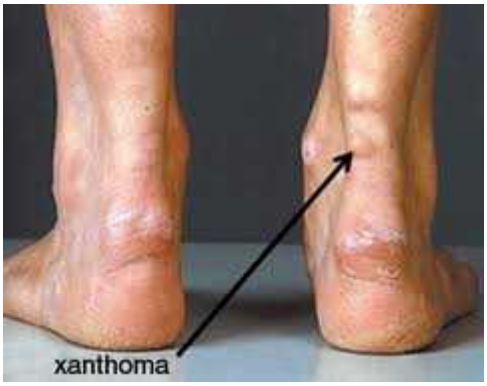
Депозити од холестерол можат да се сретнат и во самите очи кај луѓе со фамилијарна хиперхолестеролемија во вид на бел, сив или син опалесцентен прстен кој се појавува на маргините на корнеата или бел прстен пред периферниот дел на ирисот (Arcus senilis или Arcus senilis corneae), кои се резултат на таложењето на холестеролот во стромата на корнеата од окото.



Сл.7. Фотографија на око кај пациент со Arcus Senilis Corneae.

Fig.7. Photography of eye at patient with Arcus Senilis Corneae.

Вакви депозити во вид на грутки се среќаваат на рацете, лактите, колената, стапалата, а најкарактеристичен пример за ваков вид на депозит на холестерол е ксантома на Ахиловата тетива.



Сл.8. Ксантома на Ахилова тетива.

Fig.8. Xanthoma Achilles tendon.

Овие наслаги од холестерол – ксантоми можат да се сретнат и на други делови од кожата и се нарекуваат со различни имиња во зависност на кој дел од телото се јавуваат, но сите тие претставуваат подгрупи на ксантоми.

Во неколку епдемиолошки студии на пациенти со фамилијарна хиперхолестеролемија, докажано е дека високиот крвен притисок е важен ризик фактор, особено за женскиот пол (Beaumont et al., 1976; Ferriéres et al., 1995).
Одредени популациски студии покажале асоцијација на серумскиот холестерол и нивото на инсулинот (Ferrannini et al., 1991). Меѓутоа, тоа не значи дека фамилијарната хиперхолестеролемија секогаш предизвикува абнормален метаболизам на глукозата. Во студии спроведени во последно време, било испитано влијанието на абнормалниот метаболизам на глукозата на појавата на коронарни срцеви заболувања кај 150 хетерозиготи со фамилијарна хиперхолестеролемија на возраст од 40 години и повеќе (Yanagi et al., 1997). При што Diabetes mellitus бил константиран кај 15 лица, додека кај 27 лица била константитирана нарушена толеранција на глукозата (Impaired Glucose Tolerance). Двете состојби : Diabetes mellitus и нарушена толеранција на глукозата (Impaired Glucose Tolerance) се состојби кои се асоцирани со повисоката преваленца на коронарни срцеви заболувања.
Одредени епидемиолошки студии на фамилијарната хиперхолестеролемија покажале дека пушењето е значаен ризик фактор коронарни срцеви заболувања (Beaumont et al., 1976). Меѓутоа, во некои други студии кај хетерозиготи со фамилијарна хиперхолестеролемија, пушењето не било значаен фактор за коронарни срцеви заболувања (Kotze et al., 1993), или пак фактор за периферни васкуларни заболувања (Kroon et al., 1995).

1.7. Молекуларно-дијагностички методи за идентификација на фамилијарната хиперхолестеролемија

Раната дијагноза на фамилијарната хиперхолестеролемија е мошне важна за животот на пациентите со оваа болест. Важна е во поглед на третманот кој би им бил препорачан на овие пациенти и со тоа би се превенирал леталниот исход кај овие лица поради прерано коронарно артериско заболување. Инаку клиничката слика кај пациенти со фамилијарна хиперхолестеролемија е јасна, дијагностичкиот критериум сугерира на потреба од генетички тестирања за случаи каде има конфронтирачки фактори како на пример нивото на холестерол е во крајните горни граници, нејасна фамилијарна историја, главно кај пациенти каде што има дијагностичка дилема. Главната вредност на молекуларната дијагностика е употребата во предикативно тестирање за фамилијарна хиперхолестеролемија на членови на фамилијата. Ова е важно за рана детекција на случаи на фамилијарна хиперхолестеролемија, со цел да се интервенира навремено за да се спречат кардио-васкуларни заболувања и осигурување за членовите на фамилијата во врска дали ја имаат оваа болест или не. Фамилијарната хиперхолестеролемија е асоцирана со преку 1.000 мутации на LDL-рецептор генот, па доколку се проба со молекуларно-генетичка дијагноза на еден случај de novo, тоа би чинело многу пари и време, а тука е и несигурноста за потврда за каква мутација се работи. Затоа во одредени ситуации се употребува генетички скрининг кој во поглед на време и пари е мошне ефикасен метод, но сепак има свои лимитации како што е употребата на скрининг метод во големи размери т.е. на големи популации. Најчесто скрининг методот се употребува на одредени популации каде што една или неколку познати мутации ја предизвикуваат болеста и каде преваленцата од фамилијарна хиперхолестеролемија е повисока од таа на општата популација. Уште една лимитација на овој метод е варијабилноста на фенотипот на оваа болест и малиот број информации на поврзаноста на генотипот со фенотипот, бидејќи одредени фенотипи можат да бидат предизвикани од негенетички фактори. Најчесто се употребуваат два скрининг методи и тоа :

- скрининг на популации;
- каскаден скрининг.

Фамилијарна хиперхолестеролемија е презентирана со:

- Хиперхолестеролемија со високи концентрации на холестерол, што не може да биде објаснето со други причини;
- Доказ за лична или фамилијарна историја на предвремени атеросклеротични, кардиоваскуларни заболувања;
- Ксантоми на разни делови на телото.

Присуството на холестерол е уште во раната младост на индивидуата, при што дијагнозата треба да биде насочена кон одредување на концентрациите на LDL-холестерол и да се внимава на фактот дека концентрациите растат со текот на годините и на разликите во концентрациите помеѓу половите. Жените

се на некој начин заштитени од атеросклеротични промени сè до перидот на климактериумот, со што природната историја на предвремени атеросклеротични кардиоваскуларни заболувања е со задоцнување од една декада кај жените.

Освен овие карактеристики, се искористуваат и следните клиничко-метаболички одлики при дијагностика на фамилијарна хиперхолестеролемија:

Метаболички одлики:

- Зголемени концентрации на LDL-холестерол;
- Зголемена концентрација на прекурсорот на LDL-холестеролот – IDL-холестеролот.

Клинички одлики:

- Прерано коронарно заболување на срцето;
- Прерана кардиоваскуларна болест на срцето;
- Стенози на аортата;
- Присуство на ксантоми на телото, поточно на тетивите;
- Corneal arcus – депозити на холестерол во корнеата на окото;
- Xanthelasma palpebrarum или Xanthelasma – жолтеникави депозити на холестерол во пределот на очните капаци.

Клиничка дијагноза на фамилијарна хиперхолестеролемија е мошне важна и затоа се развиени неколку дијагностички критериуми кои служат за оваа цел.

- Холандски липиден клинички критериум (Dutch Lipid Clinic criteria):

- Присуства на DNK мутација или LDL-холестерол > 8.5 mmol/L-----8 поени
- Присуство на ксантом на тетиви -Tendon xanthomas ----------6 поени
- Присуство на покачен LDL-холестерол 6.5 – 8.4 mmol/L----------5 поени
- Присуство на Arcus senilis < 45 години ----------4 поени
- Присуство на покачен LDL-холестерол 5.0 – 6.4 mmol/L----------3 поени
- Присуство на ксантоми и Arcus senilis кај роднина од прво колено, покачен LDL-холестерол во рано детство или пак прерано коронарно срцево заболување ----------2 поени
- Присуство на роднина со рано кадриоваскуларно заболување и со покачен LDL-холестерол, лична историја на покачен LDL-холестерол од 4.0 – 4.9 mmol/L или рано кардиоваскуларно заболување----------1 поен

Доколку според овие критериуми се има повеќе од 8 поени, тогаш со сигурност според овој дијагностички критериум се работи за фамилијарна хиперхолестеролемија. Доколку поените се движат од 6-8 поени, тогаш најверојатно се работи за фамилијарна хиперхолестеролемија, а во случај да имаме 3-5 поени тогаш е можно но е е сигурно дека се работи за фамилијарна хиперхолестеролемија. Овој дијагностички критериум бара барем една од овие карактеристики да биде во корелација со молекуларно испитување.

- Модифициран Англиски (Симон Брум) критериум – (Modified UK (Simon Broome) criteria):

1. DNK мутација;
2. Присуство на ксантом на тетива Tendon xanthomas или кај роднина од прво или второ колено;
3. Историја на миокарден инфаркт во фамилијата <50 години кај второ колено или <60 години кај прво колено роднини;
4. Фамилијарна историја на покачен холестерол >7.5 mmol/L кај прво и второ колено роднини;
5. Присуство на покачен холестерол >7.5 mmol/L кај возрасни и >6.7 mmol/L кај млади до 16 години;
6. Покачен LDL-холестерол >4.9 mmol/L кај возрасни или >4.0 mmol/L кај млади под 16 години.

Доколку се исполнети петиот или шестот критериум и првиот критериум од овој дијагностички модел, тогаш дефинитивно се работи за фамилијарна хиперхолестеролемија (5 или 6 + 1). Доколку се исполнети петиот или шестиот плус вториот критериум (5 или 6 + 2), тогаш мошне веројатна дијагноза на фамилијарна хиперхолестеролемија. Доколку е исполнет петиот или шестиот критериум и третиот и четвртиот критериум (5 или 6 + 3 и 4), тогаш можна е фамилијарна холестеролемија.

- Американски дијагностички критериум за дијагноза на фамилијарна хиперхолестеролемија:

Табела 1.

Американски дијагностички критериум за фамилијарна хиперхолестеролемија

(US MedPed Program diagnostic criteria for familial hypercholesterolemia)

	Вкупен холестерол (mmol/L) максимални вредности Total cholesterol cutpoints (mmol/liter)			
Возраст (години) Age (years)	**Прво колено роднина со ФХ†** First-degree relative with FH†	**Второ колено роднина со ФХ†** Second-degree relative with FH	**Трето колено родинина со ФХ†** Third-degree relative with FH	**Општа популација** General population
<20	5.7	5.9	6.2	7.0
20–29	6.2	6.5	6.7	7.5
30–39	7.0	7.2	7.5	8.8
≥40	7.5	7.8	8.0	9.3

Дијагноза (ФХ† е дијагностицирана ако вкупниот холестерол ги надмине максималните вредности во оваа табела)
Diagnosis (FH† is diagnosed if total cholesterol levels exceed the cutpoint).

† ФХ – Фамилијарна хиперхолестеролемија (FH familial hypercholesterolemia).

Табела.1. Американски дијагностички критериум за дијагноза на фамилијарна хиперхолестеролемија.

Tab.1. American diagnostic criteria for diagnosis of Familiar hypercholesterolemia.

Според овој дијагностички критериум, дијагнозата за фамилијарна хиперхолестеролемија е воспоставена доколку вредностите измерени за вкупен холестерол ги надминуваат пресечните точки, односно вредностите наведени во оваа табела како максимални. Овој критериум користи пресечни точки на вредности на вкупен холестерол за одредена возраст и фамилијарна историја т.е. за роднини од прво, второ и трето колено и пресечна точка за општата популација. Овие пресечни точки на вредности на холестерол се изведени од математички модели, користејќи публикувани вредности на холестерол за лица со фамилијарна хиперхолестеролемија во Соединетите Американски Држави и Јапонија. За валидација на овој дијагностички критериум се користени вредности на холестерол за 5 фамилии од Јута (САД) со потврдена DNK -потврдена мутација за фамилијарна хиперхолестеролемија.

Фреквенцијата со која оваа болест се случува е утврдена на приближно 0.002 во општата популација. Оваа мала стапка на мутација на гените кои предизвикуваат фамилијарна хиперхолестеролемија е поради големата стапка на смртност на хомозиготите и хетерозиготите со фамилијарна хипеперхолестеролемија пред тие да стапат во репродуктивниот период од нивниот живот и со тоа стапката на ова заболување е мало. Варијации на

мутациите на LDL-рецепторот можат да се демонстрираат кај популации кои се изолирани подолг временски период и се во голем број.

Таканаречениот “The founder effect” или основачкиот ефект се однесува на фреквенција на фамилијарната хиперхолестеролемија поголема од 0.002 и/или доминација на една или неколку мутации во таа популација. Овој феномен е типичен за популации кои мигрирале во мали групи и се проширile и трансформирале во географски и културолошки изолирани населби. Такви примери се: Африканерите во Јужна Африка (етничка група во Јужна Африка кои се потомци на холандски доселеници), Француските Канаѓани (етничка група во Канада кои водат потекло од француските колонисти), либански христијани и Финците. Токму во овие популации ова заболување се случува со поголема фреквенција отколку во општата популација.

Јужна Африка е позната по високата преваленца на фамилијарна хиперхолестеролемија поради три идентифицирани мутации кои се причинители на истата. Преваленцата на фамилијарната хиперхолестеролемија е преценета на 1 на 83 луѓе во руралните заедници. Овие три идентифицирани мутации објаснуваат околу 95% од случаите на фамилијарна хиперхолестеролемија во оваа популација.

Кај Француските Канаѓани се идентифицирани 11 мутации на LDL-рецепторот со што се објаснуваат околу 90% од случаите со фамилијарна хиперхолестеролемија.

Токму за ваков вид на популации се користат скрининг методите.

- Каскаден скрининг претставува механизам за откривање на ризик од некоја генетска состојба како на пример фамилијарната хиперхолестеролемија со помош на процес кој инволвира систематско фамилијарно следење. Овој вид на скрининг се употребува за блиски роднини на лица со клиничка дијагноза на фамилијарна хиперхолестеролемија за ефикасно дијагностицирање на дополнителни пациенти со оваа дијагноза. Со пронаоѓање на дополнителни лица со оваа сосотојба, потребно е и нивните роднини од прво колено да се тестираат бидејќи тие имаат 50% шанса да ја имаат оваа генетска состојба. Тестот се прави на тој начин што се идентификуваат роднините на лицето со фамилијарна хиперхолестеролемија, потоа систематски се тестираат прво роднините од прво колено, па второ и трето колено и така понатаму, со комбинација мерење на концентрацијата на LDL-холестерол и различни мутациски варијации или скрининг истражувачки процедури за мутации за генетското заболување, во случајот фамилијарна хиперхолестеролемија. Главната цел на ова тестирање е намалување на морталитетот кај лицата со воспоставена дијагноза преку рана дијагноза и ефикасен третман на состојбата и воедно продолжување на животниот век кај овие лица.

- Популациски скрининг е метод со кој се употребуваат одредени методи т.е. тестови со кои би се идентификувале поединци, луѓе од општата популација кои се со висок ризик од болеста, пред да се појават самите симптоми на болеста. Овој метод се спроведува во популации каде имаме висока стапка на појава на болеста, отколку во нормалната општа популација. Примарната цел на популацскиот скрининг е предвидување со висока точност кои индивидуалци, луѓе од групата која е цел на овој популациски скрининг, се со значаен ризик од развивање на оваа болест. Откако овие луѓе со висок ризик за оваа болест, фамилијарна хиперхолестеролемија во случајов се откриени, врз нив се извршуваат дополнителни конформациски тестови со кои би се потврдило тоа што со скрининг тестот е веќе откриено.

Скрининг тестовите имаат свои лимитации. Скрининг тестовите можат само покажат кој во дадена популација има висок ризик од развивање на оваа болест. Како резултат на ова, овие тестови можат да дадат лажно позитивни и лажно негативни резултати. Лажно позитивни резултати имаме кога според критериумите на скрининг тестот, кај некоја индивидуа е констатирано дека е со висок ризик, додека всушност таа нема никаков ризик од развивање на болеста. Лажно негативни резултати се кога индивидуа со висок ризик за болеста, не е идентифицирана со скрининг методот. Затоа има потреба од дополнителни дијагностички тестови и методи за конформација на болеста. Овие тестови се инвазивни, поскапи, траат подолг временски период и затоа не се составен дел на скрининг методите, кои мора да се минимално инвазивни, релативно ефтини, лесно изводливи, тестирачкиот метод мора да е проучен и научно докажан за точен.

Во моментот не постојат студии или методи како што се скрининг методите кои генетски би ја идентифицирале причината кај клинички дијагностицираната популација со фамилијарна хиперхолестеролемија, што е делумно поради фактот што ова заболување е со полигенски карактер.

Генетичкото тестирање, односно DNK дијагнозата на фамилијарната хиперхолестеролемија е мошне значајна процедура со која се дава дефинитивна дијагноза на фамилијарната хиперхолестеролемија. Раната дијагноза на фамилијарната хиперхолестеролемија е императив на сите дијагностички методи, бидејќи овозможува намалување на нивото на вкупниот и LDL-холестеролот кај пациентот, а воедно и ризикот од периферно васкуларно и кардио-васкуларни заболувања поради атеросклерозата. DNK дијагнозата е особено значајна кај одредени случаи на фамилијарна хиперхолестеролемија каде каде нивото на холестеролот и LDL-холестеролот се благо покачени, без видливи надворешни манифестации на болеста и без фамилијарна историја на прерано артериско коронарно заболување. Во ретки случаи каде што има пациент со мутација на LDL - рецепторот, ваквиот пациент може да има концентрација на LDL-холестеролот во рамките на нормалното ниво. Иаку нема доказ кој што сугерира дека мутацијата сама по себе дава независен ризик за кардиоваскуларно заболување, идентификацијата на ваквата мутација е клинички важна, бидејќи пациентот може да развие високи концентрации на LDL-холестерол во било кој момент од

неговиот живот и со тоа неговиот живот би дошол во опасност. Со пронаоѓање на одредена мутација кај некој пациент во дадена популација, може да даде основа за скрининг на таа популација со цел да се пронајдат останатите пациенти со оваа болест, доколку постојат, со цел нивен соодветен третман и продолжување на нивниот животен век. Не само што со генетичката метода би се пронашла мутацијата која е предизвикувач на состојбата кај пациентот, истата може да послужи и за прогноза за здравствената состојба. Дијагностицирањето на различните мутации за болеста, може да го диктира правецот во начинот на справување и третманот на болеста. Идентитетот на генот кој е инволвиран во болеста, диктира одредени аспекти во врска со фенотипот кај пациентот со што се воспоставува одредена корелација на фенотип-генотип. Иако не се во целост разберени и истражени овие корелации, тие даваат потенцијална можност на медицинските лица да одлучат колку агресивен ќе биде третманот кај заболеното лице.

Фенотипската експресија на мутацијата која е предизвикувач на фамилијарна хиперхолестеролемија, може да прескокне неколку генерации. Ова може да се случи на пример во присуство на гени модификатори кои што можат да го моделираат фенотипот како резултат на епигенетски фактори или да го намалат нивото на LDL-холестерол. Во вакви случаи, генетските тестирања можат да имаат прогнозирачки карактер за наредните поколенија.

Заради оваа причина, пронаѓање на позната мутација која предизвикува фамилијарна хиперхолестеролемија кај лице кај кое концентрациите на LDL-холестерол се нормални, им овозможува на соодветните медицински лица да вршат скрининг тестови кај членовите на фамилијата на тоа лице со цел пронаѓање на евентуални недијагностицирани хиперхолестеролемии .

Има голем број молекуларно-дијагностички методи кои се користат за детекција на фамилијарната хиперхолестеролемија. Најдобар метод за детекција и дефиниција на мутации е методот на директно секвенционирање, но овој метод бара многу работа и трошоци. Затоа, за дијагностика на оваа болест, се користат скрининг методите. Едни од најкористените методи и техники за откривање на значајни мутации во генот за LDL-рецепторот и со тоа предизвикувачи на фамилијарна хиперхолестеролемија се: Polymer Chain Reaction - Single Stranded Chain Polymorphism (PCR-SSCP), Southern Blotting – техниката, Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) – методата, Exon-By-exon Sequencing Analysis (EBESA) – методата, Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (dHPLC) методата, Gel Electrophoresis-Based Heteroduplex Analysis –методата, секвенционирање на DNK – методата и нејзини варијации (DNA Sequencing) и други. Овие методи се мошне добри во поглед на специфичноста, но во поглед на сензитивноста не се многу ефикасни. Во продолжение се опишани принципите на работа на неколку поважни молекуларни методи кои се користат при дијагностика на фамилијарната хиперхолестеролемија.

❖ Генерален принцип на Polymer Chain Reaction - Single Stranded Chain Polymorphism техниката (PCR-SSCP - техника)

Во основата на Polymer Chain Reaction - Single Stranded Chain Polymorphism техниката е полимеразна верижна реакција (PCR). Оваа техника е незаменлива молекуларна алатка во истражувањата и дијагностиката на голем број хередитарни заболувања како што е примерот со фамилијарната хиперхолестеролемија, но и други заболувања како неоплазми, инфективни заболувања и др.

Полимеразната верижна реакција (PCR) техниката се користи за умножување на DNK секвенци од многу мало почетно количество на испитуван биолошки материјал. Теоретски од една молекула на DNK со оваа техника се добиваат милијарда идентични копии означени како ампликони. Може да се каже дека крајниот ефект на PCR-техниката е еден вид на “бесклеточно молекуларно клонирање”. Така добиената амплифицирана DNK понатаму може да се користи за детекција на генетски мутации и полиморфизми. Оваа техника е исклучително сензитивна и со неа може да се добијат т.е. амплифицираат доволен број DNK молекули за да бидат видливи при стандардна агорозна електрофореза, дури и кога почетниот материјал е само една или неколку клетки или пак неколку молекули на матична DNK.

По дефиниција, PCR-техниката е репетитивна, двонасочна ензимска синтеза на ограничени сегменти од DNK молекули. Синтезата ја катализира термостабилна DNK полимераза како што е ензимот Taq (име добиено од термофилната бактерија Thermus aquaticus од која е изолиран овој ензим). За отпочнување на на DNK полимеразацијата, неопходни се куси иницирачки олигонуклеотиди, означени како прајмери. Секој од овие прајмери мора да биде комплементарен до 5’ краевите од двете вериги на DNK регионот кој се амплифицира.

Идентификацијата на специфична мутација, која предизвикува наследна болест како фамилијарната хиперхолестеролемија, е основа за терапија и скрининг на роднините со DNK базирани тестови. Полимерна верижна реакција PCR- SSCP или PCR-Single Stranded Chain Polymorphism претставува техника со која одредени DNK фрагмени се амплифицирани со специфични прајмери и PCR, и потоа да бидат скенирани за варијации во секвенцата. PCR-техниката е можна само ако е позната секвенцата на бочните краеви од регионот на DNK кој нè интересира. Тоа подразбира дека регионот е клониран и секвенциониран или нуклеотидната секвенца е достапна од литература или од базите на генски податоци на интернет. DNK регионот (означен како ампликон) кој се амплифицира е ограничен со бочните секвенци на кои анилираат прајмерите. Со рутинска PCR амплификација можат да се амплифицираат сегменти со должина од неколку стотина, па сè до неколку илјади базни парови. Постојат комерцијални сетови со рекомбинантни полимерази со кои е можна амплификација и на повеќе од 10 kb (килобази) DNK региони.

Во текот на PCR реакцијата се вршат неколку циклични промени на температурата во реакциските епрувети на точно определени временски

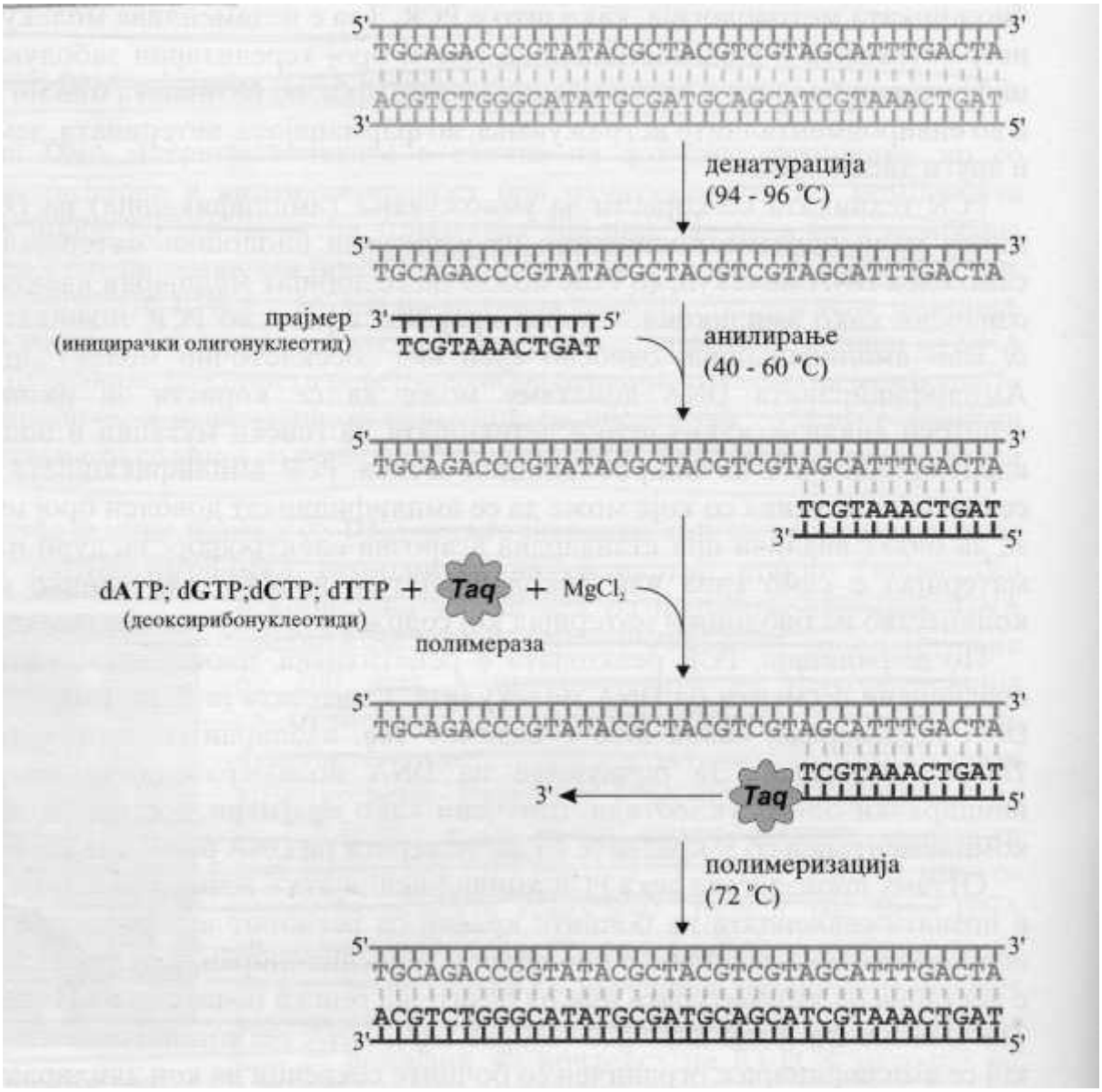
интервали, со што е овозможено верижно одвивање на следните три реакциски чекори:

1. Денатурација – на двоверижните молекули на DNK, односно раскинување на водородните врски меѓу комплементарните вериги) при зголемување на температурата на околу 95°C (Целзиусови степени).

2. Анилирање – хибридизација на олигонуклетодните прајмери со комплементарните секвенци на двете раздвоени матични вериги на DNK при оптимална температура.

3. Полимеризација – односно синтеза или екстензија на 3’ крајот на секој од анилираните олигонуклеотидни прајмери со термостабилна DNK полимераза (Taq- полимераза) при температура од 70 - 72°C (Целзиусови степени). Овој чекор се нарекува уште и како елонгација на прајмерот.

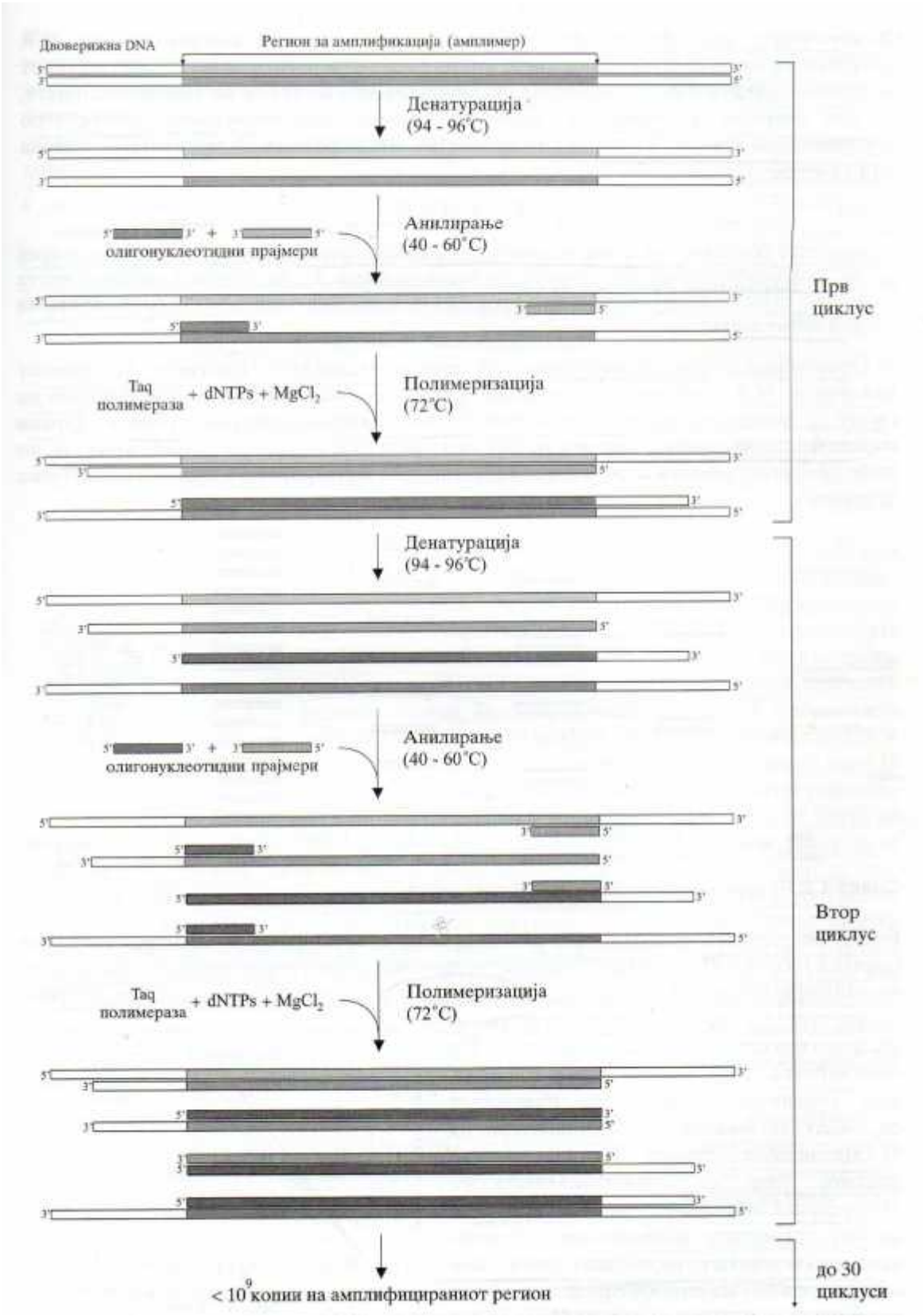
Со секој цикус од по три чекори се амплифицира регионот од матичните двоверижни молекули на DNK, кој е ограничен со двата прајмери што е прикажано на слика 9.



Сл.9. Синтеза на DNK со термостабилна полимераза.

Fig.9. Synthesis of DNA with thermostable polymerase.

Со верижно повторување на овие три циклуси се врши амплификација т.е. умножување на првичниот DNK молекул како што е прикажано на слика 9.



Сл.10. Шематски приказ на PCR-реакција

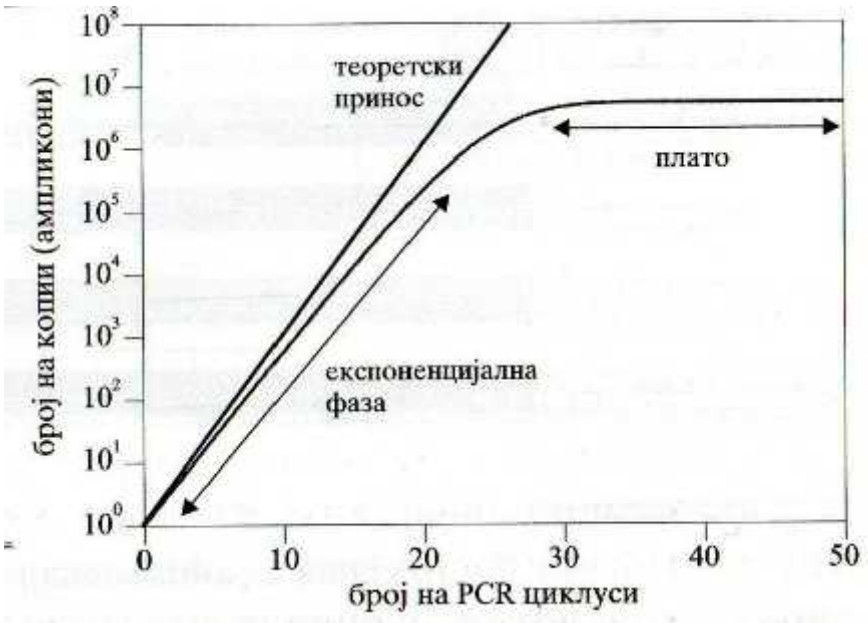
Fig.10. Schematic display of PCR-reaction

Двоверижните амплификациски продукти – ампликони или уште се нарекуваат PCR-продукти со еднакви по должина на двете комплементарни вериги се појавуваат во текот на третиот циклус и се акумулираат експоненцијално во текот на амплификацијата. Со ова во големи размери се зголемува бројот на првично синтетизирани продукти со недефинирани краеви. Теоретскиот принос на амплификациските продукти се одвива според формулата:

$$N_f = N_o \ (1 + Y)^n$$

Каде што N_f преставува бројот на копии на крајот од PCR-амплификацијата, N_o е иницијалниот број на DNK молекули кои ја содржат потребната секвенца, Y е коефициент на ефикасноста на екстензијата во текот на PCR-процесот, а n е бројот на PCR циклуси со ефикасна експопненцијална амплификација. Поради повеќе фактори, реалниот принос на PCR реакцијата е секогаш значително понизок, но сепак доволен за релативна електрофоретска или хибридизациска детекција.

Експоненцијалната фаза на PCR реакцијата не трае цело време, туку по определен број циклуси (обично помеѓу 25 и 40 циклуси) доаѓа до нагло опаѓање на амплификациската ефикасност и доаѓа до појава на т.н. плато-ефект што делумно се случува поради термичко оштетување на деоксинуклеотидите, прајмерите и на Taq – полимеразата (иако таа е термостабилна, истата има краток полуживот од околу 40 минути на температура од 95°C(Целзиус). Така во доцните фази на амплификацијата се акумулираат неспецифични PCR продукти.



Сл.11. Плато ефект при PCR-реакција.

Fig.11. Plateau effect in PCR amplification.

Исклучителната сензитивност на PCR-реакцијата овозможува детекција на мали количества на DNK и е мошне брз амплификациски процес кој се одвива во *In vitro* услови. За одвивање на PCR-реакцијата потребни се следните компоненти:

- Пар на специфични прајмери – секој од оовие прајмери е едноверижен олигонуклеотид комплементарен со 5' бочниот регион од спротивната верига на матичната DNK. Прајмерот кој анилира со „горната" (+)DNK верига се означува како преден, а другиот прајмер кој ја копира „долната" DNK верига се означува како реверзен прајмер.
- Смеса од трифосфатни форми на четирите деоксирибонуклеотиди (dATP, DGTP, dCTP и dTTP) во еквимоларна концентрација од 200 μM секој. Оваа смеса често се означува како "dNTP". Деоксирибонуклеотидите се неопходни градивни единици за синтеза на DNK. Превисоки концентрации (>4 mM) делуваат инхибиторно.
- Термостабилна DNK полимераза – најчесто се употребува Taq полимераза, ензим изолиран од терморезистентната архбактерија Thermus Aquaticus чиј температурен оптимум е меѓу 70 – 80 °C (Целзиус). Термостабилноста на полимеразата е неопходна заради повеќекратното (25-35 пати) достигнување на температура од околу 95°C (Целзиус). Оваа полимераза има 3" терминална трансферазна активност при што на 3" крајот од ампликоните додава еден аденински нуклеотид.
- Моновалентни јони – како на пример јони на калиум (K) или натриум (Na) присутни во PCR – пуферот.
- PCR-пуфер – за одржување на соодветна Ph-вредност.
- Матична DNK – примерок на изолирана DNK која ја содржи секвенцата која треба да се амплифицира. Можат да се амплифицираат двоверижни и едноверижни матични DNK молекули.

Процесот на PCR- амплификација се одвива во специјални машини наречени PCR-машини или термосајклери (Thermal Cycler). Во основа тие претставуваат прецизни суви инкубатори, со можност за програмирана промена на инкубациската температура во тек на релативно кус временски интервал. Во нив е поставен метален термален блок со отвори каде се инкорпорираат специјалните пластични реакциски епруветии. Кај постарите модели загревањето на епруветата резултира со испарување и кондензација на течноста по внатрешните ѕидови на реакциската епрувета. Проблемот кај овие апарати се решава со додавање на неколку капки на минерално, парафинско масло кое не се меша со водениот раствор и лебди на површината со што се спречува испарувањето и кондензацијата. Посовремените апарати го имаат решено тој проблем, па потребата од минерално, парафинско масло е елиминирана. PCR-машините се програмираат со соодветен профил на динамика и температурни вредности на загревање и ладење на термалниот блок. Современите PCR-машини се со способност за меморирање на повеќе програми за разни амплификациски профили.

Сл.12. Постар модел на PCR-машина (PCR Systems 2400 од фирмата Applied Biosystems).

Fig.12. Older model of PCR-machine ((PCR Systems 2400 manufactured by Applied Biosystems).

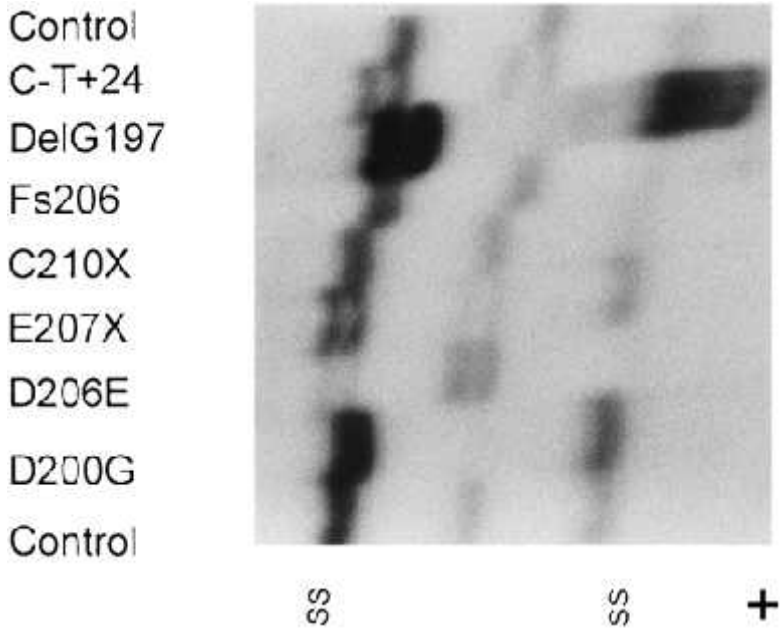
Сл.13. Современ модел на PCR-машина (T100™ gradient thermal cycler произведена од Bio-Rad).

Fig.13. Modern model of PCR-machine (T100™ gradient thermal cycler manufactured by Bio-Rad).

Оваа процедура, PCR-Single Stranded Chain Polymorphism е метод кој овозможува идентификација на повеќето варијации во секвенцата на единечна низа т.е. единечна нишка од синџирот на DNK. Типично должината на овие низи е од 150 до 250 нуклеотиди. Во нормални услови без дејство на денатурирачки агенси, единечна нишка на DNK има уникатна конформација која зависи од композицијата на секвенцата. Оваа конформација ќе биде различна и доколку единечна база е сменета. Ваквите промени, иако се мали,

ја менуваат конфигурацијата или големината доволно за да бидат детектирани преку разликата во мобилноста во соодветен матрикс (пр. акриламиден гел) во процесот на електрофореза преку промената на нивната местоположба во однос на котролни проби. Во многу лабортории [α-^{32}P]dCTP (деоксицитидин трифосфат) е интегриран за време на PCR реакцијата, за потоа дилутираниот продукт од PCR реакцијата биде денатуриран од краток чекор кој користи температура доволна висока за вриење, по што примерокот се става на не-денатурирачки "секвенционирачки" акриламиден гел долг 40 центиметри. Примероците како резултат на тоа, добиваат секундарна структура од единечна нишка како резултат на спарување на базите од истата единечна нишка. Иако се дилутирани, пробите со единечна дна на почетокот на гелот се концентрирани при што може да дојде до поврзување на две нишки и до формирање на DNK составена од две нишки. Затоа да се редуцира појавата на повторно спојување на единечните нишки на DNK и да се намали количината на DNK на стартот од електрофорезата, овој примерок треба да бидат соодветно дилутирани. Кога се користат гелови за електрофореза кои се со мал капацитет за волуменот на примерокот кој се испитува, концентрацијата на испитуваниот примерок може да биде лимитирачки фактор за методите за детекција на DNK, па затоа за вакви гелови се препорачува радиоизотопна детекција која е далеку почувствителна од другите методи како што е методот со етидиум бромид.

Класичната SSCP – PCR метода вклучува ^{32}P радиоактивен изотоп кој се додава за време на PCR реакцијата за максимална детекциона сензитивност во дилутираниот примерок. Исто така се користи гел со поголема должина на лентите за максимална резолуција на малите разлики во мобилноста на DNK фрагментите.



Сл.14. SSCP на 3' крајот на егзон 4 од LDL-рецептор генот.

Fig.14. SSCP of the 3' end of exon 4 of the LDL receptor gen.

На слика број 14 е претставен електрофореграм од SSCP на 3’ крајот на егзон број 4 од LDL – рецептор генот. На оваа слика се гледа шема од фрагменти за 6 мутации (D200G, D206E,E207X, C210X, Fs206, DelG197) на овој ген и една неутрална (интрон) мутација (C=T+24) и контролни примероци. Сите овие примероци се од хетерозиготни пациенти. Правецот на електрофорезата е кон + крајот т.е. кон анодата. Лентите кои се во средината на сликата т.н. „сенки” и се можни PCR – artefacts т.е. остатоци. Различните шеми на фрагменти е како резултат на мутациите на генот што предизвикале разлика во конформацијата на единечната нишка на DNK на овој ген, што на крајот резултира со разлика во мобилноста при електрофорезата.

За успешно изведување на PCR- SSCP- техниката важни се следните фактори:

- Должината на единечните нишки на испитуваната DNK;
- Ефектот на температурата на гелот на кој се одвива електрофирезата;
- Методот или начинот на DNK денатурација;
- Карактеристиките на гелот.

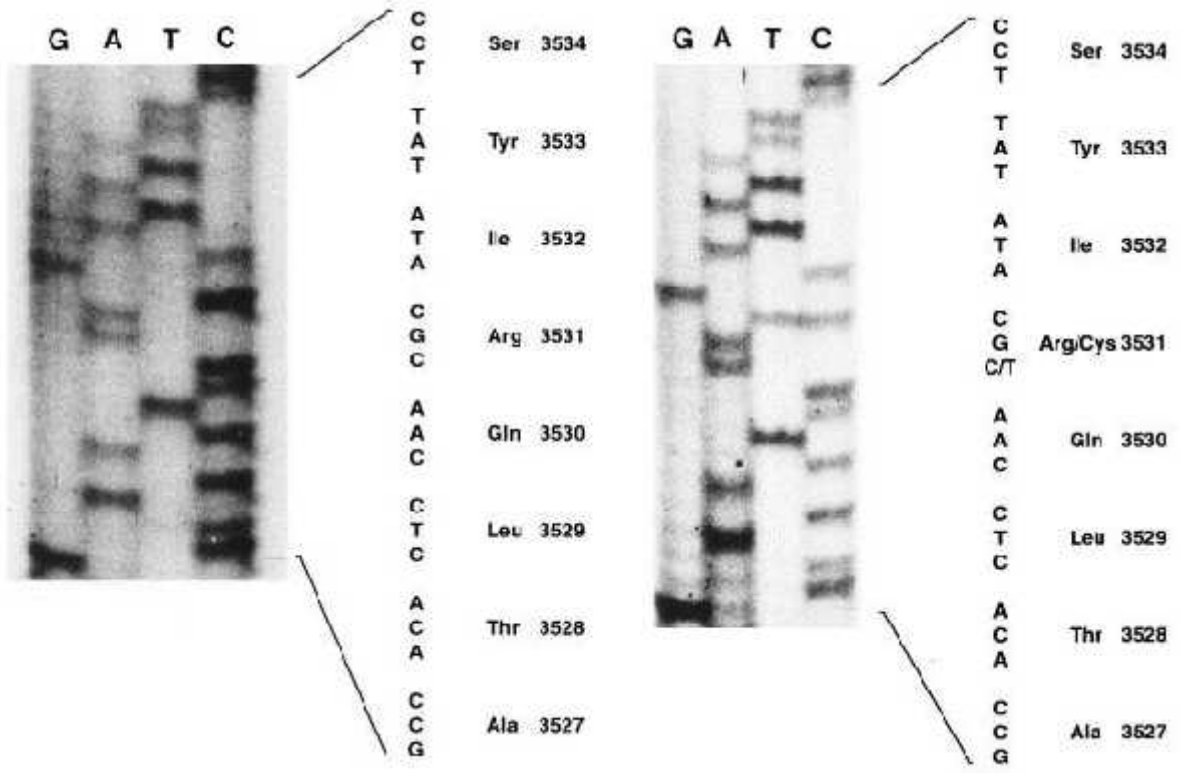
Оптималната должина на единчните нишки на DNK е од 150 – 200 нуклеотиди. Нишки подолги од овие покажуваат релативно помалку конформациски промени со промена на единечна база, додека пократки нишки примаат конформациски промени многу полесно. Со ваква должина 70 – 90% од супституциите на единечни бази се лесно видливи со SSCP методот.

Неколку студии имаат покажано дека употреба на SSCP – методот на различни температури, но најтипични температури се собна температура или 4°C(Целзиус) со употреба на 50 или 100 mL/L глицерол. Малите региони настанати од бази кои се спаруваат и кои се одговорни за конформацискиот полиморфизам на единечните нишки, најчесто имаат температура на топење околу вредноста на собната температура. Најчесто електрофорезата се одвива на гелови во климатизирана просторија со просечна температура од околу 22°C(Целзиус) со дозволени флуктуации на температурата помеѓу 20 и 25°C(Целзиус).

Како денатурирачки агенси најчесто се користат формамид, натриум хидроксид, уреа или метилжива хидроксид.

Еден од најчестите гелови при SSCP на DNK фрагменти е акриламидот. Најчесто должината на гелот е помеѓу 5 и 50 центиметри. Најчесто резултатите се читаат со „голо око”, па потребна е определена видлива резулуција. Долга електрофореза т.е. гел со поголема должина е потребен за диференцирање на многу мали разлики во фракциите на DNK фрагменти. Но, од друга страна т.н. долги електрофорези имаат негативна одлика што за нивно изведување се потребни поголеми апаратури, поголем напон на електричната струја која се употребува и посложен аранжман кон уредување на просторијата и температурата во истата. Меѓутоа, со цел да се избегнат лажно-негативни резултати, потребно е изведба на електрофореза на гел со поголема должина.

Најчесто употребуван метод за детекција на SSCP е авторадиографијата. Други методи кои се можни за употреба, но сепак имаат некои особини кои треба да се доработат се боење со сребро “Silver Staining” или пак употребата на флуоресцентен етидиум бромид. Кај авторадиографијата најчесто се работи за употреба на радиоактивен изотоп ^{32}P, инкорпориран за време на PCR процесот. Негативна особина на овој процес е тоа што се работи со радиоактивни материи. Од друга страна употребата на етидиум бромид е ограничена бидејќи има поголем афинитет кон DNK со две нишки, па не може да се употребува при SSCP т.е. за единечни нишки. Исто така, при употреба на гелови со поголеми должина, нивната манипулација при детекцијата со некоја од техниките е во мала мера отежната токму поради големината.



Сл.15. Авторадиограф на секвенца на нуклеотиди во кодоните 3527–3534 на АроВ ген. Покажана е DNK на човек без мутации во кодон 3531 од левата страна на сликата и од десната страна е покажана DNK на човек хетерозигот со мутација на apo B R3531C.

Fig.15. Autoradiograph, showing the nucleotide sequences in codons 3527–3534 of the apo B gene. Left, DNA from individual with no mutation in codon 3531; right, DNA from individual heterozygous for apo B R3531C.

Сензитивноста PCR-SSCP методот е приближно околу 80-90%.

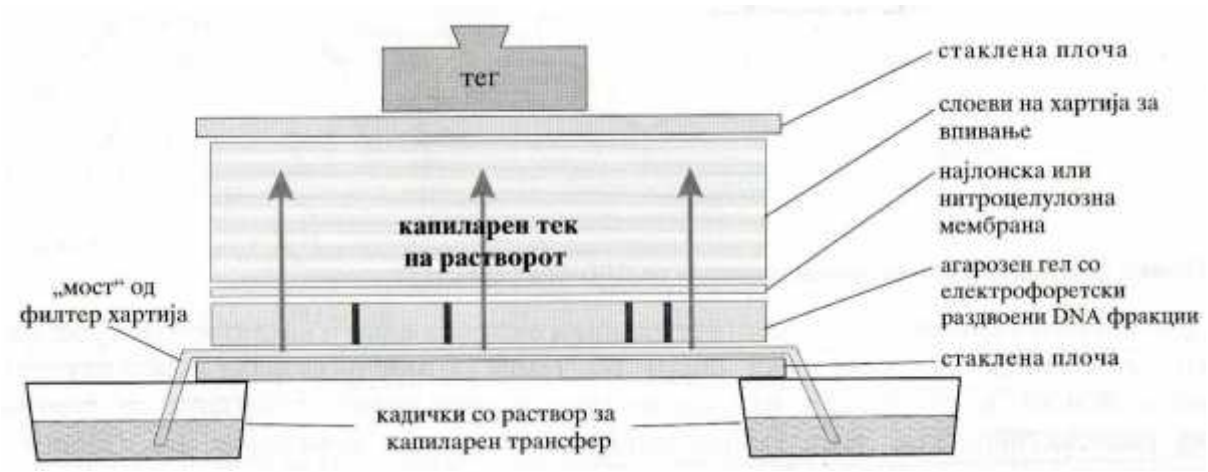
❖ Генерални принципи на Southern Blotting - метода

Методот при кој електрофоретски раздвоените DNK фрагменти се пренесуваат од гелот врз мембраната и се детектираат преку хибридизација со специфична проба се означува како Сатерн блотинг (Southern Blotting) (Панев, 2003). Терминот на оваа метода потекнува од пронаоѓачот на оваа метода Едвин Сатерн (Edwin Southern, 1975) и зборот Blotting(впивање) што го означува процесот на капиларно впивање на DNK фрагментите од гелот врз мембраната. Сатерн блотинг (Southern Blotting) ги вклучува техниките на DNK хибридизација и на рестрикциска дигестија. Целта на оваа анализа е специфична детекција на одредена нуклеотидна секвенца во испитуваниот ген или друг DNK регион. Притоа се добива информација за молекулската маса на испитуваниот DNK молекул. Постапката на Сатерн блотинг – Southern Blotting методот се одвива преку следните 5 фази:

1. Ензимска дигестија на DNK примерокот – дигестијата може да се врши на геномска, амплифицирана или кодирана DNK со една или повеќе рестрикциски ендонуклеази. Бројот на фрагментите на DNK кои се јавуваат по дигестијата зависи од DNK примерокот и од тоа колку рестрикциски позиции се наоѓаат на секој DNK молекул. Типичните ендонуклеази со нивното дејствување предизвикуваат илјадници фрагменти со различна големина.
2. Раздвојување на DNK фрагментите со електрофореза во агарозен гел.
3. Трансфер на DNK фрагментите од гелот врз соодветна мембрана – по процесот на електрофореза, дигестираните DNK фрагменти во гелот се денатурираат со алкален раствор и едноверижните фрагменти се трансферираат врз најлонска или нитроцелулозна мембрана. Овој трансфер најчесто се прави со капиларно движење (впивање) на растворот низ гелот кој ги пренесува DNK фрагментите врз мембраната. По капиларниот трансфер, на најлонската мембрана се наоѓаат врзани DNK фракциите. Шематски приказ на стандарден капиларен трансфер на DNK фрагменти од електрофоретскиот гел врз мембрана е прикажан на слика 15. Потоа таа се суши и експонира на UV – светлина или се инкубира во сув инкубатор на 80°C (Целзиус) за да дојде до ковалентно врзување на DNK молекулите. Фиксацијата на DNK фрагментите на нитроцелулозната мембрана може да се врши само со експозиција на 80°C (Целзиус) во вакуум поради експлозивноста на составот на оваа мембрана на оваа температура. Со користење на вакуум апарати се олеснува и протокот на течноста, а со тоа и времето на трансферот на DNK фрагментите од гелот врз мембраната е значително покусо. Мошне често се применува техниката на електротрансфер каде што се применува електрофоретски принцип сличен на стандардната DNK електрофореза. Исто така мошне често наоѓа примена методот „сув блотинг” при што не се применува поголем волумен на раствор за трансфер, туку се користи веќе присутниот раствор во агарозниот гел. Шематски приказ на „сув блотинг” е прикажан на слика број 16. Трансферот на DNK фрагменти не е толку ефикасен како кај стандардниот капиларен блотинг, оваа техника е значително побрза, поедноставна и поевтина. Истата се применува кога постојат поголем

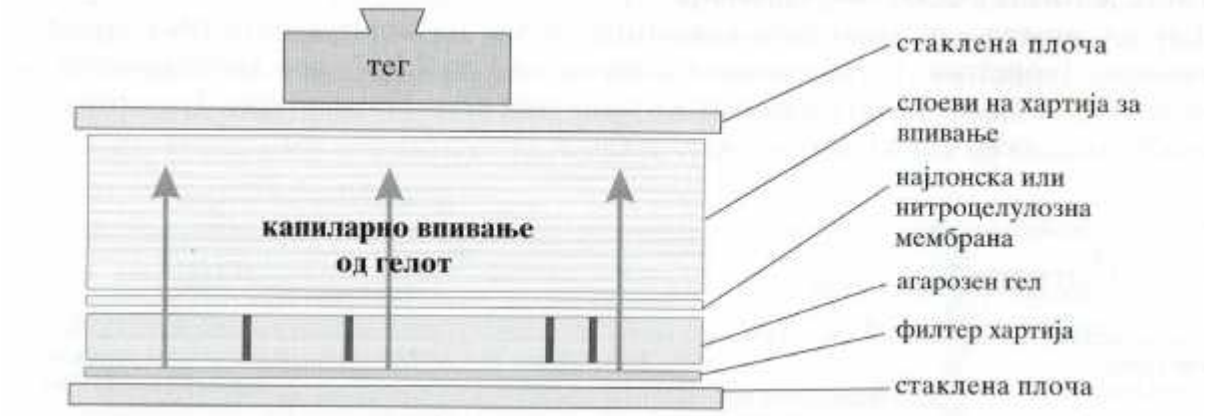
број DNK копии во испитуваниот примерок. Техниката на „сув блотинг" не се препорачува кога се работи за детекции кои се чувствителни, особено кога се работи за т.н. единечни алели присутни само по една копија во геномот.

4. Предхибридизација – предхибидизација со инкубација во раствор што го „блокира" вишокот на врзни места. Ова се прави со цел да се спречи неспецифично врзување на DNK пробата врз површината на мембраната која при трансферот не се пренесле и не се врзале DNK фракциите од гелот. Како раствори за блокирање се користат повеќе рецептури од кои најкористени се рецептурата според Денхарт (Denhard, 1966) и според Чарч и Гилберт (Church & Gilbert, 1984).
5. Хибридизација со специфична DNK проба – мембраната со DNK фракциите се инкубира во присуство на DNK проба која е двоверижен молекул со должина од 50 до повеќе од 100 базни парови, добиен со молекуларно клонирање или со PCR амплификација. Претходно DNK пробата се денатурира, бидејќи е двоверижна и тоа непосредно пред хибридизацијата со цел едната верига да биде способна за хибридирање (анилирање) со испитуваните DNK фрагменти пренесени од гелот врз мембраната. DNK пробата мора да содржи доволно долга секвенца која е комплементарна со делот од испитуваните DNK фрагменти врзани со мембраната.



Сл.16. Шематски приказ на стандарден капилер трасфер на DNK фрагменти од електрофоретски гел врз мембрана.

Fig.16. Schematic display of standard capillary transfer of fragments of DNA from electrophoresis gel to the nylon membrane.



Сл.17. Шематски приказ на „сув блотинг" на DNK фрагменти од електрофоретскиот гел врз мембрана.

Fig.17. Schematic display of "dry blotting" of fragments of DNA from the electrophoresis gel to the nylon membrane.

Потоа следува процес на детекција на DNK пробите. Постојат неколку видови на детекција. Еден од нив е со претходно инкубирање на мембраната со DNK пробите со стрептавидин-алкална фосфатаза. По процесот на инкубација со овој агенс и испирање, DNK пробите можат да се детектираат со хромоген супстрат за алкалната фосфатаза или пак со употреба на хемилуминисцентен супстрат за алкалната фосфатаза. При употреба на хромоген за алкална фосфатаза, на крајот на реакцијата се добива обојување на DNK лентите на мембраната. Потоа мембраната се суши и се скенира/фотографира. При употреба на хемилуминисцентен супстрат за алкалната фосфатаза се добива луминисценција како резултат на хемиска реакција, па во темна комора врз мембраната се поставува рендгенски филм со соодветни димензии. Овој фотографски филм се експонира на луминсценцијата од мембраната, па по експозицијата филмот се развива. Филмот се дензитометрира или се скенира со скенер со модул за транспарентно скенирање.

За да се определи прецизната големина (во базни парови) на развиените ленти на Southern Blotting- методата, фотографиите или скенираните слики се споредуваат со позициите на DNK фрагментите на маркерот од фотографијата на гелот обоен со етидиум бромид пред трансферот. Оваа процедура е препорачливо да се врши компјутерски со употреба на соодветен софтвер.

- Генерален принцип на Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) – методата

Овој метод створен од страна на фирмата MRC-Holland од Холандија, е релативно едноставен и робустен мултиплекс- PCR метод кој се користи за детекција на промена на бројот на копии на хромозомална DNK, истовремено на повеќе таргет места. Принципот на оваа метода се базира на идентификација на таргет секвенцата со помош на хибридизација со MLPA – проби кои се поврзуваат на секвенците кои се наоѓаат до таргет секвенцата и кои можат да бидат поврзани со лигациска реакција. Со цел да се направи

копија од секоја таргет секвенца, во пробата со испитувана DNK се додаваат специфични MLPA проби за секоја од секвенците која е во интерес на анализата. Секвенците потоа се симултирано амплифицирани со употреба на еден пар на прајмери, што резултира со мешавина на амплификациски продукти. Во оваа мешавина на амплифицирани продукти, секој PCR продукт на секоја од MLPA пробите е со уникатна должина. Еден од PCR прајмерите е обележан со радиоактивен изотоп или е флуоресцентен, со цел продуктите на MLPA реакцијата да се визуелно обележани при процесот на електрофореза. Крајниот резултат е хроматограм кој покажува фрагменти со различна големина започнувајќи од 130 базни парови до 490 базни парови. Врвниот дел од овој хроматограм на секој амплификациски продукт ја рефлектира реалната бројка на копии од таа таргет секвенца. Со споредба на профилот на електрофореза на примерокот на DNK кој го испитува со контролен примерок ни овозможува детекција на делеции или дупликации на геномските региони кои ни се од интерес на испитување.

- Генерален принцип на DNK секвенционирање – DNA Sequencing

Овој метод го означува процесот на детерминирање на редоследот на нуклеотидните бази, одејќи по должината на DNK нишката. Од откривањето на структурата на DNK, па сè до денес се развиени две одделни методи за секвенционирање на DNK и тоа Chain Termination Method и Chemical Degradation Method. И двата метода се еднакво популарни, но Chain Termination Method е методот кој најмногу се користи. Овој метод е базиран на принципот дека молекулите на единечна нишка на DNK кои варираат во должина дури и за една нуклеотидна база, можат да бидат одделени од друга со употреба на полиакриламид гел електрофореза.

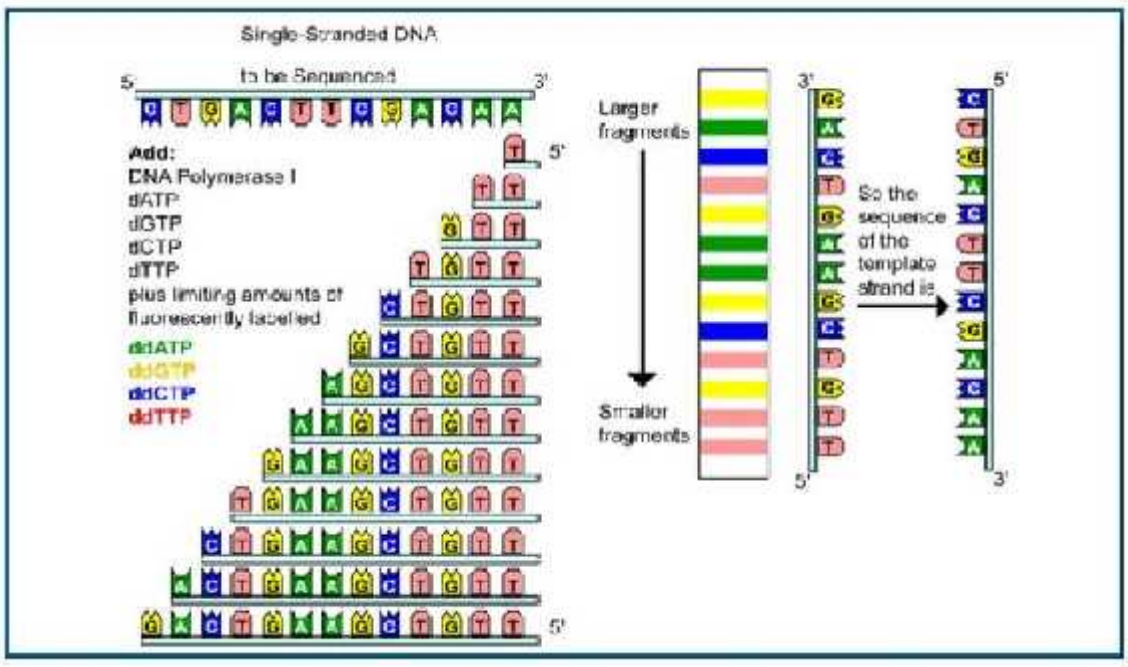
DNK молекулата која се секвенционира се нарекува шаблон DNK (template DNA) и е подготвена како единечна нишка на DNK. Потоа кратки олигонуклеотиди се поврзани на истите места, позиции на секоја од шаблон DNK единечните нишки. Овие олигонуклеотиди дејствуваат како прајмери и помагаат за синтеза на нишка на DNK, која е комплементарна со шаблон DNK единечната нишка. Оваа техника бара 4 нуклеотидни специфични реакции (за гванин, аденин, цитозин и тимин) да бидат изведени на 4 идентични примероци на DNK. Овие 4 секвенционирачки реакции бараат додавање на потребните компоненти за синтеза на нова DNK:

1. DNK – шаблон (Template DNA);
2. Прајмер на кој е додаден радиоактивен изотоп или хемикалија со способност за емитирање на светлина;
3. DNK полимераза – ензим потребен за синтеза на DNK;
4. 4-те основни бази, дезоксинуклеотиди: аденин, гванин, цитозин и тимин (G, A, C, T);;
5. 1 дидезоксинуклеотид ddG, ddA, ddC, или ddT.

Откако првиот дезоксинуклеотид е додаден во растечката комплементарна секвенца, DNK полимеразата се движи по должината на шаблон DNK единечната нишка и додава база по база. Реакцијата на додавање на бази и

синтеза на единечната нишка продолжува сè додека дидезоксинуклеотидот не е додаден што ја блокира натамошната елонгација на единечната нишка. Ова е затоа што кај дидезоксинуклеотидот недостасува специјална група на молекули 3´ хидроксилна група која што е потребна за формирање на конекција со наредниот нуклеотид. Во реакцијата е додадено само мало количество на дидезоксинуклеотиди што овозможува различни реакции да се одвиваат за различен временски период, поконкретно сè додека DNK полимеразата не го инсертира дидезоксинуклеотидот со што ја завршува реакцијата на елонгација. Така се добиваат нови единечни нишки кои се со различна должина.

За да се прочитаат овие новосозададените DNK секвенци, продуктите од четирите реакции се пуштаат на полиакриламиден секвенционирачки гел. Условно кажано „фамилијата" на молекули создадени во присуство на ddATP се поставени на една од четирите ленти од секвенционирачкиот гел, додека „фамилиите" создадени со присуство на ddCTP, ddGTP, и ddTTP се поставени на останатите 3 ленти од секвенционирачкиот гел. После електрофорезата, DNK секвенците можат да бидат прочитани директно преку позициите на лентите на гелот.



Сл.18. Шематски приказ на DNK секвенционирање по методот –" Chain Termination".

Fig.18. Schematic display of Chain Termination DNA Sequencing.

Повеќе варијации се развиени од оваа метода за апарати за автоматско секвенционирање. Еден од овие варијации е „Cycle Sequencing", каде што дидезоксинуклеотидите се тагирани со различни флуоресцентни бои, а не прајмерите. Притоа сите четири реакции се одвиваат на исто место и се одвојуваат на една лента во секвенционирачкиот гел. Со помош на детектор се

откриваат соодветните бои како што DNK фрагментот се движи и се овозможува да се реконструира секвенцата шемата т.е. редоследот на боите.

1.8. Превенција кај фамилијарната хиперхолестеролемија

Третманот и превентивните мерки кај фамилијарната хиперхолестеролемија се за цел живот. Самиот третман вклучува употреба на лекови, но и промена на стилот на живеење, кои имаат за цел намалување на нивото на холестеролот и намалување на ризикот од атеросклероза, заболувања на срцето, како и периферни васкуларни и церебрално-васкуларни заболувања. Пациентот со дијагностицирна фамилијарна хиперхолестеролемија потребно е да преземе превентивни мерки како на пример промени во стилот на живеење:

1. Доколку е пушач, веднаш да престане со пушењето;
2. Физички активности, вежбање најмалку 30 минути на ден, најмалку 6 дена во неделата;
3. Здрава исхрана со употреба на овошје, зеленчук и мешункасти растенија кои се особени богати со растителни влакна и имаат многу малку заситени масти во себе;
4. Одржување на нормална телесна тежина, а доколку тежината е поголема, тогаш мора да се нормализира т.е. ослабнување;
5. Намалување на стресните состојби и ситуации;
6. Доколку пациентот е со дијабетис, висок крвен притисок или слични хронични состојби, потребна е соработка и следење на состојбата од страна на стручни медицински лица.

Водењето на здрав живот е мошне важно во превенција и третирање на атеросклерозата. Употребата на лекарства за намалување на холестеролот е важен фактор во превенцијата и третманот на оваа болест. Постојат повеќе лекови кои го намалуваат нивото на холестеролот. Од нив најчесто употребувани се:

- Статини – ова се медикаменти кои лесно се употребуваат и имаат многу малку интеракции со други лекови. Како странични ефекти се јавуваат миозитисот (инфламација на мускулите), болка во зглобовите, вознемирен стомак и оштетувања на црниот дроб. Кај женски индивидуи кои се бремени, не треба да земаат статини како и лица кои имаат оштетување на црниот дроб. Постојат повеќе видови на статини како на пример: Lovastatin (Mevachor), Pravastatin (Pravachol), Rosuvastatin (Crestor), Simvastatin (Zocor), Atorvastatin (Lipitor), Fluvastatin (Lescor).
- Ниацин (никотинска киселина) – понекогаш во препишана форма од страна на лекар, ниацинот се користи за намалување на LDL-холестеролот, но најмногу може да биде ефикасен во зголемување на нивотото на HDL- холестеролот т.е. добрата форма на холестерол. Страничните ефекти на овој лек се: црвенило и црвенило на лицето (кое може да се регулира со пиење на аспирин 30 минути пред да се консумира овој лек), вознемиреност на стомакот, главоболка, вртоглавица, замаглен вид и оштетување на црниот дроб. Овој лек мора

да се прима строго со надзор на матичниот лекар и не треба да се земаат диетарни суплементи на ниацинот, бидејќи и тие имаат странични ефекти.

- Секвестранти (адитиви) од жолчни киселини – се користат за намалување на високите концентрации на LDL – холестеролот. Странични ефекти се абдоменални отоци, констапација, ждригавица и покачени триглицериди. Кај луѓе со покачени триглицериди, употребата на овој медикамент е забранета. Има поголем број вакви лекови како на пример: Cholestyramine (Prevalite, Questran), Colestipol (Colestid), Colesevelam (WelChol).
- Инхибитори на апсорбцијата на холестеролот – ваквите медикаменти го лимитираат апсорбирањето на LDL-холестеролот во интестиналниот тракт. Странични ефекти од овој медикамент се: главоболка, наузеа, слабост во мускулите. Ваков медикамент е Ezetimibe (Zetia) кој најчесто се комбинира со друг лек како што е Vytorin.
- Фибрати (деривати на фибрична киселина) – медикаменти кои се користат за третман на високите концентрации на триглицериди и на ниското ниво на HDL - холестерол. Овој лек најмногу се препорачува за лица со покачени триглицериди и намален HDL – холестерол, кои не можат да го користат ниацинот. Странични ефекти на овој лек се миозитис (инфламација на мускулите), вознемирен стомак, чувствителност на сонце, појава на неправилна работа на срцето – аритмија, појава на жолчни камења и оштетување на црниот дроб. Вакви медикаменти се: Gemfibrozil (Lopid), Fenofibrate (Tricor, Lofibra).

Кај овие пациенти честа појава е хипертензијата. Чести лекови кои се користат за третман на високиот крвен притисок се:

- Бета блокери – кои ја намалуваат работата на срцето и се намалува бројот на удари на срцето, а со тоа количината на крв која ја испумпува срцето. Овие медикаменти ги намалуваат и стрес хормоните во телото со што се овозможува релаксација на крвните садови. Вакви лекови се: Atenolol (Tenormin), Bisoprolol (Zebeta), Metoprolol (Lopressor, Toprol XL), Nadolol (Corgard), Timolol (Blocadren), Nebivolol (Bystolic).
- Инхибитори на ангиотензин конвертирачки ензим (ACE) – се медикаменти кои го блокираат дејството на ангиотензинот кој го формира телото, што овозможува да се спречи намалување на протокот на крвта преку крвните садови. Со релаксација на крвните садови, протокот на крвта се намалува, а со тоа и крвниот притисок. Вакви лекови се: Captopril (Capoten), Benazepril (Lotensin), Enalapril (Vasotec), Lisinopril (Prinivil, Zestril), Fosinopril (Monopril), Ramipril (Altace), Perindopril (Aceon), Quinapril (Accupril), Moexipril (Univasc), Trandolapril (Mavik).
- Блокери на калциум каналот – се медикаменти кои ги релаксираат крвните садови и го намалуваат крвниот притисок со блокирање на влегувањето на калциумот во клетките на срцето и артериите. Страничните ефекти на овој медикамент се констапација, наузеа и главоболка. Сокот од грејпфрут има интеракција со некои вакви лекови и не е препорачлив за консумирање кај пациенти кои земаат вакви лекови. Вакви лекови се: Amlodipine (Norvasc), Bepridil (Vascor), Diltiazem

(Cardizem), Felodipine (Plendil), Nifedipine (Adalat, Procardia), Nicardipine (Cardene), Verapamil (Calan, Isoptin).

- Блокери на ангиотензин II рецепторот (ARBs) – медикаменти кои го блокираат дејството на ангиотензинот во телото и го намалуваат крвниот притисок со тоа. Оваа група на медикаменти се употребуваат кај пациенти кои не можат да ги земаат инхибиторите на ангиотензин конвертаза ензимот (ACE) инхибиторот. Вакви лекови се: Candesartan (Atacand), Eprosartan (Tevetan), Irbesartan (Avapro), Losartan (Cozaar), Telmisartan (Mycardis), Valsartan (Diovan).
- Диуретици – оваа група на медикаменти помага на организмот да се ослободи од натриумот и водата. Со тоа се намалува волуменот на крвта, а со тоа и крвниот притиск. Постојат 3 вида на диуретици: тиазиди, диуретици кои делуваат на Henle-овата петелка во бубрезите и диуретици кои делуваат на калиумот и не дозволуваат негово излачување во уринатa. Тиазидните диуеретици можат да го намалат нивото на калиум, но можат да го зголемат нивото на холестерол и шеќер. Ваков диуретик е Hydrocholorothiazide. Втората група на диуретици кои дејствуваат на Henle-овата петелка во бубрезите исто така имаат тенденција да го намалат нивото на калиум. Вакви диуретици се Furosemide (Lasix) и Bumetanide (Bumex). Во третата група на диуретици што го конзервираат калиумот спаѓаат Amiloride (Midamor) и Triamterene (Maxzidel).

Честа е препораката за употреба на лекови кои ја разредуваат крвта, антикоагуланти. Овие лекови се употребуваат за превенција од формирање на коагуланси. Има поголем број на вакви лекови како:

- Аспиринот (Aspirin) – кој се препорачува за спречување на исхемични напади, удари и срцеви напади.
- Тиклопидин (Ticlodipine) – претставува замена на аспиринот за луѓе кои не можат од било какви причини, пример алергии и сл. да го земаат аспиринот. Но, овој медикамент има повеќе странични ефекти отколку аспиринот.
- Дипиридамол (Dipyridamole) – нема некој силен ефект, но се употребува во комбинација со аспиринот или варфиринот (warfarin).
- Клопидогрел (Clopidogrel) – го редуцира ризикот од срцев удар.
- Антагонисти на гликопротеин IIb/IIIa рецепторот (Glycoprotein IIb/IIIa receptor agonists) – се употребуваат кај пациенти кои чекаат на изведување ангиопластија.
- Хепарин (Heparin) – антикоагулант.
- Варфирин (Warfarin) - често се дава кај пациенти по срцев напад.

Кај пациенти кај кои имаме атеросклеротични промени кај одредени артериски крвни садови често се потребни и хируршки или слични интервенции. Одреден број хируршки или нехируршки процедури можат да бидат спроведени во зависност кои артериски садови се зафатени.

Нехируршки процедури :

- Ангиопластија (Angioplasty)– процедура за проширување на артериски крвни садови кои се стеснети поради атеросклеротични промени. Хирургот инсертира во катетер со балон во засегнатата артерија. Кога ќе пристигне со катетерот на местото каде артеријата е стеснета, хидраулички го дува овој балон со што стеснетото место го проширува, по што балонот се празни и се вади катетерот, а на местото по потреба се става и стент кој ќе ја држи артеријата отворена и протокот на крв слободен.
- Атероктомија (Atherectomy)– е минимално инвазивна процедура која се состои од отстранување на наслагите во артериските крвни садови со ласерски катетер или други слични направи за таа цел.

Хируршки процедури:

- Бајпас процедура (Bypass surgery) – хируршка процедура каде хирургот зема крвни садови од некој друг дел на телото или вештачки крвни садови со цел да го пренасочи крвотокот околу затнатите артериски крвни садови.
- Минимално инвазивна бајпас хирургија (Minimally invasive bypass) – хирургот користи минимални резови на одредени делови од телото наместо стандардната бајпас хирургија каде има отварање на градниот кош.
- Ендартеректомија (Endarterectomy) – процедура која се користи за отстранување на атероматозните наслаги во каротидната и перферните артерии.

Употреба на комплементарни и алтернативни терапии:

- Нутритивна и суплементарна терапија – за да се намали концентрацијата на холестерол, да се намали високиот крвен притисок и гојазноста/дебелината потребно е стекнување на здрави навики за јадење. Тоа подразбира ставање на диета која го намалува внесувањето на мрснотии во организмот, замена на мастите и маслото кое се користи нормално во сите кујни со добри несатурирани масти кои можат да се најдат кај маслото од маслинки. Се препорачува употреба на зеленчук, овошје, зрнеста храна, млечни продукти кои се без или со минимално количество на масти, месо без мрснотии, пилешко месо, морски плодови, риба, семиња, плодови со тврда обвивка, како на пример лешници, ореви, потоа плодови од легуминозни растенија, како на пример грав, грашок и слично.
- Диети за пациенти со висок крвен притисок – кај овие лица е потребно ограничување на внесувањето на сол во организмот, поточно на натриумот. Исхраната треба да се базира на овошје, зеленчук, млечни продукти без масти или со многу малку масти и други видови на храна богати со калиум, магнезиум и калциум. Покрај ова се препорачува слабеење т.е. намалување на телесната тежина, физичка активност и намалување на внесување на алкохол.

- Суплементи и витамини – за користење на овие продукти потребна е претходна консултација со матичниот доктор. Во ова група спаѓаат:

❖ Фолна киселина, витамин Б6, витамин Б12 - Б-витамините помагаат на организмот во метаболизмот на хомоцистеин, аминокиселина која е поврзана со зголемениот ризик од срцеви заболувања и ударите. Исто така се претпоставува дека оваа аминокиселина помага во процесот на атеросклероза преку оштетување на артериите а со тоа и формирање на крвни коагулуми, меѓутоа ова сè уште не е потврдено со конкретни докази. Со земање на Б-витамините не се знае колкав ефект тие имаат на ризикот од атеросклероза и срцевите заболувања. Но, потврдено е дека земање на големи дози на Б-витамини, значително го намалува прогресот на почетна фаза на супклиничка атересклероза. Фолната киселина исто е со заштитен ефект кон атеросклерозата, но таа може потенцијално да има интеракција со други медикаменти и затоа пред употреба на фолна киселина потребна е консултација со доктор.
❖ Омега – 3 масни киселини – овие масни киселини присутни во месото од риба, делуваат превентивно против атеросклерозата кај пациенти со оваа дијагноза, бидејќи спречуваат создавање на наслаги и крвни коагулуми. Освен ова, тие го намалуваат нивото на триглицеридите, го намалуваат крвниот притисок и делуваат заштитно против појава на срцеви заболувања.
❖ Бета ситостерол – претставува растителен стерол кој делува на тој начин што ја сопира апсорпцијата на холестеролот во интестеналниот тракт. Бета ситостеролот го намалува нивото на LDL-холестеролот, но може да го намали нивото на апсорпција на бета каротинот и витамин Е.
❖ Калиум – калиумот е потребен за одржување на нивото на електролити и за нормална функција на нервниот систем.
❖ Поликозанол – поликозанол е мешавина од восочни алкохоли кои потекнуваат од шеќерната трска и сладок тропски компир. Поликозанолот го намалува LDL-холестеролот, а во некои ситуации и го зголемува HDL-холестеролот. Старничен ефект кај овој препарат е тоа што го зголемува ризикот од крварење, па луѓето кои имаат проблеми со коагулацијата, треба да внимаваат со овој препарат.
❖ Витамини антиоксиданти – овде спаѓаат бета каротинот, витамин Ц, витамин Е. Бета каротинот кој го има во жолтите, портокалови и темно-зелени зеленчуци. Со внесување на бета каротинот преку овие овошја, може да се намали ризикот од атеросклероза. Витаминот Ц исто така влијае поволно на организамот и заштитно од срцеви заболувања. Дејството на витаминот Е врз срцето и срцевите заболувања кај пациенти со покачен холестерол сè уште се испитува.
❖ Селен – одредени студии покажале дека кај луѓе кои внесувале поголеми количини на селен со исхраната, имале помал ризик од развивање на срцеви заболувања. Но, други студии покажале дека кај луѓе кои во подолг временски период примале селен, имале големи шанси за развивање на дијабетес тип 2. Исто така селенот може да интерферира со други медикаменти и суплементи на селенот може да влијаат на фертилноста кај мажите преку намалување на мобилноста на спермата.

- ❖ Коензим Q10 – истражувачите веруваат дека коензим Q10 ја инхибира коагулацијата на крвта и ги покачува нивоата на антиоксиданти во крвта кај организмот. Меѓутоа треба да се испита влијанието на коензим Q10 врз атероскелрозата. Овој коензим може да интерферира со одредени медикаменти како на пример медикаменти за притисок, антикоагуланси и сл.
- ❖ Полифеноли – полифенолите се супстанции најдени кај растенијата со антиоксидативни својства. Флавоноидите како кверцетинот, ресвератрол и катехинот можат да го намалат ризикот од атеросклероза.
- ❖ Витамин Д - одредени студии укажуваат на протективното дејство на витаминот Д од срцевите заболувања. Недостигот од витамин Д е асоцирана со зголемен ризик од срцеви заболувања.

Одредени растенија со нивните плодови, семки или пак екстракти од нив, можат поволно да влијаат на состојбата и превенцијата кај луѓе со фамилијарна хиперхолестеролемија. Такви на пример се:

- Глог (Crataegus monogyna) – глогот се употребува во традиционалната медицина за кардиоваскуларни заболувања. Глогот содржи полифеноли, има антиоксидативно дејство и спречува формирање на наслаги. Исто така го намалува високиот холестерол и високиот крвен притисок.
- Лукот (Allium sativum) – лукот и суплементи на лукот го намалуваат високиот холестерол, делуваат превентивно против создавање на крвни коагулуми и ги уништуваат наслагите во крвните садови.
- Екстракт од листови од маслинка (Olea europaea) – го намалува холестеролот и високиот крвен притисок кај луѓе со средно покачен крвен притисок. Меѓутоа потребни се уште истражувања за целосно да се потврдат овие факти.
- Тегавец (Plantago psyllium) – растителните влакна кои постојат кај ова растение влијаат на намалување на холестеролот и на нивото на шеќерот во крвта.
- Црвен ферментиран ориз – претставува ориз кој е култивиран во присуство на мувла (Monascus purpureus). Црвениот ферментиран ориз може да го намали холестеролот и ова растение може да биде дури и како замена на лековите од групата статини.
- Гугул (Commiphora mukul) – е цветно растение од фамилијата Burseraceae во Северна Африка и централна Азија. Ова растение го намалува холестеролот, но делува само кај индиското население, додека ефектот на ова растение отсуствува кај луѓе кои се хранат со модерна исхрана (храна богата со маснотии). Ова растение може да има ефекти на организмот како хормонот естроген, па треба да се внимава кај луѓето кои имаат проблеми со хормони.

2.0. Цел на специјалистичкиот труд

(The goal of the specialized labor)

- Проценка на ризикот од појава на фамилијарна хиперхолестеролемија кај општата популација на возраст поголема од 18 години во општина Виница со околните села.
- Да се прикажат графички и табеларно лабораториски резултати на пациентите по возраст и пол, кај кои е можна дијагноза за фамилијарна хиперхолестеролемија за временски период од две години 2011-2012 год.
- Проценка на преваленцата на појавата на хиперхолестеролемија кај пациентите од општина Виница со околните села, кои имаат направено соодветни лабораториски испитувања во ПЗУ Дијагностичка лабораторија “Павлина” - Виница за временски период од две години 2011-2012 год.
- Утврдување која популација (машка или женска) е најмногу засегната од хиперхолестеролемијата како болест.
- Утврдување на возрасната структура на која хиперхолестеролемијата клинички се манифестира најчесто.
- Објаснување на можните причини поради кои се јавува хиперхолестеролемијата кај соодветната возрасна или полова група.

3.0. Материјал и метод за работа

(Materials and methods of work)

За изработката на овој специјалистички труд, се користени резултати од биохемиско – лабораториски испитувања од ПЗУ Дијагностичка лабораторија „Павлина“ – Виница и е опфатен временскиот период од јануари 2010 до декември 2011 година, т.е. временски период од 2 години. Испитаните пациенти се од подрачјето на градот Виница и околните села кои се во состав на општина Виница и село Оризари – Кочани. Опфатени се сите социјални и полови структури, а во поглед на возраста на пациентите се испитани пациенти почнувајќи од 12 години, па сè до случаи каде возраста изнесува 90 години. Испитувањата на холестеролот се вршени на биохемиски анализатор Cobas C111 – Roche Diagnostics.

Сл.19. Биохемиски анализатор Cobas C111 – Roche Diagnostics.

Fig.19. Biochemistry analyzer Cobas C111 – Roche Diagnostics.

Апаратот Cobas C111 претставува комплетно автоматизиран биохемиски анализатор од затворен тип. Определувањето на холестеролот се врши со ензимска, колориметриска метода каде што естрите на холестеролот се разложуваат под каталитичкото дејство на холестерол естеразата на слободен холестерол и масни киселини. Потоа ензимот холестерол оксидаза врши оксидацијата на холестеролот до Δ 4 - холестен - 3 – он и H_2O_2. Во присуството на пероксидаза, H_2O_2 врши “оксидативно спојување” на фенол и 4 – аминоантипирин и создавање на црвено обоен комплекс – “red quinine-imine dye”.

Интензитетот на ова црвено обојување е директно пропорционално на концентрацијата на холестеролот, која концентрација се детерминира со мерење на зголемувањето на апсорбанцата.

Интерпретација на резултатите на холестеролот ја раководиме според клиничката интерпретација на резултатите според препораките на Европското друштво за атеросклероза (European Atherosclerosis Society), која е следната:

- Доколку холестеролот е под 5.2 mmol/L и вредностите за триглицеридите се под 2.3 mmol/L, тогаш кај испитаникот нема липидно метаболичко нарушување.
- Доколку вредностите на холестеролот се движат од 5.2 – 7.8 mmol/L и доколку HDL-холестеролот е под 0.9 mmol/l, тогаш може да се каже дека има липидно метаболичко нарушување кај тој пациент.
- Доколку вредностите на холестеролот се над 7.8 mmol/L и вредностите на триглицеридите се над 2.3 mmol/L, и овде кај пациентот може да се потврди дека има липидно метаболичко нарушување.

Бидејќи најголем дел од пациентите кои имаат правено лабораториски анализи во Дијагностичка лабораторија „Павлина“- Виница во перидот од две години и тоа 2010 и 2011 год., ги имаат направено само најосновните лабораториски параметри каде од липидните фракции се испитани холестеролот и триглицеридите. Фракциите на HDL и LDL холестерол поради финансиски причини, пациентите ги немаат направено. Затоа, како основен показател за евентуална хиперхолестеролемија кај пациентите ќе ги користиме вредностите на холестеролот кои ја надминуваат вредноста од 7.8 mmol/L.

Пациентите кои се таргет на ова истражување се поделени во три старосни категории и тоа:

Пациенти до 40 години
Пациенти од 40-60 години
Пациенти над 60 години

Табела.2. Старосни групи на пациентите

Tab.2. Patients by age groups

4.0. Резултати и дискусија (Results and discussion)

Во периодот јануари 2010 до декември 2011 година, во ПЗУ Дијагностичка лабораторија „Павлина“ – Виница, извршени се вкупно 2.376 лабораториски анализи на пациенти каде што е помеѓу другите анализи измерена и концентрацијата на вкупен холестерол. Од вкупниот број пациенти со измерена концентрација на холестерол, 904 пациенти се со концентрација на холестерол повисока од 5.2 mmol/L.

Вкупно пациенти со холестерол поголем од 5.2 mmol/L	904
Вкупен број на пациенти со измерен холестерол	2.376

Таб.3. Приказ на вкупен број пациенти и пациенти со холестерол поголем од 5.2 mmol/L.

Tab.3. Display of total number of patients and total number of patients with cholesterol higher then 5.2 mmol/L

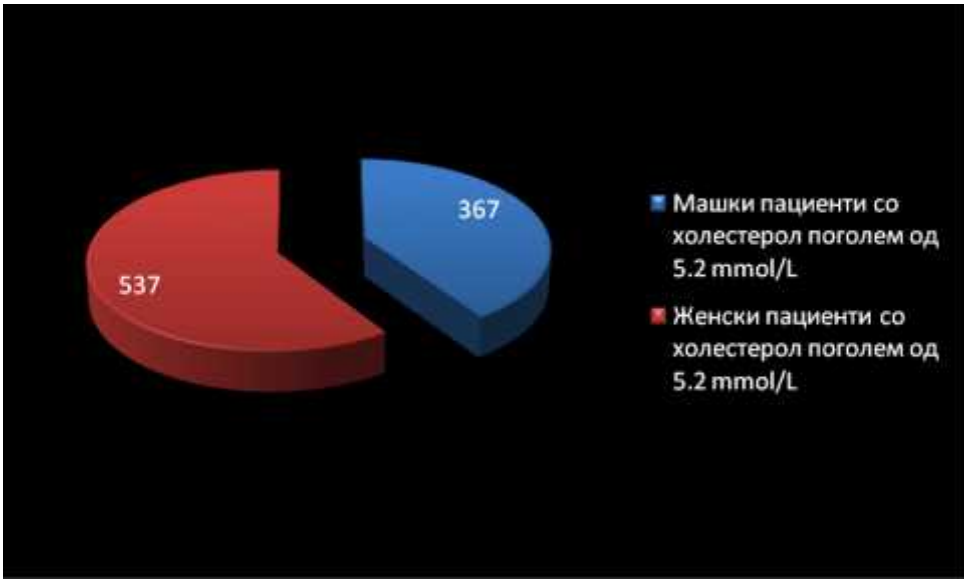
Ова ни покажува дека од вкупниот број пациенти кои дошле и направиле анализа и мерење на концентрацијата на вкупниот холестерол 38.05% од нив имале холестерол кој ја надминува границата од 5.2 mmol/L.

Машки пациенти со холестерол поголем од 5.2 mmol/L	367 (40,6%)
Женски пациенти со холестерол поголем од 5.2 mmol/L	537 (59,4%)
Вкупно пациенти со холестерол поголем од 5.2 mmol/L	904 (100%)

Таб.4. Приказ на вкупниот број пациенти со холестерол поголем од 5.2 mmol/L и половата застапеност.

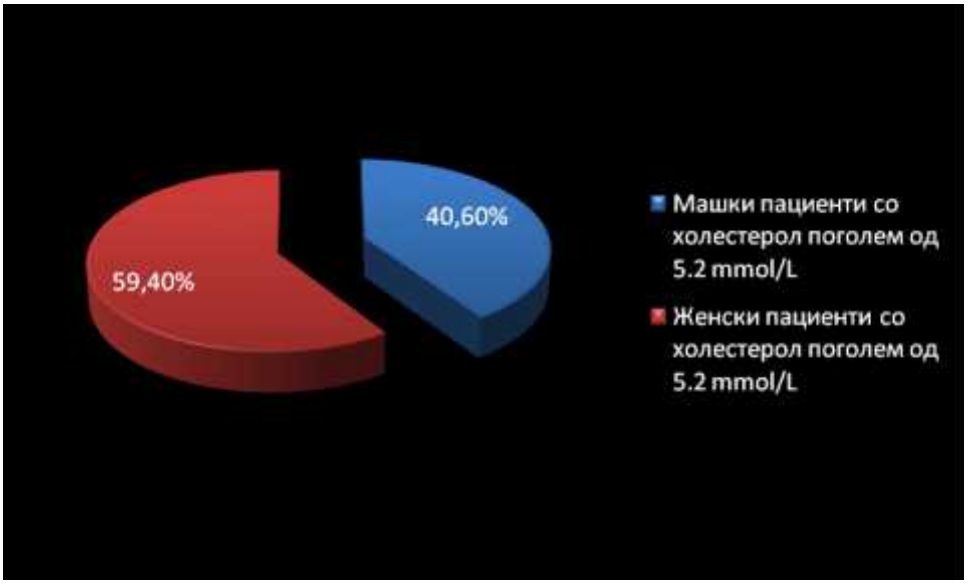
Tab.4. Display of total number of patients with cholesterol higher the 5.2 mmol/L and the sexual representation.

Од овие 904 пациенти со покачен холестерол, 367 или 40.6% се машки пациенти, а 537 или 59.4% пациенти се од женскиот пол како што е прикажано на сл.20. и сл.21.



Сл.20. Графички приказ на половата застапеност кај пациенти со покачен холестерол.

Fig.20. Graphical display of sexual representation of patients with cholesterol higher then normal value.



Сл.21. Графички приказ на пропроциската застапеност на покачениот холестерол помеѓу мажи и жени пациенти.

Fig.21. Graphical display of the proportional representation of elevated cholesterol among male and female patients.

Од вкупниот број пациенти со покачен холестерол 904, вкупниот број пациенти кои имаат холестерол повисок од 7.8 mmol/L е 92. Од овој вкупен број со холестерол повисок од 7.8 mmol/L, машки пациенти има 32, а женски пациенти има 60.

Вкупно пациенти со холестерол > 7.8 mmol/L	92	100%
Машки пациенти со холестерол > 7.8 mmol/L	32	34.78%
Женски пациенти со холестерол > 7.8 mmol/L	60	65.22%

Таб.5. Приказ на вкупниот број и бројот по пол на пациенти со холестерол повисок од 7.8 mmol/L.

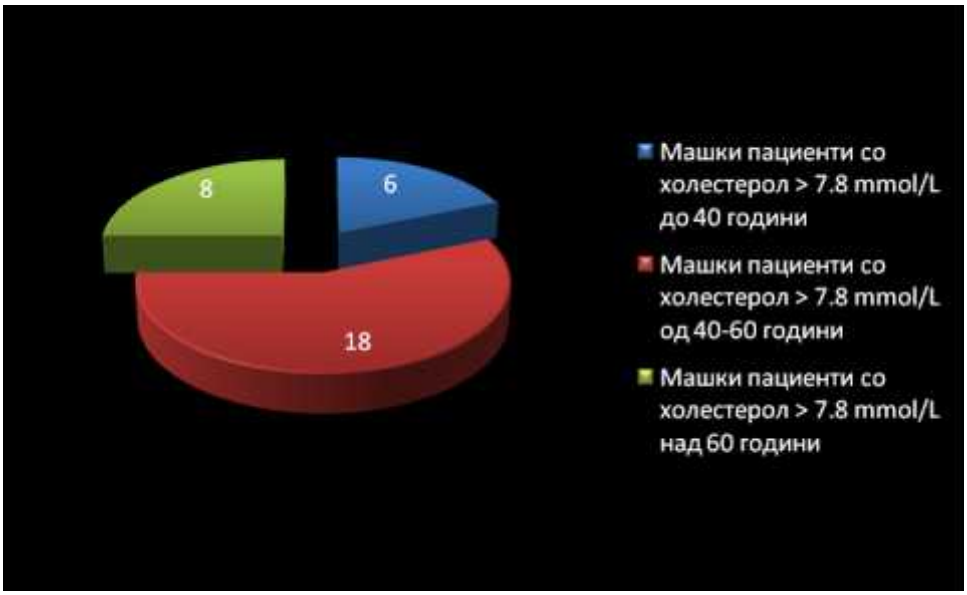
Tab.5. Display of total number and the number of patients by gender, with cholesterol higher then 7.8 mmol/L.

Пациентите од женскиот пол преовладуваат со 65.22%, додека машките пациенти се околу третина од бројот на женските пациенти 34.78%.

Машки пациенти со холестерол > 7.8 mmol/L под 40 год.	6	18.75%
Машки пациенти со холестерол > 7.8 mmol/L од 40 до 60 год.	18	56.25%
Машки пациенти со холестерол > 7.8 mmol/L над 60 год.	8	25%
Вкупно машки пациенти со холестерол > 7.8 mmol/L	32	100%

Таб.6. Приказ на машки пациенти со холестерол повисок од 7.8 mmol/L по возраст.

Tab.6. Display of male patients with cholesterol higher then 7.8 mmol/L by age.



Сл.22. Графички приказ на машките пациенти со холестерол повисок од 7.8 mmol/L по возрасни групи.

Fig.22. Graphic display of the male patients with cholesterol higher then 7.8 mmol/L grouped by age criteria.

Од табела 6 и слика 22, се гледа дека најголем број пациенти со холестерол повисок од 7.8 mmol/L има кај пациенти чија возраст е од 40 до 60 години – 18 или (56.25%), најмалку има пациенти под 40 години – 6 или (18.75%), додека машки пациенти чија возраст е поголема од 60 има само 8 или (25%).

Женски пациенти со холестерол > 7.8 mmol/L под 40 год.	3	5%
Женски пациенти со холестерол > 7.8 mmol/L од 40 до 60 год.	19	31.67%
Женски пациенти со холестерол > 7.8 mmol/L над 60 год.	38	63.33%
Вкупно женски пациенти со холестерол > 7.8 mmol/L	60	100%

Таб.7. Приказ на женски пациенти со холестерол повисок од 7.8 mmol/L по возраст.

Tab.7. Display of female patients with cholesterol higher then 7.8 mmol/L by age

Сл.23. Графички приказ на женските пациенти со холестерол повисок од 7.8 mmol/L по возрасни групи.

Fig.23. Graphic display of the female patients with cholesterol higher then 7.8 mmol/L grouped by age criteria.

Кај пациентите од женски пол, најмногу пациенти со холестерол повисок од 7.8 mmol/L имаме кај пациенти над 60 години – 38 или 63.33%. Потоа следуваат женски пациенти на возраст од 40 до 60 години кои ги има 19 или 31.6% и најмалку пациенти има со возраст до 40 години и тоа 3 или 5%. Главно, најмногу пациенти со холестерол повисок од 7.8 mmol/L, а воедно тоа ни е показател кој ни укажува на можна дијагноза фамилијарна хиперхолестеролемија, имаме кај женската популација.

Кај машката популација имаме случај на пациент со највисок измерен холестерол од 15.24 mmol/L, роден 1960 година. Кај истиот овој пациент се забележани и мошне висока концентрација на триглицеди од 11.40 mmol/L. Друг случај со многу висока концентрација на холестерол е најдена кај пациент роден 1972 година, со измерени 14.47 mmol/L холестерол и концентрација на триглицериди од 4.70 mmol/L. Најмлад машки пациент со висок холестерол е

забележан кај пациент роден 1985 година и кај него концентрацијата на холестерол изнесува 9.04 mmol/L.

Кај женската популација не се забележани вакви екстремни концентрации на холестерол. Највисока концентрација на холестерол е забележана кај пациентка родена 1960 година и истата изнесува 11.00 mmol/L со 5.23 mmol/L концентрација на триглицерди во серумот. Забележани се уште два вакви резултати со високи концентрации на холестерол и тоа кај пациентка родена 1984 година со концентрација на холестерол во серум од 10.30 mmol/L и триглицериди 4.52 mmol/L. Воедно оваа пациентка е најмладата пациентка од женската популација на испитаници со забележан висок холестерол. Другиот случај е кај пациентка родена 1960 година со концентрација од 10.52 mmol/L и концентрација на триглицериди од 5.90 mmol/L.

Мора да се напомене дека во два случаја (се работи за различни фамилии) се сретнати покачени концентрации на холестерол кај различни генерации. Првиот случај е кај горенаведениот пациент со највисока измерена концентрација од 15.24 mmol/L, роден 1960 година и неговиот син роден 1988 година со измерена концентрација на холестерол во серум од 8.5 mmol/L. Вториот случај е кај женски пациент роден 1945 година со измерена концентрација на холестерол од 9.04 mmol/L и нејзината ќерка родена 1974 година со концентрација на холестерол од 9.84 mmol/L.

Во амбулантскиот дневник освен овие два генерациски поврзани случаи на хиперхолестеролемија, се среќава и трет случај кај две сестри едната родена во 1960 година со концентрација на холестерол 10.52 mmol/L и другата сестра родена 1965 година со концентрација на холестерол од 9.27 mmol/L. Со овие 3 случаи всушност се потврдува дека фамилијарната хиперхолестеролемија е наследна болест.

Вакви слични и понапредни истражувања со вклучување на многу поголеми популации, на поголема територија и со користење на напредни молекуларно дијагностички методи се спроведуваат во скоро сите земји. Ваков пример е истражувањето насловено “Врската помеѓу молекуларната генетика и клиничката дијагностика на фамилијарната хиперхолестеролемија кај данската популација” на Dorte Damgaard и неговите соработници, публикувано во 2005 година. Во ова истражување спроведено во перидот од јануари 1995 и крајот на декември 2003 година, биле направени анализи на 408 пациенти со дијагностицирана фамилијарна хиперхолестеролемија и 385 блиски роднини. На овие пациенти им биле направени мерења на концентрациите на вкупниот холестерол, HDL-холестеролот и концентрацијата на триглицеридите, додека концентрацијата на LDL-холестеролот била пресметана преку Friedewald-овата формула. Кај пациентите со фамилијарна хиперхолестеролемија бил спроведен и рутински скрининг за мутација на LDL-рецептор генот и тоа за трите најчести мутации во Данска. Доколку не покажувале мутации со овој скрининг, тогаш бил спроведуван флуоресцентен Single Stranded Conformation Polymorphism – методот (SSCP-метод), а мал дел на геномската ДНА издвоена од пациентите била испитана со ДНА секвенционирање. За клиничко дијагностицирање биле употребени сите три претходно спомнати дијагностички

критериуми и тоа: Американскиот дијагностички критериум, Холандскиот липиден клинички критериум и Модифицираниот Англиски (Симон Брум) критериум. Од овие 408 пациенти со дијагностицирана фамилијарна хиперхолестеролемија било константирано дека кај 135 пациенти имале т.н. патогени мутации, 117 пациенти имале мутации на LDL-рецептор генот, 16 пациенти имале мутации на apoB R3500Q и два пациенти имале мутации на LDL-рецептор генот и на apoB R3500Q, и се потврдени 51 вид на мутации на LDL-рецептор генот. Оваа студија покажала дека генотипот на фамилијарната хиперхолестеролемија не е секогаш 100% во корелација во фенотипот на иста болест. Стапката на мутациска детекција дури и кај пациенти со клиничка дијагноза на фамилијарна хиперхолестеролемија била ниска 62.9%. Едно од објаснувањата кои се можни е тоа дека експресија на целосен фенотип на фамилијарна хиперхолестеролемија не мора да биде како резултат на мутација на само еден ген (моногенски болести) (D. Damgaard et al., 2005).

Сето ова укажува на фактот дека фамилијарната хиперхолестеролемија е наследна и дека за целосна дијагноза со која ќе бидеме сигурни потребни и неопходни се молекуларните дијагностички методи. Ова го покажуваат и големиот број научни истражувања и студии кои како главна цел ја имаат фамилијарната хиперхолестеролемија.

5.0. Заклучок (Conclusion)

Фамилијарната хиперхолестеролемија како наследна болест е распространета низ територијата на Македонија. Сепак поради недостаток на средства и информации не може да се процени нејзината застапеност кај популацијата во нашата држава.

Ризикот од појава на фамилијарна хиперхолестеролемија кај општата популација во општина Виница и околните села (вклучувајќи го с.Оризари, Кочани) е присутен, но сепак поради тоа што не се прават студии и истражувања на оваа тема, не е можно во целост да се прикаже реалната состојба поради голем број фактори.

- Од достапните информации од амбулантскиот дневник од ПЗУ Дијагностичка лабораторија „Павлина“ – Виница, можеме да заклучиме дека постојат оправдани сомневања за постоење на голем ризик од појава на фамилијарна хиперхолестеролемија што ни говори и фактот дека 38.05% од нив имале холестерол кој ја надминува границата од 5.2 mmol/L.
- Од вкупниот број направени лабораториски испитувања во ПЗУ Дијагностичка лабораторија „Павлина“ – Виница во временски период од 2 години (2010-2011) кој изнесува 2.376, откриени се вкупно 92 пациенти кај кои концентрацијата на вкупниот холестерол е повисока од 7.8 mmol/L. Во проценти искажано ова изнесува 3.87%.
- Од добиените резултати од таб.4 се гледа дека покачената концентрација на холестерол е најмногу присутна кај женската популација 59,4%, додека кај машката популација овој процент е 40.6%. Додека од таб.5 на која се гледа статистиката на пациенти со холестерол повисок од 7.8 mmol/L, кај кои е можна дијагноза на фамилијарна хиперхолестеролемија, можеме да заклучиме дека од вкупниот број пациенти со холестерол поголем од 7.8 mmol/L, женската популација со 65.22% е многу повеќе застапена отколку машката кај која процентот е 34.78%.
- Од таб.6 и сл.бр.21 , можеме да заклучиме дека кај машката популација најзагрозена е популацијата на возраст помеѓу 40 и 60 години, потоа по број на случаи следува популацијата со возраст над 60 години и најмалку ефектирана е популацијата со возраст под 40 години. Додека кај женската популација според таб.7. и сл.бр.22. можеме да заклучиме дека најпогодена е популацијата со возраст над 60 години, потоа следува популацијата од 40 до 60 години и најмалку е загрозена популацијата под 40 години.
- Кај машката популација најмногу пациенти со високи концентрации на холестерол имаме во возрасната група од 40 до 60 години. Во возрасната група од 40-60 години, покрај наследниот фактор, во тој интервал се случуваат климактерични промени кај пациентите со намалување на лачењето на тестостерон со што го нема анаболичкиот и андрогениот ефект на тестостеронот, што допринесува за зголемување на концентрацијата на холестеролот. Најмногу пациенти со високи

концентрации на холестерол, од женски пол се со старост над 60 години, потоа од 40 до 60 години имаме исто така голем број пациенти и најмал број има на пациенти кои се под 40 години. Овој сооднос би можеле да го објасниме со ефектот на женските хормони кои го забрзуваат метаболизмот, го интезивираат процесот на складирање на мастите, го зголемуваат HDL-холестеролот а го намалуваат LDL-холестеролот. На возраст од 40 до 60 години кај женската популација настанува менопаузата, при што ефектот на естрогените хормони е намален, што придонесува за појавата на зголемени концентрации на холестерол. Хиперхолестеролемијата настанува како резултат на комбинација на генетички и фактори од средината. Факторите од средината се фактори како на пример начинот на исхрана, пушењето, внесување на храна богата со маснотии/холестерол, стресот. Врз концентрацијата на холестеролот влијаат и факторите како што се полот, возраста, здравствената состојба, одредени заболувања како на пример здравствени проблеми поврзани со срцето, дијабетес, склоност кон гоење – гојазност и сл.

- Раната дијагноза е мошне важна за пациентите со фамилијарна хиперхолестеролемија. Со раната дијагноза се овозможува овие пациенти да го добијат соодветниот третман. За да се овозможи рана дијагноза покрај клиничката дијагноза, важен чекор се молекуларно дијагностичките методи со кои со најголема сигурност се потврдува мутацијата која ја предизвикува болеста - фамилијарната хиперхолестеролемија кај пациентот и во неговото семејство. Со тоа се овозможува превенција и спречување на рана појава на симптомите кај пациентите и продолжување на животниот век.

6.0. Користена литература (References and used literature)

1. Бишоп, М., Фоди, Е., Шоеф, Л. (2009): Клиничка хемија: принципи, процедури, корелации, Скопје.
2. Димовска, Ј., Ѓоргоски, И. (2001): Физиологија на невроендокриниот систем, Скопје.
3. Панов, С. (2003): Основни методи во молекуларната биологија, Скопје.
4. Рушковска, Т. (2010): Клиничка Биохемија – Скрипта, Штип.
5. Џекова-Стојкова, С., Корнети, П., Тодорова, Б., Трајковска, С. (1999): Биохемија, Скопје.
6. Austin, M., Hutter, C. et al. (2004). Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review**.** *American Journal of Epidemiology* , 160**:**421-9.
7. Beaumont, V. et al. (1976). Ischaemic disease in men and women with familial hypercholesterolaemia and xanthomatosis. A comparative study of genetic and environmental factors in 274 heterozygous cases. *Atherosclerosis,* 24:441–50.
8. Calandra, S., Tarugi, P., Speedy, H., Dean, A., Bertolini, S., Shoulders, C. (2011). Mechanisms and genetic determinants regulating sterol absorption, circulating LDL levels, and sterol elimination: implications for classifi cation and disease risk. *Journal of Lipid Research,* Volume 52, 1885-1926.
9. Catapano, A., Reiner, Z., Backer, G., Graham, I., Taskinen, M., Wiklund, O., Agewall, S., Alegria, E., Chapman, J.M., Durrington, P., Erdine, S., Halcox, J., Hobbs, R., Kjekshus, J., Filardi, P., Riccardi, G., Storey, R., Wood, D. (2011). ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias - The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis,* 217S S1–S44.
10. Damgaard, D., et al*. (2005).* The relationship of molecular genetic to clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia in a Danish population. *Atherosclerosis* 180, 155–160.
11. Fahed, C., & Nemer, G. (2011). Familial Hypercholesterolemia: The Lipids or the Genes?. *Nutrition & Metabolism,* 8:23.
12. Ferrannini, E. et al., (1991). High blood pressure and insulin resistance: influence of gentic background. *Eur. J. Clin. Invest.,* 21:280.
13. Ferrières, J. et al. (1995). Coronary Artery Disease in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Patients With the Same LDL Receptor Gene Mutation. *American Heart Association,* 92:290-295.
14. Golding, B., Morton, D., Haerty, W. (2012). Elementary Sequence Analysis. Department of Biology McMaster University Hamilton, Ontario.
15. Herman, K., Heyningen, C., Wile, D. (2009). Cascade screening for familial hypercholesterolaemia and its effectiveness in the prevention of vascular disease. *British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, 9: 171.
16. Hobbs, H., Leltersdorf, E., Goldstein, J., Brown, M., & Russell, D. (1988). Multiple crm- Mutations in Familial Hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest. The American Society for Clinical Investigation, Inc,* Volume 81, 909-917.
17. Huxley, R., et al. (2003). Risk of fatal stroke in patients with treated familial hypercholesterolemia: a prospective registry study. *Stroke,* 34(1): 22-25.

18. Jiahua, X., Wehner, T., & Conkling, M. (2002). PCR-based Single-strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis to Clone Nine Aquaporin Genes in Cucumber. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.*, 127(6):925–930.
19. Kotze et al. (1993). Phenotypic variation amon familial hypercholesterolemics heterozygous for either one of two Afrikaner founder LDL receptor mutations. *Arterioscler Tromb,* 13:1460-1468.
20. Kroon, A. et al. (1995). The prevalence of peripheral vascular disease in familial hypercholesterolaemia. *J Intern Med,* 238:451–9.
21. Kuo, PT. et al. (1987). Extracranial carotid arterial disease in patients with familial hypercholesterolemia and coronary artery disease treated with colestipol and nicotinic acid. *Stroke,* 18:716–21.
22. Leren, TP., Manshaus, T. et al. *(2004).* Application of molecular genetics for diagnosing familial hypercholesterolemia in Norway: results from a family-based screening program, *Seminars in vascular medicine*, 4**:**75-85.
23. Marais, D. (2004). Familial Hypercholesterolaemia. *Clin Biochem Rev,* 25(1): 49–68.
24. Postiglione, A., et al. (1985). Carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Stroke,* 16:658–61.
25. Rader, DJ. (2007). Effect of insulin resistance, dyslipidemia, and intra-abdominal adiposity on the development of cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Am J Med,* 120(3 Suppl 1):S12-8.
26. Robinson, J. (2013). Management of Familial Hypercholesterolemia: A Review of the Recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *Journal of Managed Care Pharmacy,* Vol. 19, No. 2, 139-149.
27. Schuster, H., Rauh, G., Gerl,, Ch., Keller, Ch., Wolfram, G., Zollner, N. (1991). Use of DNA haplotype analysis in diagnosis of familial hypercholesterolaemia in 31 German families. *J Med Genet,* 28: 865-870.
28. Simon Broome Register Group. (1991). Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *BMJ,* 303:893-6 (13).
29. Simon Broome Register Group. (1999).Mortality in treater heterozygous familial hypercholesterolaemia: implications for clinical management. *Atherosclerosis,* 142:105-12 (14).
30. Soutar, A., & Naoumova, R. (2007). Mechanisms of Disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine,* Vol. 4 No. 4, 214-225.
31. Versmissen, J. (2012): *Coronary Heart Diseasein Familial Hypercholesterolemia.* Cardiovascular Research School Erasmus University Rotterdam (COEUR), Rotterdam.
32. Vuorio, A. (1998): *A Molecular and Clinical Study of Heterozygous Familial Hypercholesterolemiain the Finnish North Karelia*, Department of Medicine and Institute of Biotechnology University of Helsinki, Helsinki.
33. Williams et al. (1993). Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol*, 72:171–6 (8).
34. Wilund, K., Yi, M., Campagna, F., Arca, M., Zuliani, G., Fellin, R., Ho, Y., Garcia, V., Hobbs, H., Cohen, J. (2002). Molecular mechanisms of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Human Molecular Genetics,* Vol. 11, No. 24 3019–3030.

35. World Health Organization, (1999). *Familial Hypercholesterolaemia*, Report of a second WHO consultation, Geneva.
36. Yanagi, K. et al. (1997). Characteristics of coronary artery disease and lipoprotein abnormalities in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia associated with diabetes mellitus or impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis,* 132(1):43-51.
37. Европска Атеросклероза Асоцијација - European Atherosclerosis Society. Преземено на 10 февруари 2013 год. http://www.eas-society.org/
38. Национален институт за здравје и клинички докази. National Institute for Health and Clinical Evidence. (2008). *Familial hypercholesterolaemia: Identification and management of familial hypercholesterolaemia*; Преземено на 18 март 2013 год. www.nice.org.uk.
39. Националната Фондација за Срце – Австралија. (National Heart Foundation - Australia) – преземено 5 март 2013 год. : www.heartfoundation.org.au