

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY



Agnieszka Węgrzyn

**Ocena przydatności kryteriów klinicznych
hipercholesterolemii rodzinnej
w kwalifikacji chorych do diagnostyki molekularnej
genów *LDLR* i *APOB***

I Katedra i Klinika Kardiologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor: prof. dr hab. Andrzej Rynkiewicz

Gdańsk 2014



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Krajowe Centrum Diagnostyki i Leczenia Hipercholesterolemii Rodzinnej

Projekt współfinansowany przez Unię Europejską
z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego

**Rozprawa doktorska
powstała w ramach projektu**

Krajowe Centrum Diagnostyki i Leczenia Hipercholesterolemii Rodzinnej

„Dotacje na innowacje”

„Inwestujemy w Waszą przyszłość”

Dedykacja:

Pracę dedykuję Mojej Mamie i Rafałowi, w podziękowaniu za wyrozumiałość, wsparcie oraz opiekę nad Moimi Maluchami podczas pracy naukowej i zawodowej. To dla nich i dzięki nim rozprawa doktorska została ukończona.

Wyrażam wdzięczność:

Panu Profesorowi Andrzejowi Rynkiewiczowi, Promotorowi niniejszej pracy, za wszechstronną pomoc i inspirację do podjęcia badań,

Panu Profesorowi Marcinowi Gruchale za poświęcony czas, mobilizację do pracy naukowej i zrozumienie,

Panu Docentowi Marcinowi Fijałkowskiemu za cenne rady i wskazówki oraz stworzenie warunków do pracy naukowej,

Panu Ministrowi Krzysztofowi Chlebusowi za wsparcie w trudnych chwilach,

Panu Profesorowi Januszowi Limonowi, Docentowi Bartoszowi Wasągowi, Pani Doktor Magdalenie Chmarze, Magister Monice Żuk z Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za wykonanie badań molekularnych,

Koleżankom i Kolegom z Kliniki Kardiologii, za życzliwą pomoc.

SPIS TREŚCI

WYKAZ CZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	7
1. WSTĘP	9
1.1 Lipidy i lipoproteiny	9
1.2 Dyslipidemie. Klasyfikacja	13
1.3 Hipercholesterolemia. Definicja i podział.....	13
1.4 Hipercholesterolemia rodzinna	15
1.4.1 Historia hipercholesterolemii rodzinnej.....	15
1.4.2 Epidemiologia hipercholesterolemii rodzinnej.....	19
1.4.3 Podłoże molekularne hipercholesterolemii rodzinnej.....	20
1.4.4 Obraz kliniczny hipercholesterolemii rodzinnej	22
1.4.5 Leczenie hipercholesterolemii rodzinnej.....	29
1.4.6 Hipercholesterolemia rodzinna u kobiet	34
1.4.7 Dzieci z hipercholesterolemią rodzinną	35
2. CEL PRACY	37
3. MATERIAŁ I METODY	38
3.1 Badana grupa	38
3.2 Metodologia badań.....	39
3.2.1 Dane kliniczne (badanie podmiotowe i przedmiotowe)	39
3.2.2 Izolacja DNA i badania molekularne	41
3.2.3 Metodologia badań statystycznych.....	41
4. WYNIKI	43
4.1 Charakterystyka badanej grupy z klinicznym rozpoznaniem hipercholesterolemii rodzinnej.....	43
4.2 Pacjenci z klinicznym rozpoznaniem hipercholesterolemii rodzinnej zależnie od wieku, poniżej 40 r.ż. i ≥ 40 r.ż.....	45
4.3 Pacjenci z klinicznym rozpoznaniem hipercholesterolemii rodzinnej zależnie od wyniku analizy DNA w kierunku mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i>	46
4.3.1 Parametry ilościowe badanych pacjentów zależnie od obecności lub nie mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i>	46
4.3.2 Analiza pacjentów z obecnością lub nie mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i> zależnie od rozpoznania FH na podstawie kryteriów klinicznych	49
4.3.3 Rozkład częstości obecności mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i> zależnie od wybranych cech klinicznych.....	51
4.3.4 Charakterystyka pacjentów poniżej 40 r.ż. zależnie od obecności lub nie mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i>	54
4.4 Wartości diagnostyczne obecności mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i> w badanej grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH	56
4.4.1 Krzywa ROC wyznaczona dla stężenia LDL-cholesterolu zależnie od obecności lub nie mutacji <i>LDLR</i> i/ lub <i>APOB</i>	56
4.4.2 Krzywa ROC wyznaczona dla stężenia cholesterolu całkowitego zależnie od obecności lub nie mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i>	58
4.4.3 Krzywa ROC wyznaczona dla sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH zależnie od obecności lub nie mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i>	60
4.4.4 Krzywa ROC wyznaczona dla stężenia LDL cholesterolu zależnie od obecności lub nie mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i> w grupie pacjentów poniżej 40 r.ż.....	61

4.4.5	Krzywa ROC wyznaczona dla stężenia cholesterolu całkowitego zależnie od obecności lub nie mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i> w grupie pacjentów poniżej 40 r.ż.....	63
4.4.6	Krzywa ROC wyznaczona dla sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH zależnie od obecności lub nie mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i> w grupie pacjentów poniżej 40 r.ż.	65
4.4.7	Krzywa ROC wyznaczona dla stężenia LDL cholesterolu zależnie od obecności lub nie mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i> w grupie pacjentów ≥ 40 r.ż.....	66
4.4.8	Krzywa ROC wyznaczona dla stężenia cholesterolu całkowitego zależnie od obecności lub nie mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i> w grupie pacjentów ≥ 40 r.ż.	68
4.4.9	Krzywa ROC dla sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH zależnie od obecności lub nie mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i> w grupie pacjentów ≥ 40 r.ż.....	70
5.	DYSKUSJA.....	72
5.1	Charakterystyka kliniczna i biochemiczna pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną.....	73
5.2	Charakterystyka molekularna pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną	75
5.3	Charakterystyka pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną poniżej 40 r.ż..	76
5.4	Predyktory mutacji <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i> w populacji polskiej z hipercholesterolemią rodzinną.....	77
5.5	Propozycja nowego algorytmu diagnostycznego hipercholesterolemii rodzinnej dla pacjentów poniżej 40 r.ż. w populacji polskiej.....	80
5.6	Model wielospecjalistycznej opieki nad chorymi z FH.....	81
6.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	84
7.	STRESZCZENIE.....	85
8.	ABSTRACT.....	88
9.	BIBLIOGRAFIA.....	91

WYKAZ CZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AUC	pole powierzchni pod krzywą ROC (ang. <i>area under curve</i>)
APOB-100	apolipoproteina B-100
<i>APOB</i>	gen apolipoproteiny B
BMI	wskaźnik masy ciała (ang. <i>body mass index</i>)
Ch-C	cholesterol całkowity
CAD	choroba wieńcowa serca (ang. <i>coronary artery disease</i>)
CVD	choroba układu sercowo-naczyniowego (ang. <i>cardiovascular disease</i>)
CI	przedział ufności
CM	chylomikrony
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EAS	Europejskie Towarzystwo Miażdżycy (ang. <i>European Atherosclerosis Society</i>)
ESC	Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ang. <i>European Heart Society</i>)
FH	hipercholesterolemia rodzinna (ang. <i>familial hypercholesterolemia</i>)
HeFH	heterozygotyczna hipercholesterolemia rodzinna (ang. <i>heterozygous familial hypercholesterolemia</i>)
HoFH	homozygotyczna hipercholesterolemia rodzinna (ang. <i>homozygous familial hypercholesterolemia</i>)
HDL	lipoproteina o wysokiej gęstości (ang. <i>high density lipoprotein</i>)
HDL-C	HDL-cholesterol
HMG-CoA	3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzym A
LDL	lipoproteina o niskiej gęstości (ang. <i>low density lipoprotein</i>)
LDL-C	LDL-cholesterol
LDLR	receptor LDL (ang. <i>low density lipoprotein</i>)
<i>LDLR</i>	gen receptora LDL (ang. <i>low density lipoprotein</i>)
mg/dl	miligram/decylitr
MLPA	ang. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCSK9	białko PCSK9 (ang. <i>proprotein convertase subtilisin kexin 9</i>)
<i>PCSK9</i>	gen <i>PCSK9</i> (ang. <i>proprotein convertase subtilisin kexin 9</i>)
ROC	ang. <i>Receiver Operating Characteristic</i>

SE	błąd standardowy
TG	trójglicerydy
WT	typ dziki genu (ang. <i>wild type</i>)
VLDL	lipoproteina o bardzo małej gęstości (ang. <i>very low density lipoprotein</i>)
vs	versus

1. WSTĘP

1.1 Lipidy i lipoproteiny

Lipidy są heterogenną grupą związków organicznych, obejmującą tłuszcze, oleje, steroidy, woski i ich pochodne.

Jako składnik pokarmów stanowią główny substrat energetyczny, a zmagazynowane w tkance tłuszczowej są izolatorem termicznym organizmu. Pozwalają także na przyswajanie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach i szybkie rozprzestrzenianie się fali depolaryzacyjnej w osłonce mielinowej. Lipidy są także istotnymi składnikami błon komórkowych.

Lipidy można podzielić na prekursorzy, pochodne lipidów oraz lipidy proste i złożone.

Prekursory i pochodne lipidów to kwasy tłuszczowe, sterole, aldehydy tłuszczowe, ciała ketonowe, węglowodory, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, niektóre hormony, glicerol i inne alkohole. Lipidy proste to estry kwasów tłuszczowych z glicerolem (tłuszcze właściwe) lub długołańcuchowymi alkoholami monohydroksylowymi (woski). Lipidy złożone (fosfolipidy, glikolipidy, sulfolipidy i aminolipidy) zawierają estry kwasów tłuszczowych oraz inne grupy funkcyjne.

W organizmie ludzkim jedne z najistotniejszych funkcji pełnią cholesterol i inne steroidy oraz kwasy tłuszczowe i ich estry. Fosfolipidy i sfingolipidy są podstawowymi składnikami błon biologicznych, tkanki nerwowej oraz surfaktantu. Trójglicerydy, złożone z kwasów tłuszczowych oraz glicerolu, stanowią główny rezerwuar energetyczny człowieka.

Jednym z najbardziej znanych steroidów, ze względu na swój udział w patogenezie miażdżycy, jest cholesterol. Stanowi on też istotny składnik wszystkich błon plazmatycznych, tkanek, surfaktantu i osłonek mielinowych neuronów. Cholesterol jest także prekursorem witaminy D i bierze udział w syntezie kwasów żółciowych oraz hormonów sterydowych (testosteronu, progesteronu, estrogeny, kortyzonu).

W organizmie człowieka cholesterol ma dwa podstawowe źródła: egzogenne (pokarmy) i endogenne. Ponad połowa puli cholesterolu pochodzi z biosyntezy z acetylo-koenzymu A (acetylo-CoA). Zachodzi ona w narządach, głównie w wątrobie, w mniejszym stopniu w jelitach i skórze. Trzy cząsteczki acetylo-CoA tworzą mewalonian

w wyniku reakcji katalizowanej przez reduktazę HMG-CoA, następnie powstaje skwalen na drodze kondensacji. W drodze cyklizacji skwalenu powstaje lanosterol, który po utracie trzech grup metylowych przekształca się w cholesterol.

Powstawanie cholesterolu w wątrobie jest poddawane regulacji poprzez mechanizm sprzężenia zwrotnego. Zarówno cholesterol pochodzący z biosyntezy oraz ten egzogenny hamują w wątrobie reduktazę HMG-CoA (3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA). Nadmiar cholesterolu w postaci zestryfikowanej gromadzi się w postaci chylomikronów, VLDL, kropli tłuszczu w komórkach oraz jest wydalany z żółcią. Struktura cholesterolu nie pozwala na swobodne krążenie we krwi, transportowany jest więc w cząsteczkach zwanych lipoproteinami [1-3].

Lipoproteiny

Hydrofobowy charakter lipidów powoduje, że ich transport we krwi jest możliwy jedynie w formie rozpuszczalnych w osoczu kompleksów z białkami (apolipoproteinami). Lipoproteiny zbudowane są z rdzenia zawierającego hydrofobowe trójglicerydy i estry cholesterolu oraz płaszcza, który stanowią hydrofilne apolipoproteiny, fosfolipidy i wolny cholesterol.

Apolipoproteiny (APO) poza funkcją strukturalną w lipoproteinach, regulują także procesy estryfikacji cholesterolu, wymiany pomiędzy lipoproteinami oraz transportu do komórek. Można je podzielić się na wiele klas:

- APOA-I, syntetyzowana w wątrobie oraz ścianie jelita, stanowi główny składnik HDL oraz chylomikronów. Aktywuje acylotransferazę lecytyna-cholesterol
- APOA-II jest elementem strukturalnym chylomikronów
- APOB stanowi element cząsteczek LDL. Powstaje w wątrobie i pośredniczy w wychwytywaniu LDL przez tkanki
- Apolipoproteiny C przemieszczają się łatwo między lipoproteinami różnych klas. APOC-II aktywuje enzym lipazę lipoproteinową
- APOE powstająca w wątrobie pośredniczy w wychwycie chylomikronów reszkowych przez wątrobę.

Lipoproteiny stanowią heterogenną grupę cząstek, różniącą się składem lipidowym, białkowym, miejscem syntezy i metabolizmem. Podstawą ich klasyfikacji jest rozdział metodą ultrawirowania lub elektroforezy.

Fracje lipoprotein uzyskane metodą elektroforezy to: α -lipoproteiny, pre- β -lipoproteiny, β -lipoproteiny i chylomikrony. Metodą ultrawierowania, uznawaną za referencyjną, uzyskujemy następujące frakcje: VLDL (*very low density lipoprotein*), LDL (*low density lipoprotein*), HDL (*high density lipoprotein*) chylomikrony (CM) (Tab. 1) [1 3 4].

Tab. 1 Charakterystyka lipoprotein [1 3 4]

Klasa / Parametr	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL	Lp (a)
Ruchliwość w elektroforezie	start	prebeta ₁	prebeta ₂	beta	alfa	prebeta
Średnica (nm)	>70	26-70	22-24	19-23	4-10	26-30
Główne lipidy	trójglicerydy egzogenne	trójglicerydy egzogenne	trójglicerydy endogenne, estry cholesterolu	estry cholesterolu	fosfolipidy	estry cholesterolu, fosfolipidy
Główne apolipoproteiny	A-I B-48 C-I C-II C-III E	B-100 C-I C-II C-III E	B-100 E	B-100	A-I A-II E	(a) B-100

Chylomikrony

Chylomikrony powstają w ścianie jelita cienkiego i ich podstawową funkcją jest transport trójglicerydów z przewodu pokarmowego do tkanek obwodowych. Są to cząsteczki o najniższej gęstości i największej średnicy, zawierają najmniej apolipoprotein i najwięcej lipidów. Podstawowym białkiem nośnikowym tej frakcji jest apolipoproteina APOB-48, po przejściu chylomikronów do osocza wbudowywana jest także APOE i APOC. Podczas przechodzenia przez naczynia włosowate odpowiednie receptory tkankowe wiążą chylomikrony. Aktywowana przez APOC-II lipaza lipoproteinowa hydrolizuje trójglicerydy, które wnikają do komórek lub stanowią substrat energetyczny. W wyniku degradacji rdzenia trójglicerydowego cząstka chylomikronu zmniejsza swoją objętość stając się remnantem chylomikronu. Remnanty chylomikronów z estrami cholesterolu są wiązane przez wątrobowe receptory lipoproteinowe i ulegają endocytozie. W hepatocytach pozostałe ilości trójglicerydów, cholesterolu i fosfolipidów są hydrolizowane. Cholesterol uwolniony z chylomikronów hamuje syntezę cholesterolu w wątrobie przez wpływ na syntezę HMG-CoA [1 3-5].

VLDL

VLDL powstają w wątrobie i ich zadaniem jest transport lipidów z wątroby do tkanek obwodowych. Zawierają apolipoproteiny APOB-100, APOA-I oraz endogenne trójglicerydy. W osoczu do VLDL wbudowują się także APOC-II i APOE z HDL. Uaktywniona przez APOC-II lipaza lipoproteinowa hydrolizuje trójglicerydy z VLDL. APOC-II i APOE przechodzą z powrotem do HDL, natomiast estry cholesterolu przechodzą z HDL do VLDL. W efekcie tych zmian powstają przejściowo IDL (*intermediate density lipoprotein*), a końcowo LDL.

LDL

LDL są głównym transporterem cholesterolu. Powstają z VLDL, zachowując APOB-100. Receptory dla LDL znajdują się głównie na hepatocytach, w dołkach opłaszczonych klatryną. Cząsteczka LDL poprzez apolipoproteinę B-100 łączy się z domeną receptora dla LDL. Takie kompleksy ulegają internalizacji i dalszym przemianom. Liczba receptorów dla LDL jest regulowana zgodnie z zapotrzebowaniem komórki na cholesterol. W przypadku dużej ilości krążących lipoprotein maleje liczba receptorów (ang. *down regulation*). Innym mechanizmem komórkowego wychwytu LDL jest endocytoza zmodyfikowanych LDL dzięki receptorom tzw. *scavenger receptors* monocytów i makrofagów. W wyniku nadmiernego poboru LDL przez makrofagi powstają komórki piankowate, które uczestniczą w powstawaniu blaszek miażdżycowych.

HDL

HDL są wytwarzane w wątrobie i jelitach. Zawierają fosfolipidy i wolny cholesterol, który jest następnie poddawany estryfikacji przez acylotransferazę lecytyna-cholesterol. Powstałe estry cholesterolu ze względu na właściwości hydrofobowe nie mogą być już wykorzystane do budowy błon biologicznych. Podlegają więc eliminacji poprzez przejście do VLDL, a następnie LDL. Cząsteczki HDL stanowią także rezerwuuar apolipoprotein APOA, APOE i APOC istotnych w procesie transportu lipidów [1 3-5].

Zaburzenia przemiany lipoprotein wywołują różne hipolipoproteinemie oraz hiperlipoproteinemie.

1.2 Dyslipidemie. Klasyfikacja

Dyslipidemię definiuje się jako nieprawidłowe stężenie w surowicy jednej lub więcej frakcji lipoprotein lub ich składu. Lipidogram należy wykonać na czczo, po długiej 9-12 godzinnej przerwie od ostatniego posiłku. W przypadku ostrego zespołu wieńcowego profil lipidowy należy oznaczyć w pierwszej dobie. Stężenia cholesterolu całkowitego, HDL-cholesterolu i trójglicerydów oznacza się metodą bezpośrednią, natomiast stężenie LDL-C zwykle jest wyliczane na podstawie formuły Friedewalda. W przypadku, gdy poziom trójglicerydów jest wysoki ($\geq 4,5$ mmol/l, tj. ≥ 400 mg/dl), LDL-C oznacza się metodą bezpośrednią [6-8].

Najbardziej praktyczny z klinicznego punktu widzenia jest podział dyslipidemii oparty na wynikach badań laboratoryjnych:

- Hipercholesterolemia - stężenie cholesterolu LDL $\geq 3,0$ mmol/l (≥ 115 mg/dl) i/lub stężenie cholesterolu całkowitego ≥ 5 mmol/l (≥ 190 mg/dl)
- Hipertrójglicerydemia - stężenie triglicerydów $\geq 1,7$ mmol/l (≥ 150 mg/dl)
- Hiperlipidemia mieszana
- Małe stężenie cholesterolu HDL - u kobiet $< 1,2$ mmol/l (< 45 mg/dl), u mężczyzn < 1 mmol/l (40 mg/dl).

1.3 Hipercholesterolemia. Definicja i podział

Hipercholesterolemia zgodnie z wytycznymi ESC jest definiowana jako wzrost stężenia cholesterolu w osoczu krwi ≥ 5 mmol/l (≥ 190 mg/dl) i/ lub stężenia cholesterolu LDL (LDL-C) $\geq 3,0$ mmol/l (≥ 115 mg/dl) [7-9]. Ze względu na przyczynę, hipercholesterolemię można podzielić na pierwotną i wtórną.

Najczęstszą postacią hipercholesterolemii pierwotnej jest hipercholesterolemia wielogenowa. Występuje u 1:10 do 1:20 osób, a u jej podłoża leżą mutacje wielu genów oraz nieprawidłowa dieta [6].

Do hipercholesterolemii pierwotnych zalicza się także hipercholesterolemie monogenowe. Do tej pory poznano sześć typów monogenowych hipercholesterolemii, dziedziczonych zarówno w sposób autosomalny dominujący, jak i recesywny (Tab. 2)

[6 7]. Najczęstszą przyczyną hipercholesterolemii rodzinnej dziedziczonej autosomalnie dominująco jest mutacja genu LDL-receptora (1:300 do 1:500 urodzeń), nieco rzadziej genu *APOB* (1:1000) i genu *PCSK9* (1:2500) [10-12]. Fenotyp zbliżony do hipercholesterolemii rodzinnej dziedziczonej autosomalnie dominująco występuje w autosomalnej recesywnej hipercholesterolemii, sitosterolemii oraz wrodzonym braku cholesterol 7 α -hydroxylazy (*CYP7A1*).

U podłoża autosomalnej recesywnej hipercholesterolemii leży mutacja genu *ARH*, który koduje białko LDLRAP1 (ang. LDLR *adaptor protein 1*). Patomechanizm tego zaburzenia polega na upośledzeniu internalizacji receptora LDL, jednak pacjenci dobrze reagują na leczenie statynami [13].

Sitosterolemia jest spowodowana przez mutacje w genach *ABCG5* lub *ABCG8* kodujących białka biorące udział we wchłanianiu steroli roślinnych. Objawy kliniczne sitosterolemii to kępkki żółte, zapalenie stawów. Farmakoterapia polega na podawaniu ezetimibu, który hamuje białko NPC1L1 (ang. *Niemann-Pick C1 like 1 protein*) biorące udział we wchłanianiu steroli roślinnych.

Przy wrodzonym braku cholesterol 7 α -hydroxylazy (*CYP7A1*) dochodzi do zaburzenia syntezy kwasów żółciowych z cholesterolu. Klinicznie objawia się to przedwczesną miażdżycą, kamicą żółciową oraz wysokim stężeniem cholesterolu. Leczenie statynami zazwyczaj jest nieskuteczne [6].

Tab.2 Podział monogenowych hipercholesterolemii

Podział monogenowych hipercholesterolemii	Częstość
Hipercholesterolemia rodzinna dziedziczona autosomalnie dominująco	
Mutacja genu <i>LDLR</i>	1:300- 1:500
Mutacja genu <i>APOB</i>	1:1000
Mutacja genu <i>PCSK9</i>	1:2500
Hipercholesterolemia dziedziczona w sposób autosomalnie recesywny	Bardzo rzadka
Mutacja genu <i>ARH</i>	
Hipercholesterolemia dziedziczona w sposób autosomalnie recesywny (Sitosterolemia)	Bardzo rzadka
Mutacja w genach <i>ABCG5</i> lub <i>ABCG8</i>	
Hipercholesterolemia dziedziczona w sposób autosomalnie recesywny Wrodzony brak cholesterol 7 α -hydroxylazy	Bardzo rzadka

Wtórna hipercholesterolemia występuje w przebiegu wielu chorób metabolicznych i endokrynologicznych oraz jako skutek uboczny stosowanych leków. Także nadwaga, otyłość, nieprawidłowa dieta oraz wiek wpływają na podwyższenie stężenia cholesterolu we krwi. W Tabeli 3 przedstawiono najczęstsze przyczyny występowania wtórnej hipercholesterolemii.

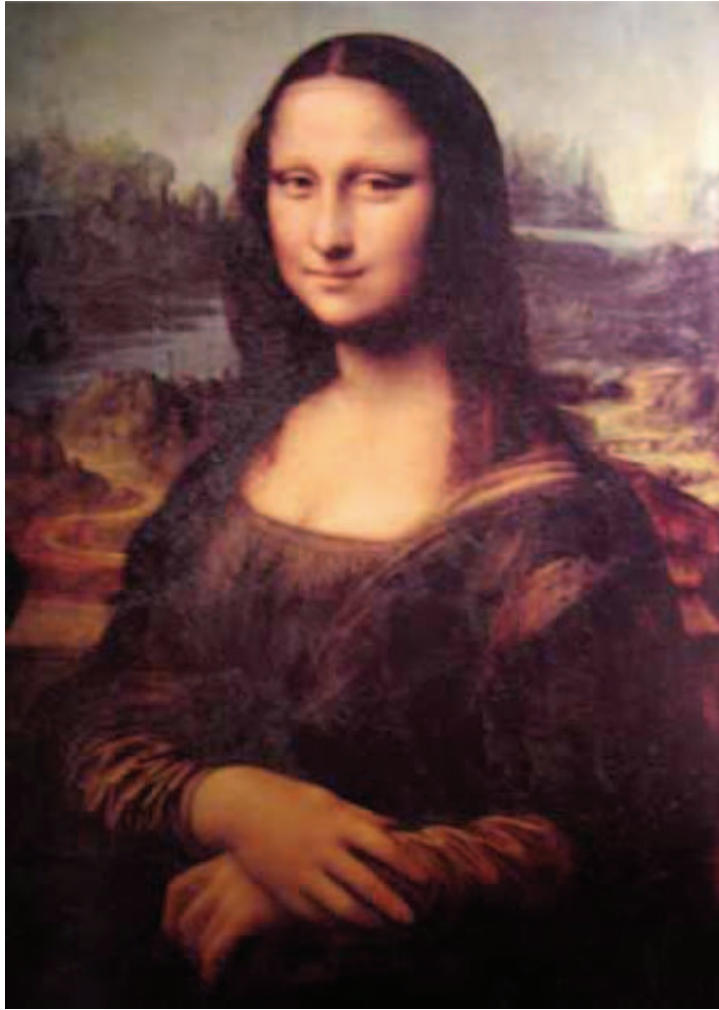
Tab. 3 Przyczyny wtórnej hipercholesterolemii

Przyczyny wtórnej hipercholesterolemii
Niedoczynność tarczycy
Zespół i choroba Cushinga
Cholestaza wewnątrzwątrobową
Jadłowstręt psychiczny (<i>anorexia nervosa</i>)
Przewlekła choroba nerek, zespół nerczycowy
Toczeń rumieniowaty układowy
Leki: kortykosteroidy, androgeny, doustne środki antykoncepcyjne, gestageny, danazol, tiazidy, furosemid, beta-blokery, chlorpromazyna, amiodaron, chlortalidon, cyklosporyna, azatiopryna, ritonawir i inne proteazy HIV

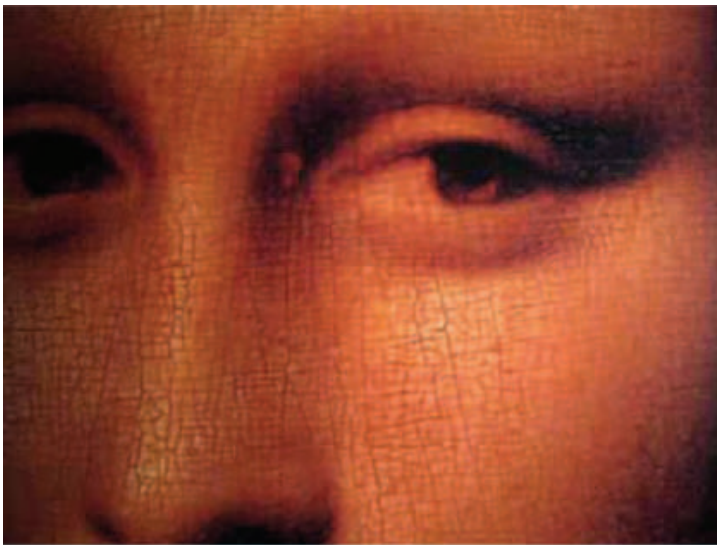
1.4 Hipercholesterolemia rodzinna

1.4.1 Historia hipercholesterolemii rodzinnej

Prawdopodobnie jednym z pierwszych udokumentowanych przypadków występowania żółtaków ścięgien, uznawanych za patognomiczne dla FH, była sportretowana w 1506 roku Mona Lisa (Ryc. 1). Mona Lisa, czyli Lisa di Antonmaria Gherardini (Lisa del Giocondo) z obrazu Leonarda da Vinci, była prawdopodobnie chora na hipercholesterolemię. Na górnej lewej powiece Giocondy zidentyfikowano kępki żółte, a na prawej dłoni kępki żółte guzowate ścięgien prostowników palców (Ryc. 2 i 3). Mona Lisa zmarła w wieku 37 lat [14 15].



Ryc. 1 „Mona Lisa” Leonarda da Vinci [wikipedia.org]



Ryc. 2 „Mona Lisa” Leonarda da Vinci – w wewnętrznym kącie oka lewego kępi żółte



Ryc. 3 „Mona Lisa” Leonarda da Vinci - na grzbiecie prawej dłoni widoczne guzki podskórne mogące odpowiadać kępkom żółtym ścięgien

Frans Hals, siedemnastowieczny holenderski malarz, także uwiecznił obraz przypuszczalnej heterozygotycznej FH. Na portrecie siedzącej kobiety, namalowanym w 1663 r., można na grzbiecie jej dłoni odnaleźć liczne kępki żółte ścięgien (Ryc. 4 i 5).



Ryc. 4 Frans Hals, portret starszej kobiety [wikipedia.org]



Ryc. 5 Frans Hals, portret starszej kobiety. Na grzbiecie lewej dłoni widoczne guzki podskórne mogące odpowiadać kępkom żółtym ścięgien.

W literaturze medycznej po raz pierwszy obraz kliniczny hipercholesterolemii rodzinnej został opisany przez norweskiego patologa Francisa Harbitza. W latach 1925-1938 opublikował on kilka przypadków mówiących o związku pomiędzy zgonem z przyczyn sercowo-naczyniowych i żółtakami. Następnie w 1938 roku Carl Müller, badając 17 rodzin w Oslo opisał dziedziczną chorobę układu sercowo-naczyniowego powiązaną z występowaniem żółtaków i podwyższonym poziomem cholesterolu w surowicy krwi. Swoim pacjentom zalecił dietę niskocholesterolową celem uniknięcia przedwczesnej śmierci [15].

Badania prowadzone przez Khachaduriana w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku wykazały różnice kliniczne pomiędzy homozygotami a heterozygotami dowodząc, że choroba ta dziedziczona jest monogenowo [16-18].

W 1973 roku Brown i Goldstein z *Health Sciences Center* Uniwersytetu w Teksasie odkryli receptor dla lipoprotein o niskiej gęstości w fibroblastach hodowanych in vitro. Wykazali oni, że receptory dla LDL wychwytyują cholesterol z układu krążenia oraz udowodnili, że wraz z obniżaniem się zawartości cholesterolu wewnątrz komórek zwiększa się synteza receptorów dla LDL. Wyszunęli zatem wniosek, że zmniejszenie syntezy cholesterolu powoduje zwiększenie jego wychwyty z układu krążenia poprzez wspomniane receptory. W 1986 r. Brown i Goldstein odkryli, że u podłoża

hipercholesterolemii rodzinnej leży mutacja genu LD- receptora. Otrzymali za to Nagrodę Nobla [19-27].

W latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku dowiedziono, że nie tylko mutacje genu *LDLR* ale także *APOB*, mogą powodować fenotyp kliniczny FH. Nazwano tę chorobę rodzinnym defektem apolipoproteiny B-100 [28-32].

Abifadel i wsp. w 2003 roku zidentyfikowali trzeci gen związany z autosomalnie dominującą hipercholesterolemią. Jest to gen kodujący białko konwertazy proproteinowej subtilizyny/kexyny typ 9 (*PCSK9*, ang. *proprotein convertase subtilisin kexin 9*) [28 33-35].

1.4.2 Epidemiologia hipercholesterolemii rodzinnej

Hipercholesterolemia rodzinna dziedziczona autosomalnie dominująco to jedna z najczęstszych monogenowych chorób, które powodują przedwczesną chorobę wieńcową. Występuje u około 0,2% populacji ogólnej.

Zgodnie ze sposobem dziedziczenia, FH można podzielić na dwie postaci: homozygotyczną i heterozygotyczną. Homozygotyczna FH występuje bardzo rzadko, u jednej osoby na milion urodzeń. W Niemczech zidentyfikowano 95 homozygot FH, co daje szacowaną częstość 1:870 000 osób. W Polsce według tych danych powinno być około 38 do 45 pacjentów z homozygotyczną FH.

Przyjmując, że częstość heterozygotycznej FH wynosi około 1:300-1:500 osób można oszacować, że w Polsce jest od 77 tys. do 128 tys. chorych z HeFH [36-38].

Istnieją populacje, w których efekt założyciela oraz ekstremalne odizolowanie populacji spowodowało bardzo wysoką częstość występowania hipercholesterolemii rodzinnej. HeFH występuje u 1 na 67 Żydów aszkenazyjskich, u Afrykanerów i Indian południowoamerykańskich 1:70 [29 39]. Pośród Kanadyjczyków pochodzenia francuskiego w Quebecu odnotowano występowanie HeFH u 1:270, a u Finów i chrześcijańskich Libańczyków 1:170 [40-42].

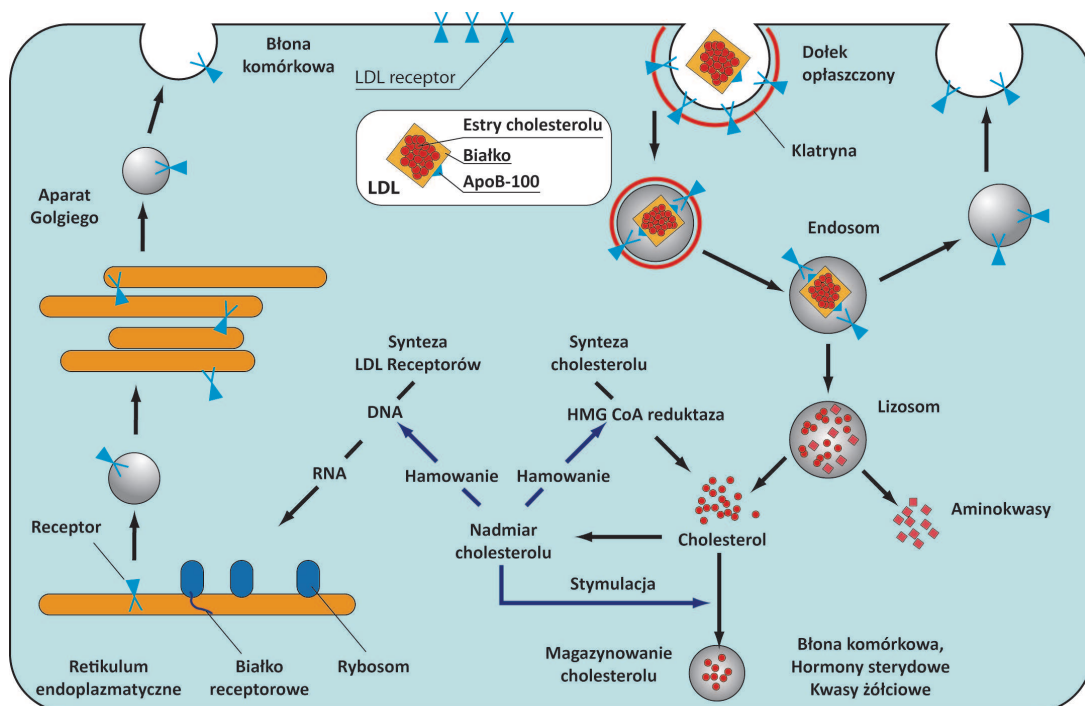
1.4.3 Podłoże molekularne hipercholesterolemii rodzinnej

Podłoże hipercholesterolemii rodzinnej może stanowić mutacja jednego z 3 genów: receptora LDL (*LDLR*), apolipoproteiny-B (*APOB*) lub konwertazy proproteinowej subtilizyny/kexyny typ 9 (*PCSK9*) [43 44].

Gen dla receptora LDL

Na ramieniu krótkim chromosomu 19 (19p13.1-p13.3) zidentyfikowano gen dla receptora LDL-cholesterolu złożony z 18 eksonów i 17 intronów.

Synteza receptorów LDL (*LDLR*) ma miejsce w retikulum endoplazmatycznym. Glikoproteiny te są następnie transportowane na powierzchnię komórki za pomocą aparatu Golgiego, gdzie w dołku opłaszczonym klatryną wychwytyują cząsteczki LDL z osocza [45]. Dołek wraz z receptorem i LDL wnika do wnętrza komórki, przekształcając się w endosom. Enzymy lizosomalne rozkładają LDL, a receptor wraca na powierzchnię komórki. Bez względu na to, czy *LDLR* zwiąże się z kolejną lipoproteiną cykle takie są powtarzane co około 10 minut. Schemat cyklu pokazuje Ryc. 6.



Ryc. 6. Cykl LDL-receptora i cholesterolu w hepatocytach

Wolny cholesterol podlega dalszym przemianom, a jego nadmiar może być przechowywany jako estry cholesterolu lub usuwany za pomocą HDL. Wysokie stężenie cholesterolu w komórce hamuje reduktazę HMG-CoA i syntezę cholesterolu, zwiększa aktywność acylotransferazy cholesterolu (ACAT) estryfikującej wolny cholesterol oraz zmniejsza transkrypcję genu *LDLR* [19 21 23-27].

Do obecnej chwili opisano ponad 1700 różnych mutacji występujących na całej długości genu *LDLR* (www.ucl.ac.uk/ldlr), najwięcej w exonie 4. Mutacje punktowe oraz małe insercje i delecje są najczęstsze. Duże strukturalne mutacje w genie *LDLR* zazwyczaj odpowiadają za 2 do 10% mutacji [46 47].

Mutacje w genie *LDLR* wpływają na funkcję i budowę LDL receptorów w hepatocytach. Mutacje określane jako *receptor-defective* zmieniają aktywność LDL receptorów, natomiast mutacje typu *receptor-negative* powodują zahamowanie syntezy receptora LDL. Podział mutacji *LDLR* na klasy prezentuje Tabela 4 [48 49].

Tab. 4. Podział mutacji na klasy

Klasy mutacji	Efekt mutacji
I klasa mutacji	brak syntezy receptora; bardzo wysoki poziom LDL-C
II klasa mutacji	nieprawidłowy transport LDLR z siateczki endoplazmatycznej do aparatu Golgiego
III klasa mutacji	defekt wiązania receptorów z LDL na powierzchni błony komórkowej
IV klasa mutacji	zaburzenie internalizacji kompleksu receptor-LDL
V klasa mutacji	nieprawidłowe odłączenie receptora od LDL w lizosomach uniemożliwia recyrkulację receptorów lub prowadzi do ich degradacji

Każda klasa mutacji redukuje liczbę czynnych receptorów na powierzchni hepatocytów, co prowadzi do zmniejszonego wychwytu LDL i wzrostu stężenia cholesterolu krążącego we krwi.

Gen *APOB*

Gen apolipoproteiny B jest zlokalizowany na ramieniu krótkim chromosomu 2 (2p24-p23) i zawiera 29 eksonów. Gen *APOB* poprzez alternatywne składowanie (ang. *splicing*) koduje zarówno APOB-100 jak i APOB-48. APOB-100 powstaje w wątrobie i wchodzi w skład LDL i VLDL, natomiast APOB-48 jest syntetyzowana w jelicie i stanowi element składowy chylomikronów.

Do chwili obecnej odkryto zaledwie kilka mutacji genu *APOB* powodujących fenotyp FH, wszystkie w eksonie 26. Skutkują one zmianą przestrzennego układu apolipoproteiny B-100 w cząsteczce LDL, co w efekcie powoduje zaburzenie prawidłowego łączenia LDL z jej receptorem.

Najczęściej opisywaną mutacją genu *APOB* u rasy kaukaskiej jest mutacja p.R3500Q. Mutacje genu *APOB* są zdecydowanie rzadsze niż mutacje genu *LDLR* i powodują łagodniejszy przebieg FH niż mutacje genu *LDLR* i *PCSK9* [30 31 50].

Gen *PCSK 9*

Gen *PCSK9* (*proprotein convertase subtilisin kexin 9*) został odkryty zaledwie 10 lat temu na chromosomie 1. Składa się z 12 eksonów i jego produktem jest białko NARC1 (ang. *neural apoptosis-regulated convertase*). NARC1 jest produkowane jako rozpuszczalny zymogen, który ulega autokatalizie w siateczce endoplazmatycznej. Proproteina *PCSK9* jest jedynym poznanym substratem dla tego enzymu. Wykazano, że *PCSK9* wiąże się z kompleksem *LDLR*-LDL pozakomórkowo i wpływa na proces lizosomalnej degradacji.

Obraz kliniczny FH powodują mutacje *PCSK9* typu *gain-of-function* (GOF) powodujące wzrost aktywności produktu białkowego tego genu. Cohen i wsp. wykazali, że istnieją również mutacje *PCSK9* typu *loss-of-function* skutkujące redukcją poziomu cholesterolu LDL i zmniejszeniem ryzyka sercowo-naczyniowego [28 33 34 51-53].

1.4.4 Obraz kliniczny hipercholesterolemii rodzinnej

Hipercholesterolemia rodzinna homozygotyczna występuje w populacji europejskiej u jednej osoby na milion. W przypadku „prawdziwej” homozygotycznej FH praktycznie nie obserwuje się aktywności receptora dla LDL. Wysoki poziom cholesterolu całkowitego i LDL-cholesterolu można stwierdzić już u noworodka. Z wiekiem następuje wzrost stężenia LDL-cholesterolu do wartości przekraczających 4-6-krotnie normę [50]. Kępki żółte skórne (ang. *cutaneous xanthomas*) tworzą się w ciągu kilku pierwszych miesięcy lub lat życia, nieco później powstają guzowate żółtaki ścięgien. Uogólniona miażdżycza tętnic wieńcowych, szyjnych, biodrowych, udowych oraz aorty powstaje we

wczesnym dzieciństwie. Objawy choroby wieńcowej pojawiają się około 10-20 roku życia. Może także występować stenoza aortalna u młodych chorych do 20 r.ż. [42 54-56].

W hipercholesterolemii rodzinnej heterozygotycznej do trzech podstawowych objawów należą: podwyższony poziom LDL-cholesterolu w osoczu, obecność żółtaków ścięgien oraz przedwczesna objawowa choroba układu sercowo-naczyniowego.

Stężenie cholesterolu całkowitego osiąga zazwyczaj poziom około 350-550 mg/dl [34 54 57 58]. Natomiast poziom LDL-cholesterolu u osób z HeFH wynosi średnio 200-400 mg/dl [50 59]. Zazwyczaj nie towarzyszy temu wzrost poziomu trójglicerydów, z wyjątkiem współistniejącej otyłości, cukrzycy, czy nadużywania alkoholu. Poziom cholesterolu HDL może być nieco obniżony w stosunku do wartości obserwowanych dla danego wieku i płci. Ponadto u części chorych występuje podwyższony poziom lipoproteiny (a). Są one dodatkowym i niezależnym czynnikiem ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego.

U chorych nieleczonych złogi tkankowe spowodowane wysokim stężeniem cholesterolu mogą mieć postać pierścienia rogówkowego (ang. *corneal arcus*) lub kępek żółtych ścięgien (żółtaki ścięgien, ang. *tendon xanthomas*). Złogi lipidów w ścięgnach mogą spowodować odczynowy proces zapalny. Sporadycznie zdarza się, że pogrubiałe ścięgna wywołują krwawienia i wysięk do tkanek. Za objaw patognomiczny dla nielezionej FH uznaje się kępki żółte umiejscowione w ścięgnie piętowym (łac. *tendo Achillis, tendo calcaneus*), nie można ich jednak uznać za wystarczająco czuły marker choroby [12 43]. Badaniem, które zwiększa stopień detekcji żółtaków ścięgna Achillesa jest badanie rentgenowskie. Grubość ścięgna piętowego powyżej 9 mm u pacjenta z podejrzeniem hipercholesterolemii rodzinnej może wskazywać na obecność złogów cholesterolu [43 60 61].

W przebiegu FH mogą się także pojawiać inne kępki żółte:

- Kępki żółte guzowate (ang. *tuberous xanthomas*) - okrągłe, żółte lub pomarańczowe guzki skórne; występują nad stawami łokciowymi i kolanowymi oraz na guzowatościach piszczeli, grzbiecie stopy i wyrostku łokciowym
- Kępki żółte płaskie (ang. *plane xanthomas*) - żółtawe lub pomarańczowe płaskie plamki; zlokalizowane w dłoni lub fałdach skóry lub uogólnione
- Kępki żółte powiek (ang. *xanthelasma*) to żółtawe guzki tkanki podskórnej okolicy oczu; mogą być obecne także u pacjentów z prawidłowymi poziomami lipidów.

W nieleczonej hipercholesterolemii rodzinnej heterozygotycznej objawy choroby niedokrwiennej serca pojawiają się u mężczyzn zwykle w 4 lub 5 dekadzie życia, a u kobiet 10 lat później [50 62]. Pacjenci z FH zazwyczaj różnią się stopniem nasilenia objawów i wiekiem wystąpienia CAD, ze względu na obecność dodatkowych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego oraz rodzaju czy klasy mutacji genu. Przykładowo, palenie papierosów w FH znacznie przyspiesza rozwój przedwczesnej miażdżycy [10].

U pacjentów z identyczną mutacją *LDLR* i podobnymi poziomami cholesterolu LDL objawy CVD mogą rozwijać się w różnym okresie życia. Przykładowo taka sama mutacja *LDLR* u Chińczyków odżywiających się zgodnie z tradycją i mieszkających w Chinach nie powodowała objawów klinicznych FH w przeciwieństwie do Chińczyków mieszkających w Ameryce Północnej i przejmujących nawyki żywieniowe Amerykanów [12 43 58 63].

Pacjenci z hipercholesterolemią rodzinną należą do kategorii dużego ryzyka sercowo-naczyniowego, tak więc algorytmy SCORE i Framingham nie znajdują zastosowania w prewencji pierwotnej tej choroby [7 64]. Zaleca się jednak aktywne poszukiwanie wykładników miażdżycy za pomocą dostępnych metod diagnostycznych u niemych klinicznie pacjentów [65]. W kryteriach klinicznych FH choroba układu sercowo-naczyniowego została zdefiniowana jako przedwczesna u mężczyzn poniżej 55 r.ż. i u kobiet poniżej 60 r.ż. [7].

Kryteria kliniczne hipercholesterolemii rodzinnej

Niezależne grupy europejskich ekspertów opracowały kryteria kliniczne przydatne do diagnostyki hipercholesterolemii rodzinnej. Schematy te opierają się na badaniu przedmiotowym i podmiotowym, wywiadzie rodzinnym oraz badaniach biochemicznych oraz molekularnych (Tabele 5-7).

W Wielkiej Brytanii diagnostyczne kryteria *Simon Broome* składają się z następujących punktów:

- podwyższone stężenie cholesterolu całkowitego i LDL-cholesterolu zależnie od wieku (granica 16 lat)
- obecność żółtaków ścięgien u probanta lub krewnego I stopnia
- potwierdzenie mutacji genu *LDLR*, *APOB* lub *PCSK9*
- obciążający wywiad rodzinny w kierunku hipercholesterolemii
- dodatni wywiad rodzinny w kierunku występowania zawału serca

Dla pewnego rozpoznania FH muszą być obecne kryteria „a” i „b” lub potwierdzenie mutacji *LDLR*, *APOB* lub *PCSK9*, natomiast dla postawienia diagnozy „prawdopodobna FH” – kryterium „a” oraz „d” lub kryterium „a” i „e” (Tab. 5) [66]

Tab. 5 Kryteria diagnostyczne hipercholesterolemii rodzinnej Simon Broome register [66]

Kryteria FH Simon Broome register		
a	Cholesterol całkowity:	dla osób poniżej 16 r.ż. > 6,7mmol/l (260 mg/dl) dla osób powyżej 16 r.ż. > 7,5mmol/l (290 mg/dl)
	lub	
	LDL-cholesterol	dla osób poniżej 16 r.ż. >4,0 mmol/l (155 mg/dl) dla osób powyżej 16 r.ż. >4,9mmol/l (190 mg/dl)
b	Kępkę żółte u probanta lub krewnego I° i II°	
c	Obecność mutacji genu <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> lub <i>PCSK9</i>	
d	Wywiad rodzinny: Zawał serca u krewnych I° przed 60 rokiem życia lub krewnych II° przed 50 rokiem życia	
e	Wywiad rodzinny: stężenie cholesterolu całkowitego powyżej 7,5 mmol/l (290 mg/dl) u dorosłego krewnego I° lub II° lub stężenie cholesterolu całkowitego powyżej 6,7mmol/l (260 mg/dl) u rodzeństwa <16 r.ż.	
Rozpoznanie FH		
Pewne	Kryteria a i b lub c	
Prawdopodobne	Kryteria a i d lub a i e	

Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organisation*, WHO) w 1998 roku w Genewie ogłosiła raport na temat hipercholesterolemii rodzinnej proponując kryteria kliniczne grupy *Dutch Lipid Clinic Network* (Tab. 6) [http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_HGN_FH_CONS_99.2.pdf].
Diagnoza FH na podstawie skali punktowej rozpoznania FH według *Dutch Lipid Clinic Network* jest oparta na następujących założeniach:

- występowanie u pacjenta przedwczesnej choroby wieńcowej lub choroby układu sercowo-naczyniowego
- obecność u chorego żółtaków ścięgien lub rąbka rogówkowego < 45 r.ż.

- hipercholesterolemia określona czterema zakresami stężeń LDL-C
- w wywiadzie rodzinnym występowanie u krewnych I stopnia: przedwczesnej choroby wieńcowej, żółtaków ścięgien, stężenia LDL-C powyżej 95 centyla u dorosłych i dzieci <18 r.ż.
- potwierdzenie obecności mutacji genu *LDLR*

Rozpoznanie kliniczne według *Dutch Lipid Clinic Network* można określić jako pewne, prawdopodobne lub możliwe, w zależności od sumy wyliczonych punktów [67].

Tab. 6 Kryteria diagnostyczne rozpoznania klinicznego HeFH *Dutch Lipid Clinic Network* [67]

Wywiad rodzinny:	
a. Krewny I stopnia z rozpoznaną przedwczesną chorobą wieńcową lub naczyniową	2 pkt
b. Krewny I stopnia z LDL-C > 95 percentyla	
i/lub	
c. Krewny I stopnia z żółtakami ścięgien i/ lub rąbkiem rogówkowym	1 pkt
d. Dziecko <18 r.ż. z LDL-C >95 percentyla	
Wywiad:	
a. Pacjent z przedwczesną (mężczyźni <55 r.ż., kobiety <60 r.ż.) CAD	2 pkt
b. Pacjent z przedwczesną (mężczyźni <55 r.ż., kobiety <60 r.ż.) chorobą naczyń mózgowych/obwodowych	1 pkt
Badanie przedmiotowe:	
a. Żółtaki ścięgien	6 pkt
b. Obwódka rogówki < 45 r.ż.	4 pkt
Badania laboratoryjne	
a. >8,5 mmol/l	8 pkt
b. 6,5-8,4 mmol/l	5 pkt
c. 5,0-6,4 mmol/l	3 pkt
d. 4,0-4,9 mmol/l	1 pkt
Analiza DNA	
a. Obecna funkcjonalna mutacja genu LDL receptora	8 pkt
FH	
Pewna	>8 pkt
Prawdopodobna	6-8 pkt
Możliwa	3-5 pkt

W 2011 Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ESC) i Europejskie Towarzystwo Miażdżycowe (EAS) w wytycznych na temat postępowania w dyslipidemii opublikowało skalę rozpoznania FH według MedPed i WHO (Tab. 7) [64].

Kryteria kliniczne hipercholesterolemii rodzinnej według MedPed i WHO rekomendowane przez ESC/EAS są bardzo zbliżone do skali *Dutch Lipid Clinic Network*. Brak w nich jednak punktu o potwierdzeniu obecności mutacji genu *LDLR*, a zakresy stężeń LDL-C uzupełniono o wyliczenia w mg/dl. Dodano także w tabeli podpunkt „brak rozpoznania” przy wyliczeniu mniej niż 3 punktów z tej skali (Tab. 7).

Tab. 7 Kryteria diagnostyczne do rozpoznania klinicznego HeFH według MedPed i WHO rekomendowane przez ESC/EAS w wytycznych dotyczących dyslipidemii z 2011 roku [64]

Kryteria MEDPED-WHO	punkty
Wywiad rodzinny:	
1. Krewny I stopnia z rozpoznaną przedwczesną CAD i/lub krewny I stopnia z LDL-C > 95 centyla	1 pkt
2. Krewny I stopnia z Tx i/lub dzieci < 18 lat z LDL-C > 95 centyla	2 pkt
Wywiad:	
1. Rozpoznano u chorego przedwczesną CAD	2 pkt
2. U chorego występuje przedwczesna choroba naczyń mózgowych/obwodowych	1 pkt
Badanie przedmiotowe:	
1. Tx	6 pkt
2. Obwódka rogówki < 45 r.ż.	4 pkt
LDL-cholesterol	
>8,5 mmol/l (> ~330 mg/dl)	8 pkt
6,5-8,4 mmol/l (~250-329 mg/dl)	5 pkt
5,0-6,4 mmol/l (~190-249 mg/dl)	3 pkt
4,0-4,9 mmol/l (~155-189 mg/dl)	1 pkt
FH	
Pewna	>8 pkt
Prawdopodobna	6-8 pkt
Możliwa	3-5 pkt
Brak rozpoznania	<3 pkt

*Przedwczesna CAD: u mężczyzn przed 55 r.ż, u kobiet — przed 60 r.ż. CAD — choroba wieńcowa; FH — hipercholesterolemia rodzinna; HeFH — heterozygotyczna hipercholesterolemia rodzinna; LDL-C — cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości; Tx — żółtaki ścięgien; WHO — Światowa Organizacja Zdrowia

W Polsce stosuje się kryteria rekomendowane przez Forum Ekspertów Lipidowych, zaadaptowane na podstawie klasyfikacji *Dutch Lipid Clinic Network*, *MedPed-WHO* i *Simon Broome Register* (Tab. 8) [68]. Skala ta w większości zawiera kryteria opracowane w Holandii i została zmodyfikowana w oparciu o punkty odcięcia dla LDL-cholesterolu stosowane w kryteriach *Simon Broome Register*. Użyteczność tych kryteriów w populacji polskiej nie została wcześniej dowiedziona badaniami ze względu na niską dostępność pełnej diagnostyki molekularnej.

Tab. 8 Kryteria kliniczne FH zaadaptowane na podstawie *MedPed-WHO* oraz *Simon Broome Register*. Stanowisko Forum Ekspertów Lipidowych [68]

Adaptacja skali MedPed i WHO oraz Simon Broome Register	punkty
Wywiad rodzinny:	
1. Krewni I stopnia z przedwczesną chorobą wieńcową lub naczyniową	1 pkt
2. Krewni I stopnia z LDL powyżej 190 mg/dl	1 pkt
3. Krewni I stopnia z żółtakami ścięgien i/lub rąbkami rogówkowym	2 pkt
4. Dzieci i młodzież poniżej 18 r.ż. z cholesterolem LDL powyżej 155 mg/dl	2 pkt
Wywiad kliniczny:	
1. Przedwczesna choroba wieńcowa (mężczyźni <55 r.ż., kobiety <60 r.ż.)	2 pkt
2. Przedwczesna choroba naczyń mózgowych lub obwodowych	1 pkt
Badanie przedmiotowe:	
1. Żółtaki ścięgien	6 pkt
2. Rąbek rogówkowy < 45 r.ż.	4 pkt
LDL –C:	
>8,5 mmol/l (330 mg/dl)	8 pkt
6,5-8,4 mmol/l (250-329 mg/dl)	5 pkt
5,0-6,4 mmol/l (190-249 mg/dl)	3 pkt
4,0-4,9 mmol/l (155-189 mg/dl)	1 pkt
Mutacja genu powodującego hipercholesterolemię rodzinną	8 pkt
Rozpoznanie FH:	
Pewne	>8 pkt
Prawdopodobne	6-8 pkt
Możliwe	3-5 pkt
Niepotwierdzone	<3 pkt

Czasem obecność hipercholesterolemii oraz objawy kliniczne i wywiad rodzinny mogą być niewystarczające do postawienia rozpoznania klinicznego FH. Taka sytuacja może wystąpić m.in. u młodych dorosłych, dzieci lub pacjentów z wtórnie podwyższonym stężeniem trójglicerydów. Wątpliwości pomoże rozstrzygnąć wynik badania

molekularnego w kierunku mutacji genów *LDLR*, *APOB* i *PCSK9*. Jest to metoda uznawana za efektywną kosztowo, szczególnie jako element diagnostyki kaskadowej rodzin i prewencji pierwotnej. Należy jednak pamiętać, że to nie obecność mutacji genu *LDLR*, *APOB* czy *PCSK9* powoduje wysokie ryzyko sercowo-naczyniowe, a spowodowana tym hipercholesterolemia. Dowiodły tego wyniki badania pacjentów z prawidłowym stężeniem LDL-C i mutacją genu *LDLR* i/lub *APOB* [69].

1.4.5 Leczenie hipercholesterolemii rodzinnej

Zasadnicze znaczenie w hipercholesterolemii rodzinnej ma wczesne wykrycie dotkniętych nią osób i zastosowanie skutecznego leczenia. Z tego powodu zaleca się niezwłocznie po klinicznym rozpoznaniu FH rozpoczęcie edukacji pacjentów oraz wdrożenie leczenia. Nie należy opóźniać tych działań w oczekiwaniu na wyniki molekularnego potwierdzenia [10].

Edukacja chorych jest jednym z niedocenianych czynników, które mogą pozytywnie wpłynąć na efekt leczenia [70 71]. Ważne jest, aby pacjent z FH otrzymał od lekarza informacje o podłożu genetycznym choroby i jej powikłaniach oraz dostępnych aktualnie metodach leczenia i rokowaniu. Choremu powinno się zalecić także modyfikację dodatkowych czynników ryzyka choroby wieńcowej: utrzymywanie ciśnienia tętniczego poniżej 140/90 mmHg, regularną aktywność fizyczną i redukcję masy ciała do BMI <25 kg/m² [68]. Należy pamiętać o bezwzględnym zakazie palenia papierosów w FH. Dieta pacjenta z hipercholesterolemią rodzinną powinna opierać się na niskim spożyciu pokarmów bogatych w cholesterol oraz tłuszcze trans-nasycone. *National Lipid Association* (NLA) zaleca, aby tłuszcze nasycone stanowiły poniżej 7% przyjmowanej energii, a dziennie spożycie cholesterolu było niższe niż 200 mg/dobę [72]. Wskazane są pokarmy bogate w kwasy tłuszczowe jednonienasycone i wielonienasycone, sterole roślinne oraz błonnik. Dzięki stosowaniu diety niskocholesterolowej można uzyskać dodatkowo 10-15% redukcję poziomu cholesterolu [68 70].

Zazwyczaj jednak pomimo ściśle przestrzeganej diety chorzy z FH wymagają farmakoterapii hypolipemizującej. Lekami pierwszego wyboru w hipercholesterolemii rodzinnej są statyny, czyli inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metylo-glutarylo-koenzymuA (HMG-CoA). Zastosowanie statyn we wczesnym etapie życia, w prewencji

pierwotnej, może obniżyć ryzyko sercowo-naczyniowe o niemal 80% [73]. Także u pacjentów z FH z rozpoznaną chorobą układu sercowo-naczyniowego inhibitory HMG-CoA mają korzystny wpływ na proces miażdżycowy i występowanie incydentów wieńcowych.

W leczeniu FH znajdują zastosowanie przede wszystkim „silne” statyny, takie jak rosuwastatyna i atorwastatyna [74-77]. Dawki należy zwiększać stopniowo do maksymalnie tolerowanych przez chorego, tak aby osiągnąć rekomendowany cel leczenia redukcji LDL-C.

Pacjenci wysokiego ryzyka z objawową chorobą układu sercowo-naczyniowego, wywiadem rodzinnym wczesnej CAD, co najmniej dwoma czynnikami ryzyka lub podwyższonym stężeniem lipoproteiny (a) mogą wymagać wysokich dawek statyn [78]. W świetle ostatnich badań niacyna nie jest już rekomendowana w leczeniu hipercholesterolemii, ze względu na swoje działania uboczne [79-81]. Efekt hypolipemizujący można zwiększyć dodając do terapii ezetimib lub żywice anionowymienne np. kolesewelam [82-83]. Leki te można także stosować w monoterapii w przypadku nietolerancji statyn. Niestety dotychczas nie udało się wykazać, że poza efektem hypolipemizującym, ezetimib i żywice anionowymienne wpływają na redukcję ryzyka sercowo-naczyniowego.

LDL- afereza

U części pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną, u których nie można uzyskać odpowiedniej redukcji cholesterolu LDL pomimo maksymalnie tolerowanej farmakoterapii, zastosowanie LDL-aferezy pozwala osiągnąć cel leczenia oraz poprawić właściwości reologiczne krwi. Terapia LDL-aferezą skutkuje zmniejszeniem ryzyka incydentów sercowo-naczyniowych i poprawą rokowania pacjentów [84-87]. W homozygotycznej FH przy ekstremalnie podwyższonych stężeniach cholesterolu LDL (często powyżej 600 mg/dl) jest to zazwyczaj leczenie z wyboru [55]. W przypadku heterozygot LDL-afereza jest ostatnią linią leczenia.

Food and Drug Administration (FDA) zaaprobowała leczenie LDL-aferezą w następujących grupach pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną leczonych farmakologicznie co najmniej 6 miesięcy [87-88]:

- funkcjonalna homozygota FH z LDL-C >300 mg/dl

- funkcjonalna heterozygota FH z LDL-C >300 mg/dl i 0-1 czynnikiem ryzyka
- funkcjonalna heterozygota FH z LDL-C >200 mg/dl i co najmniej dwoma czynnikami ryzyka lub stężeniem lipoproteiny (a) >50 mg/dl
- funkcjonalna heterozygota FH z LDL-C >160 mg/dl i chorobą układu sercowo-naczyniowego lub cukrzycą.

Aktualnie dostępne jest pięć rodzajów LDL-aferezy: DALI (ang. *direct adsorption of lipoproteins*), IMA (ang. *immunoabsorption*), DSA (ang. *dextran sulphate-cellulose adsorption*), HELP (ang. *heparin extracorporeal LDL precipitation system*) oraz DFPP (ang. *double filtration plasmapheresis*) [89]. Wybór metody jest indywidualny, zależy od konieczności stosowania u pacjenta ACE-inhibitorów, osobniczej odpowiedzi na leczenie oraz doświadczenia i preferencji ośrodka. Jeden zabieg trwa kilka godzin w zależności od objętości osocza poddawanego leczeniu oraz szybkości przepływu krwi. Bezpośrednio po zabiegu uzyskuje się obniżenie cholesterolu całkowitego i LDL-C o około 60 do 80%. Dodatkowo filtry stosowane w procedurach LDL-aferezy mogą redukować stężenie fibrynogenu i lipoproteiny (a) poprawiając reologiczne właściwości krwi. Warto monitorować stężenie żelaza podczas długotrwałej terapii i w razie potrzeby suplementować doustnie. Zabiegi powtarza się cyklicznie co tydzień lub dwa.

Ciężkie powikłania, takie jak reakcje alergiczne, podczas zabiegów aferezy zdarzają się bardzo rzadko. Inne, łagodne klinicznie powikłania obserwowane u 2 do 4 % chorych to powikłania miejscowe związane z dostępem naczyniowym, przejściowa hipotonia lub objawowa hipokalcemia [87-90]. Sam zabieg uważany jest jednak za bezpieczny, odnotowano przypadki bezpiecznego zastosowania LDL-aferezy u kobiet w ciąży z HoFH [91].

Nowe leki

W Holandii, która ma wieloletnie doświadczenie w opiece nad chorymi z FH, obserwowano, że odsetek chorych z FH, którzy osiągnęli cel leczenia w postaci redukcji poziomu LDL-C < 100 mg/dl jest niski (21%). Aż 96% z obserwowanych 1249 pacjentów z HeFH było poddanych terapii statynami. Jedna trzecia z tych osób była leczona za pomocą terapii skojarzonej z maksymalną dawką statyny oraz ezetimibu. Tylko u 47% chorych w badaniu udało się uzyskać obniżenie stężenia LDL-cholesterolu poniżej 50% [50 73]. Wyniki tego badania wskazują, że niewielka liczba chorych z FH osiąga cel

leczenia zalecany przez obecnie obowiązujące wytyczne. Powodem tego może być nietolerancja statyn, zbyt wysokie wyjściowe stężenia LDL-cholesterolu lub stosowanie zbyt małej dawki leków.

Aktualnie prowadzone są badania nad nowymi lekami obniżającymi poziom cholesterolu u pacjentów z hipercholesterolemią, którzy mają nietolerancję statyn lub nie osiągają celu leczenia [85].

Pierwszym z nowych leków hypolipemizujących, który został już zarejestrowany do leczenia hipercholesterolemii rodzinnej w Stanach Zjednoczonych Ameryki (FDA) oraz w Europie (ang. *European Medicines Agency*, EMA) jest lomitapid. Jest to białko należące do doustnych inhibitorów mikrosomalnego białka transportującego trójglicerydy (ang. *microsomal triglyceride transfer protein*, MPT). MPT bierze udział w tworzeniu lipoprotein zawierających APO-B w enterocytach i hepatocytach, jego zahamowanie zapobiega tworzeniu VLDL. Lomitapid został zarejestrowany na podstawie nierandomizowanego badania opublikowanego w *Lancet*, w którym stosowano ten lek u 29 homozygot FH przez 26 tygodni. Obserwowano wysoką skuteczność w redukcji LDL-cholesterolu u homozygot FH (około 44%) ale także częste objawy niepożądane (m.in. biegunkę, nudności, dyspepsja i wymioty, dyskomfort, zaparcia). Najpoważniejszym objawem niepożądanym był wzrost aminotransferaz i stłuszczenie wątroby. Nie jest znany jeszcze wpływ leczenia lomitapidem na ryzyko sercowo-naczyniowe chorych. Ze względu na obserwowane objawy uboczne, FDA zaleciła dodatkowo utworzenie rejestru monitorującego leczenie chorych lomitapidem [92-93].

W trakcie badań klinicznych trzeciej fazy jest mipomersen, APOB antysensowny oligonukleotyd i inhibitor syntezy apolipoproteiny B. Zastosowany u chorych z homozygotyczną i heterozygotyczną hipercholesterolemią rodzinną powodował redukcję poziomu LDL-C do 37%. Najczęściej obserwowanymi objawami ubocznymi były przejściowe, łagodne do umiarkowanych, reakcje skórne w miejscu iniekcji oraz objawy paragrypowe. U niektórych pacjentów obserwowano ponad 3-krotny wzrost aminotransferaz i stłuszczenie wątroby [94-96].

Białko PCSK9, jako cel leczenia hypolipemizującego, wzbudza aktualnie duże zainteresowanie ze względu na udokumentowany związek mutacji genu *PCSK9 loss-of-function* z niskimi stężeniami LDL-C. U Afroamerykanów mutacje *PCSK9* typu *nonsense* prowadziły do 28% redukcji cholesterolu LDL i 88% obniżenia ryzyka sercowo-

naczyniowego [97]. Opracowano kilka strategii lekowych mających na celu obniżenie aktywności białka PCSK9: terapia oparta na antysensownych nukleotydach, przeciwciała monoklonalne oraz małe interferujące mRNA. Leki te podawane dodatkowo do stosowanej wcześniej statyny w podskórnych wstrzyknięciach były dobrze tolerowane i znacznie obniżały stężenie LDL-C, w jednym z badań do 67,9% vs placebo [98-100].

Ostatecznym terapeutycznym rozwiązaniem dla chorych z hipercholesterolemią rodzinną homozygotyczną FH jest przeszczep wątroby [55 101 102]. Na etapie badań pozostaje terapia genowa, jej rozwój może stanowić szansę dla wielu chorych [103].

Cel leczenia

Cel leczenia w FH zależy od tego, czy pacjent należy do kategorii ryzyka dużego czy bardzo dużego, zgodnie z wytycznymi ESC/EAS [7]. Celem leczenia pacjentów z kategorii dużego ryzyka w prewencji pierwotnej choroby wieńcowej jest stężenie cholesterolu LDL poniżej 2,5 mmol/l (< 100 mg/dl). Dodatkowe rozpoznanie choroby sercowo-naczyniowej kwalifikuje chorego do kategorii ryzyka bardzo dużego, tym samym celem leczenia jest osiągnięcie stężenia cholesterolu LDL poniżej 1,8 mmol/l (< 70 mg/dl). Takie cele leczenia u pacjentów z FH mogą być trudne do osiągnięcia nawet przy farmakoterapii złożonej. Zaleca się w takich przypadkach co najmniej 50% redukcję poziomu wyjściowego [7].

Eksperti Forum Lipidowego w Polsce stoją na stanowisku, że uzyskanie 5 lub więcej punktów, wyliczonych na podstawie kryteriów rozpoznania klinicznego FH, powinno być wystarczającym uzasadnieniem dla leczenia refundowanego ze środków publicznych [68].

Ryzyko sercowo-naczyniowe oraz przedwczesną śmiertelność u osób z FH można istotnie obniżyć dzięki zastosowaniu wczesnej prewencji pierwotnej. Powinna ona składać się z edukacji, modyfikacji dodatkowych czynników ryzyka oraz leczenia statynami nawet od 8 r.ż. Analiza wyników prospektywnego badania z FH prowadzonego w Wielkiej Brytanii wykazała obniżenie śmiertelności sercowo-naczyniowej w prewencji pierwotnej o 48%, a w prewencji wtórnej o 25% [104]. Można to wytłumaczyć zastosowaniem u pacjentów z FH zaleceń dotyczących wymaganych zmian stylu życia m.in. zakazu palenia i utrzymywania prawidłowej wagi ciała. Chorzy z FH byli także otoczeni ścisłą opieką lekarską i stosowali statyny przez wiele lat. Ponadto wyniki badania *Simon*

Broome Register pokazują korzyści ze stosowania skriningu kaskadowego. Koszt oznaczenia profilu lipidowego oraz wykonania badania molekularnego, a tym samym identyfikacji nowych przypadków FH, jest stosunkowo niski u krewnych [105-111].

1.4.6 Hipercholesterolemia rodzinna u kobiet

W czasie ciąży stężenie cholesterolu znacznie się zwiększa stanowiąc zagrożenie zarówno dla matki, jak i dla dziecka. Już w 6 miesiącu życia płodowego wykazano istnienie blaszek miażdżycowych w ścianie aorty płodu [112 113]. U dzieci matek z hipercholesterolemią blaszki miażdżycowe są znacznie większe niż u dzieci zdrowych kobiet [114]. U dorosłych z hipercholesterolemią, których matki chorują na FH, wcześniej niż u dorosłych, gdzie chorują ojcowie, rozwijają się objawy choroby wieńcowej.

Pacjentki z FH w wieku rozrodczym powinny zostać poinformowane przez lekarza o ryzyku związanym ze stosowaniem statyn przed rozpoczęciem leczenia. Zaleca się jednoczesne stosowanie metody antykoncepcji o wysokim stopniu skuteczności [43]. Doustne hormonalne tabletki antykoncepcyjne 1 i 2 generacji są prawdopodobnie powiązane z niewielkim zwiększeniem ryzyka sercowo-naczyniowego, dlatego po konsultacji z ginekologiem warto rozważyć leki 3 generacji. Badania wskazują, że nie zwiększają one ryzyka zawału serca [115]. Dobrym rozwiązaniem może być antykoncepcja metodą wkładki domacicznej, szczególnie u kobiet, które już rodziły.

Statyny u ciężarnych lub karmiących piersią z hipercholesterolemią rodzinną są przeciwwskazane ze względu na ich udowodnioną teratogenność [116]. W przypadku planowanej ciąży zaleca się zaprzestanie farmakoterapii statynami na trzy miesiące przed rozpoczęciem współżycia bez środków antykoncepcyjnych. W okresie ciąży i karmienia piersią dopuszczalne jest jedynie stosowanie żywic anionowymiennych (np. kolesewelamu), jednakże ich efekt hypolipemizujący jest słaby.

W szczególnych przypadkach ciężarnych z HoFH lub HeFH powikłanej chorobą wieńcową można rozważyć zastosowanie aferezy LDL-cholesterolu. Ta metoda leczenia może zapobiegać zmianom w tętnicy pępowinowej zmniejszającym dopływ krwi do płodu, niewydolności łożyska oraz postępowi procesowi miażdżycowemu u matki [117 118].

Innym okresem życia istotnym klinicznie dla kobiet obciążonych FH jest klimakterium. Po menopauzie, ze względu na istotny wzrost poziomu LDL-cholesterolu,

powinno się zalecać zwiększoną aktywność fizyczną, rygorystyczną dietę niskocholesterolową oraz rozważyć zastosowanie wyższej dawki statyny lub ezetimibu. W obecnej chwili nie jest jasne jak wpływa hormonalna terapia zastępcza (HTZ) na ryzyko incydentu wieńcowego u kobiet z hipercholesterolemią rodzinną [119]. Wzrost ryzyka zawału serca u kobiet stosujących HTZ wykazano w badaniach HERS (*Heart and Estrogen/progestin Replacement Study*) oraz WHI (*The Women's Health Initiative*). Prawdopodobnie jednak droga zastosowania hormonalnej terapii zastępczej ma związek ze wzrostem ryzyka sercowo-naczyniowego. Analiza wyników obserwacyjnego badania dowiodła wyższości systemów przezskórnej HTZ nad doustną [36 120-127].

1.4.7 Dzieci z hipercholesterolemią rodzinną

Zaleca się wczesne rozpoznanie FH, szczególnie u dzieci, których rodzice są obciążeni hipercholesterolemią rodzinną. Lipidogram można uznać za diagnostyczny we wczesnym dzieciństwie, najlepiej wykonać go około drugiego roku życia. Należy unikać pomiaru w pierwszych sześciu tygodniach życia, ponieważ duże stężenie LDL-C może być maskowane przez wysoki poziom HDL-C. Poziom cholesterolu całkowitego wzrasta wraz z wiekiem, aż do przedpokwitaniowego przyspieszenia wzrostu, kiedy to ulega redukcji. Ponownie poziom cholesterolu rośnie po zatrzymaniu przyspieszenia wzrostu, aż do poziomów obserwowanych u dorosłych [128]. Trzeba jednak pamiętać, szczególnie przy granicznych stężeniach cholesterolu, że dziecko może już otrzymywać dietę niskocholesterolową, ze względu na obecność FH u jednego z członków rodziny. Pewne rozpoznanie FH zapewnia tylko diagnostyka molekularna. Materiał genetyczny od dzieci z podejrzeniem hipercholesterolemii rodzinnej może być pobrany również za pomocą wymazu z jamy ustnej, ale tylko wtedy, gdy w rodzinie potwierdzono obecność mutacji genu *LDLR* lub *APOB* [72 105 128-138].

Dzieci z homozygotyczną postacią hipercholesterolemii rodzinnej oprócz obciążenia rodzinnego już we wczesnym wieku mogą prezentować objawy choroby wieńcowej, miażdżycy tętnic obwodowych, stenozy aortalnej, incydentów mózgowych. Jednakże objawy te mogą być mylone z łagodniejszymi chorobami dopóki nie postawi się ostatecznego rozpoznania hipercholesterolemii rodzinnej. W przypadku homozygotycznej FH konieczne jest zazwyczaj zastosowanie terapii statynami oraz LDL-aferezy. U dzieci z

bardzo ciężkim przebiegiem hipercholesterolemii opisano próby leczenia przeszczepem wątroby. Leczenie homozygotyczne hipercholesterolemii u dzieci pozostaje wyzwaniem i przyczyną poszukiwań nowych metod, zmierzających w kierunku nowoczesnych leków, przeszczepu komórek wątrobowych oraz terapii genowej [55 88].

Heterozygotyczna postać hipercholesterolemii rodzinnej u dzieci może przebiegać bezobjawowo, aż do wieku dorosłego. Na rozpoznanie FH powinien nakierować wywiad rodzinny w kierunku przedwczesnej choroby wieńcowej lub hipercholesterolemii. Leczenie dzieci należy rozpocząć od modyfikacji stylu życia i diety niskocholesterolowej, która jest uważana za bezpieczną od 7 miesiąca życia [139]. Podobnie jak u dorosłych niezbędna jest także zwiększona aktywność fizyczna i redukcja masy ciała.

U dzieci z FH należy rozważyć rozpoczęcie leczenia hypolipemizującego po 8 r.ż. w zależności od poziomu LDL-C i dodatkowych obciążeń [136]. W leczeniu można stosować żywice anionowymienne, statyny, ezetimib. W kilku badaniach klinicznych udowodniono, że u dzieci z hipercholesterolemią rodzinną heterozygotyczną można bezpiecznie i skutecznie stosować statyny. W jednym z tych badań obserwowano i leczono statyną dzieci w wieku od 8 do 18 lat przez 4,5 roku [140]. Nie odnotowano negatywnego wpływu na wzrost, dojrzewanie, poziom gonadotropin, objętość jąder, poziom aminotransferaz lub CPK [43]. Wiek, w którym wdrożono leczenie statyną, był niezależnym czynnikiem wpływającym na redukcję IMT tętnicy szyjnej, co może przekładać się na znaczne korzyści w prewencji przedwczesnej miażdżycy u młodych chorych z FH [141 142]. Należy stosować statyny o udowodnionym u dzieci profilu bezpieczeństwa: lowastatynę, prawastatynę, simwastatynę, atorwastatynę i rosuwastatynę (badanie PLUTO). W przypadku złej tolerancji statyn u dzieci można zastosować w monoterapii lub terapii złożonej ezetimib lub żywice anionowymienne [131-133 143].

Wskazania do zastosowania leków hypolipemizujących u dzieci są następujące:

- Stężenie LDL-cholesterolu ≥ 190 mg/dl
- Stężenie LDL-cholesterolu ≥ 160 mg/dl i wywiad rodzinny przedwczesnej choroby wieńcowej
- Stężenie LDL-cholesterolu ≥ 160 mg/dl oraz co najmniej dwa dodatkowe czynniki ryzyka [128].

2. CEL PRACY

Cel badań

Celem prowadzonych badań jest ocena zgodności klinicznego rozpoznania hipercholesterolemii rodzinnej z wykorzystaniem zmodyfikowanych kryteriów FH, zawartych w stanowisku Forum Ekspertów Lipidowych, z wynikami badań molekularnych [68].

Cel pracy realizowano przez analizę wyników badań molekularnych (mutacja genu *APOB* i/lub *LDLR*) u pacjentów z rozpoznaniem klinicznym hipercholesterolemii rodzinnej w materiale własnym z uwzględnieniem wieku.

Główna hipoteza badawcza:

Zmodyfikowane kryteria kliniczne hipercholesterolemii rodzinnej są przydatne w warunkach polskich do kwalifikacji chorych do diagnostyki molekularnej w kierunku mutacji genu *APOB* i/lub *LDLR*.

Dodatkowa hipoteza badawcza:

Zmodyfikowane kryteria kliniczne hipercholesterolemii rodzinnej są szczególnie przydatne w populacji polskiej w grupie pacjentów poniżej 40 r.ż.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1 Badana grupa

Badania zostały przeprowadzone w grupie 151 pacjentów Poradni Kardiologicznej przy I Klinice Kardiologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Do diagnostyki hipercholesterolemii rodzinnej zostali zakwalifikowani dorośli pacjenci (powyżej 18 r.ż.) z poziomem LDL-cholesterolu w osoczu powyżej 190 mg/dl i trójglicerydów poniżej 250 mg/dl oraz klinicznym podejrzeniem hipercholesterolemii rodzinnej zgodnie z kryteriami rekomendowanymi przez Forum Ekspertów Lipidowych (Tab. 9).

Tab. 9 Kryteria kliniczne FH zaadaptowane na podstawie MEDPED i WHO oraz Simon Broome Register. Stanowisko Forum Ekspertów Lipidowych [68]

Adaptacja skali MEDPED i WHO oraz Simon Broome Register	punkty
Wywiad rodzinny:	
1. Krewni I stopnia z przedwczesną chorobą wieńcową lub naczyniową	1 pkt
2. Krewni I stopnia z LDL powyżej 190 mg/dl	1 pkt
3. Krewni I stopnia z żółtakami ścięgien i/lub rąbką rogówkowym	2 pkt
4. Dzieci i młodzież poniżej 18 r.ż. z cholesterolem LDL powyżej 155 mg/dl	2 pkt
Wywiad kliniczny:	
1. Przedwczesna choroba wieńcowa (<55 r.ż. mężczyźni, <60 r.ż. kobiety)	2 pkt
2. Przedwczesna choroba naczyń mózgowych lub obwodowych	1 pkt
Badanie przedmiotowe:	
1. Żółtaki ścięgien	6 pkt
2. Rąbek rogówkowy < 45 r.ż.	4 pkt
LDL –C:	
>8,5 mmol/l (330 mg/dl)	8 pkt
6,5-8,4 mmol/l (250-329 mg/dl)	5 pkt
5,0-6,4 mmol/l (190-249 mg/dl)	3 pkt
4,0-4,9 mmol/l (155-189 mg/dl)	1 pkt
Mutacja genu powodującego hipercholesterolemię rodzinną	8 pkt
Rozpoznanie FH	
Pewne	>8 pkt
Prawdopodobne	6-8 pkt
Możliwe	3-5 pkt
Brak rozpoznania	<3 pkt

Kryteria te składają się z wywiadu w kierunku przedwczesnej choroby układu sercowo-naczyniowego, obecności żółtaków ścięgien i rąbka rogówkowego (poniżej 45 r.ż.) stężeniach LDL-cholesterolu w surowicy oraz wywiadzie rodzinnym w kierunku występowania przedwczesnej choroby wieńcowej, hipercholesterolemii, żółtaków i rąbka rogówkowego.

Każdy pacjent w badaniu na podstawie uzyskanej sumy punktów z kryteriów klinicznych został zakwalifikowany do trzech grup ryzyka rozpoznania FH: pewne powyżej 8 pkt, prawdopodobne 6-8 pkt lub możliwe 3-5 pkt.

Z badania zostali wykluczeni pacjenci z wtórną hipercholesterolemią (m.in. z cukrzycą, hypotyreozą, chorobami nerek i wątroby) stwierdzaną na podstawie wywiadu oraz badań dodatkowych, jak również pacjenci z hiperlipidemią mieszaną określaną jako współistniejące wysokie stężenie trójglicerydów powyżej 250 mg/dl.

Za młodych chorych z FH uznano pacjentów poniżej 40 r.ż. Granicę wieku 40 lat ustalono na podstawie dostępnych danych z piśmiennictwa, które wskazują, że śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych w grupie nieleczonych osób z hipercholesterolemią rodzinną w wieku od 20 do 39 lat jest 100-krotnie wyższa, niż w grupie osób zdrowych [36].

Uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym na podstawie przygotowanego protokołu. Wszyscy pacjenci przed włączeniem do badania wyrazili pisemną zgodę.

3.2 Metodologia badań

3.2.1 Dane kliniczne (badanie podmiotowe i przedmiotowe)

Dane kliniczne dotyczące dotychczasowego przebiegu hipercholesterolemii rodzinnej oraz jej powikłań, jak również czynników ryzyka miażdżycy tętnic wieńcowych były zbierane przy pomocy formularza wywiadu opracowanego na potrzeby diagnostyki hipercholesterolemii rodzinnej oraz tabeli ze zmodyfikowanymi kryteriami klinicznymi. W razie potrzeby pacjenci byli proszeni o ponowny kontakt osobisty lub telefoniczny w celu wyjaśnienia zaistniałych wątpliwości co do przebiegu choroby.

Każdy z tych chorych został poddany badaniu podmiotowemu i przedmiotowemu.

Przedwczesna choroba układu sercowo-naczyniowego (pCVD) została zdefiniowana na podstawie dokumentacji pacjenta jako choroba wieńcowa oraz choroba naczyń mózgowych lub tętnic obwodowych u mężczyzn poniżej 55 r.ż., a u kobiet poniżej 60 r.ż., zgodnie z wytycznymi dotyczącymi dyslipidemii ESC/EAS z 2011 roku (kryteria diagnostyczne do rozpoznania klinicznego HeFH) [7].

Podobnie za rodzinne obciążenie przedwczesną chorobą wieńcową uznawano występowanie choroby wieńcowej u krewnego pierwszego stopnia (rodzice, rodzeństwo) u mężczyzn poniżej 55 r.ż., a u kobiet poniżej 60 r.ż., zgodnie z wytycznymi dotyczącymi dyslipidemii ESC/EAS z 2011 roku (kryteria diagnostyczne do rozpoznania klinicznego HeFH).

Przeprowadzono szczegółowy wywiad rodzinny występowania wśród krewnych I stopnia hipercholesterolemii, definiowanej jako stężenie cholesterolu LDL powyżej 190 mg/dl u dorosłych lub u dzieci powyżej 155 mg/dl oraz wywiad w kierunku obecności żółtaków ścięgien i rąbka rogówkowego.

Nadciśnienie tętnicze rozpoznawano wówczas, gdy przynajmniej dwukrotny pomiar wykazywał wartości ≥ 140 mmHg dla ciśnienia skurczowego i/lub ≥ 95 mmHg dla ciśnienia rozkurczowego oraz w przypadku wcześniej rozpoznanego nadciśnienia tętniczego i/lub przyjmowania przez chorego leków hipotensyjnych. Podobnie cukrzycę rozpoznawano na podstawie standardowych kryteriów WHO oraz na podstawie wywiadu i wdrożonego leczenia hipoglikemicznego. Jako wywiad w kierunku palenia tytoniu określano osobę, która paliła w momencie włączenia do badania lub paliła przez co najmniej rok zanim zaprzestała palenia. Żółtaki ścięgien uznawano za obecne w badaniu przedmiotowym, jeśli ścięgna miały guzki.

Jako wartość kwalifikującą do rozpoznania FH zostało uznane maksymalne, kiedykolwiek oznaczone i dostępne w dokumentacji chorego, stężenie LDL-cholesterolu na czczo. Profil lipidowy (cholesterol całkowity, cholesterol frakcji HDL, trójglicerydy) i poziom glikemii na czczo były oznaczane standardowymi metodami analityki medycznej w Centralnym Laboratorium UCK. Stężenie cholesterolu LDL było wyliczane z równania Friedewalda przy poziomie trójglicerydów niższym niż 350 mg/dl.

3.2.2 Izolacja DNA i badania molekularne

Materiałem do wykonania analizy DNA w kierunku mutacji *LDLR* i/lub *APOB* była obwodowa krew żylna pobrana do probówek z etylenodwuaminoczeroctanem (EDTA) w ilości 6 ml. Izolację DNA oraz badania molekularne w kierunku FH przeprowadzili: dr hab. Bartosz Wasąg, dr n. med. Magdalena Chmara oraz mgr Monika Żuk z Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki GUMed pod kierownictwem Prof. Janusza Limona.

Izolacja DNA z leukocytów krwi obwodowej została dokonana metodą trawienia proteinazą K, ekstrakcji fenol/chloroform i precypitacji etanolem. Analizę molekularną genów *LDLR* oraz *APOB* wykonano za pomocą techniki sekwencjonowania oraz MLPA (ang. *Multiplex-Ligation-dependent Probe Amplification*). Analizie genetycznej podlegały całe sekwencje kodujące i promotorowe tych genów. Przy pomocy reakcji PCR zamplifikowano sekwencję promotorową oraz eksony i introny genu *LDLR*, jak również fragment eksonu 26 genu *APOB*. Następnie przy pomocy aparatu Genetic Analyzer 3130 wykonano bezpośrednie sekwencjonowanie, wykorzystując starter sensowny i antysensowny. Do analizy wykorzystano oprogramowanie Sequencher. W celu potwierdzenia wykrytych mutacji próbki były ponownie amplifikowane i sekwencjonowane. Dzięki technice sekwencjonowania bezpośredniego można wykryć wszystkie rodzaje mutacji punktowych, zarówno zamiany nukleotydu, jak i delecji lub insercji kilku lub kilkunastu nukleotydów. Przeprowadzenie analizy delecji i duplikacji dużych fragmentów DNA umożliwiła technika MLPA (kit SALSA P062B, MRC-Holland) [144].

3.2.3 Metodologia badań statystycznych

Wszystkie obliczenia zostały wykonane za pomocą arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel (wersja 2011) oraz oprogramowania statystycznego StatSoft Inc. Statistica wersja 8.5. Opisując ilościowe dane statystyczne posługiwano się klasycznymi miarami położenia, jak średnia arytmetyczna i mediana, oraz odchyleniem standardowym i rozstępem międzykwartylowym jako miarami zmienności. Dane zostały przedstawione jako średnie wartości \pm odchylenie standardowe (SD). Aby dokonać oceny statystycznej istotności różnic danych nieparametrycznych jakościowych zbudowano tabele

kontyngencji i zastosowano testy Chi-kwadrat. W zależności od liczebności próbek oraz liczebności oczekiwanych zastosowano oryginalną metodę Pearsona albo dokładny test Fishera. Dla zmiennych mierzalnych badano normalność rozkładu zmiennych i równość wariancji badanej cechy w grupach odpowiednio testem W Shapiro-Wilka i testem równości wariancji. Przy porównaniu dwóch grup dla danych ilościowych posługiwano się testem t-Studenta dla danych parametrycznych o rozkładzie normalnym i jednorodnych wariancjach oraz testem U Manna-Whitney'a, w przypadku nie spełnienia takich założeń. W celu ustalenia optymalnej wartości progu odcięcia cech ciągłych zastosowano analizę ROC (ang. *Receiver Operating Characteristic*) z wyznaczeniem przebiegu krzywych oraz obliczeniem pola pod krzywą (AUC, *Area Under Curve*). Analizy ROC przeprowadzono trzema metodami: wyznaczanie optymalnego punktu odcięcia na krzywej ROC, wykres przecięcia krzywych czułości i swoistości oraz optymalizacja wyników fałszywych. Wykres przecięcia krzywych czułości i swoistości (*ROC decision plot*) pozwala na zlokalizowanie punktu, w którym wartość czułości i swoistości jest jednocześnie największa. Metoda optymalizacji wyników fałszywych określa najmniejszą liczbę wyników fałszywie ujemnych i fałszywie dodatnich. Wyznaczenie optymalnego punktu odcięcia na krzywej ROC było możliwe jedynie w przypadku odpowiedniego przebiegu krzywej określanego wizualnie. W wynikach za najlepszą wartość diagnostyczną uznawano punkt na krzywej ROC o najwyższej czułości przy co najmniej 50% swoistości. We wszystkich testach statystycznych za poziom statystycznej istotności różnic przyjęto $p < 0,05$, natomiast próby nieistotne statystycznie określano jako NS.

4. WYNIKI

4.1 Charakterystyka badanej grupy z klinicznym rozpoznaniem hipercholesterolemii rodzinnej

Wstępnie przeprowadzono analizę parametrów klinicznych, biochemicznych i molekularnych u 151 pacjentów z klinicznym rozpoznaniem hipercholesterolemii rodzinnej (Tab. 10).

Tab. 10. Profil lipidowy i wiek badanej grupy z klinicznym rozpoznaniem FH (n=151)

Wskaźnik	wynik
Wiek (lata)	48±13
Cholesterol całkowity (mg/dl)	350±69
Cholesterol LDL (mg/dl)	263±65
Cholesterol HDL (mg/dl)	57±15
Trójglicerydy (mg/dl)	147±67

Tab. 11 Charakterystyka kliniczna i molekularna badanej grupy z klinicznym rozpoznaniem FH (n=151)

Wskaźnik	n	%
Płeć męska	50	33
Pacjenci poniżej 40 r.ż.	41	27
Mutacja genu <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i>	99	66
Mutacja genu <i>LDLR</i>	89	59
Mutacja genu <i>APOB</i>	12	8
Heterozygoty proste pod względem <i>LDLR</i> lub <i>APOB</i>	96	64
Heterozygoty złożone	3	2
Rozpoznanie możliwe 3-5 pkt	50	33
Rozpoznanie prawdopodobne 6-8 pkt	63	42
Rozpoznanie pewne >8 pkt	38	25
Rozpoznana przedwczesna choroba wieńcowa	63	42
Przebyty zawał mięśnia sercowego	29	19
Rozpoznana przedwczesna choroba naczyń obwodowych lub mózgowych	13	9
Wywiad rodzinny w kierunku przedwczesnej CAD	81	54
Wywiad rodzinny w kierunku hipercholesterolemii	93	62
Nadciśnienie tętnicze	58	38
Cukrzyca	13	9

Średni wiek badanych pacjentów wynosił 48 lat (± 13). Pacjenci z rozpoznaną klinicznie FH charakteryzowali się wysokim średnim stężeniem cholesterolu całkowitego (350 ± 69 mg/dl) i LDL-cholesterolu (263 ± 65 mg/dl), natomiast średnie stężenia HDL cholesterolu oraz trójglicerydów znajdowały się w granicach normy (Tab. 10).

Pacjenci poniżej 40 r.ż. stanowili 27% pacjentów. Pośród badanych osób było 33% mężczyzn. Mutacje potwierdzające hipercholesterolemię rodzinną (*APOB* i/lub *LDLR*) zostały wykryte u 66% pacjentów. Mutacje genu *LDLR* wystąpiły u 59%, a mutacje genu *APOB* u 8% pacjentów. Złożone heterozygoty (mutacja *APOB* i/lub *LDLR*) stanowiły 2%, natomiast heterozygoty proste 64 % badanych pacjentów (Tab. 11).

Na podstawie kryteriów klinicznych postawiono rozpoznanie FH: możliwe (3-5 pkt) u 33% i pewne (>8 pkt) u 25% pacjentów. Najwięcej, czyli 42% spośród badanych osób, miało rozpoznanie prawdopodobne FH (6-8 pkt) (Tab. 11).

Przedwczesna choroba wieńcowa została rozpoznana u 42% pacjentów, a przedwczesna choroba naczyń obwodowych lub mózgowych u 9% badanych osób. Zawał mięśnia sercowego przeżyło 19% badanych (Tab. 11).

Dodatni wywiad rodzinny w kierunku przedwczesnej choroby wieńcowej stwierdzono u 54% pacjentów. Dodatni wywiad rodzinny w kierunku hipercholesterolemii wykazano u 62% pacjentów. Dodatkowe czynniki ryzyka, takie jak nadciśnienie tętnicze i cukrzyca, stwierdzano odpowiednio u 38% i 9% badanych (Tab. 11).

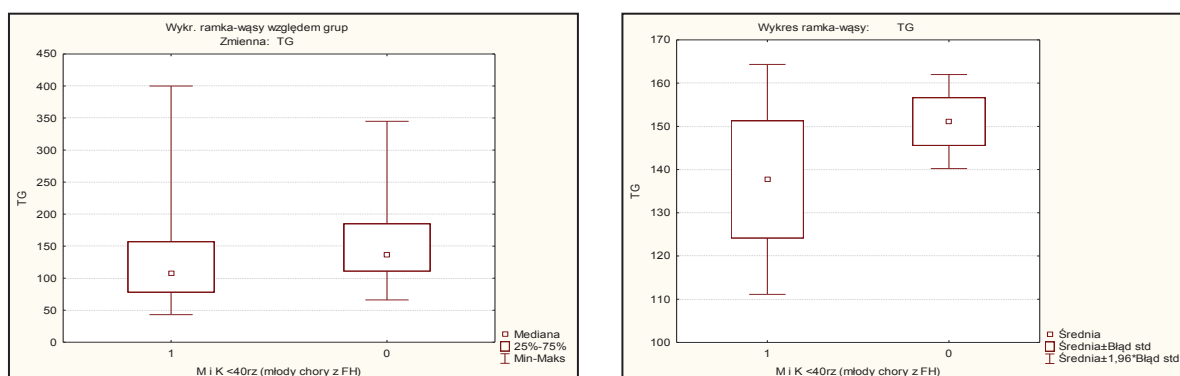
4.2 Pacjenci z klinicznym rozpoznaniem hipercholesterolemii rodzinnej zależnie od wieku, poniżej 40 r.ż. i \geq 40 r.ż.

Porównano dwie grupy pacjentów z kliniczną FH zależnie od wieku. Granicę podziału grup według wieku ustalono na poziomie 40 lat, co ma związek z bardzo wysokim ryzykiem zgonu w nieleczonej HeFH do 39 r.ż. Grupa pacjentów poniżej 40 r.ż. składała się z 41 osób, a grupa \geq 40 r.ż. liczyła 110 osób. W grupach tych analizowano stężenie cholesterolu całkowitego, LDL-cholesterolu, trójglicerydów i HDL-cholesterolu oraz sumę uzyskanych punktów z kryteriów klinicznych FH.

Tab.12 Charakterystyka biochemiczna pacjentów z klinicznym rozpoznaniem hipercholesterolemii rodzinnej zależnie od wieku

Parametr/badana grupa (n=151)	Średnia wartość		P
	Pacjenci z FH <40 r.ż. (n=41)	Pacjenci z FH \geq 40 r.ż. (n=110)	
LDL-C mg/dl	264 \pm 53	263 \pm 68	NS
Ch-C mg/dl	342 \pm 60	352 \pm 72	NS
HDL-C mg/dl	53 \pm 12	58 \pm 16	NS
TG mg/dl	138 \pm 87	151 \pm 58	<0,05
suma punktów kryteriów klinicznych FH	7,0 \pm 2,3	7,0 \pm 2,5	NS

W grupach pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH poniżej 40 r.ż. oraz ≥ 40 r.ż. nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w stężeniach HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu, cholesterolu całkowitego, jak również w sumie punktów kryteriów klinicznych FH (Tab. 12). Analiza statystyczna wykazała natomiast istotnie statystycznie mniejsze stężenie trójglicerydów u pacjentów poniżej 40 r.ż. (Tab. 12 i Rys. 1).



Rys. 1 Wykresy pudełkowe dla mediany (a) i średniej (b) dla stężenia trójglicerydów (TG) w grupach wiekowych. Grupa osób w wieku poniżej 40 r.ż. oznaczona jako 1; grupa osób w wieku ≥ 40 r.ż. oznaczona jako 0.

4.3 Pacjenci z klinicznym rozpoznaniem hipercholesterolemii rodzinnej zależnie od wyniku analizy DNA w kierunku mutacji *LDLR* i/lub *APOB*

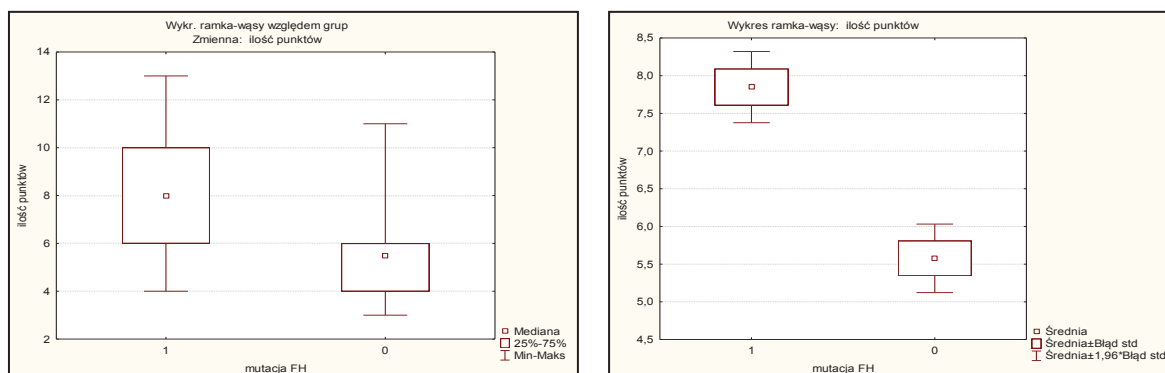
W kolejnym etapie porównano wyniki pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB*.

4.3.1 Parametry ilościowe badanych pacjentów zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB*

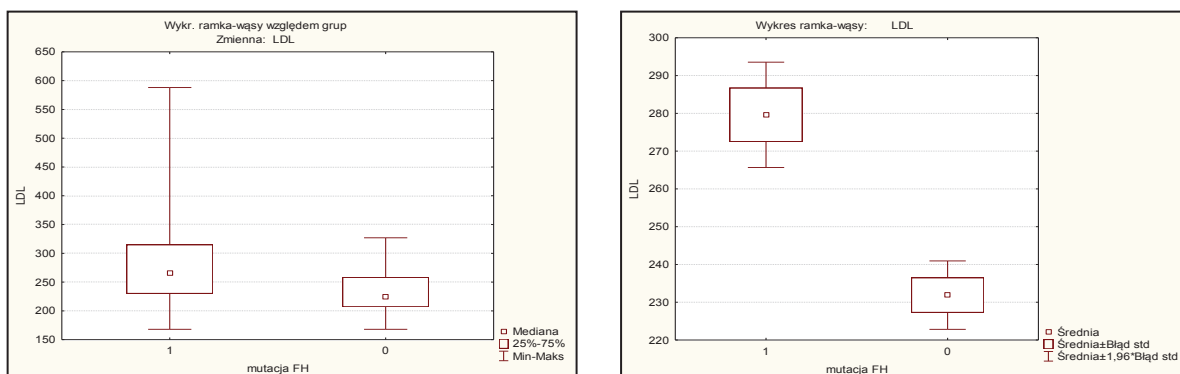
Analizie statystycznej poddano najpierw stężenie HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu, cholesterolu całkowitego, trójglicerydów, wiek oraz sumę punktów kryteriów klinicznych FH w zależności od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB*.

Tab.13 Parametry kliniczne i biochemiczne pacjentów z FH zależnie od obecności lub nie mutacji LDLR i/lub APOB. Wyniki przedstawiono jako średnia wartość \pm SD.

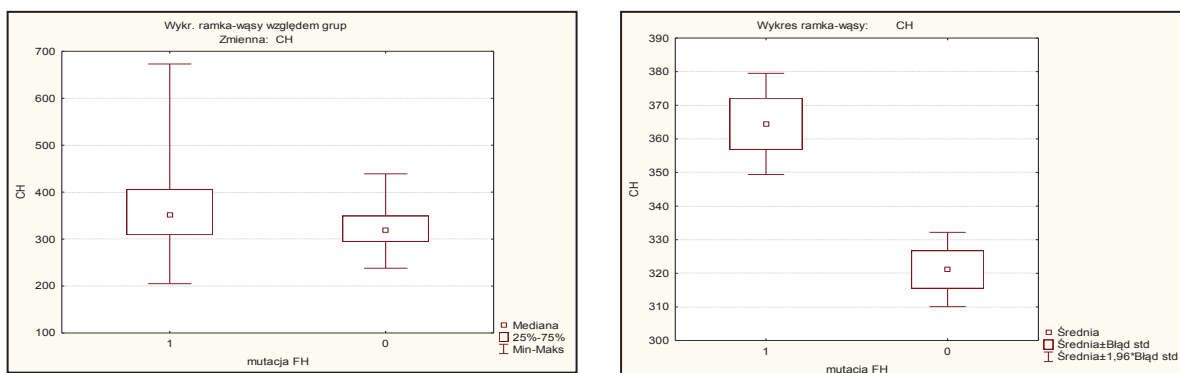
Parametr/grupa badana (n=151)	Mutacja LDLR i/lub APOB		P
	Obecna mutacja (n=99)	Brak mutacji (n=52)	
LDL-C mg/dl	280 \pm 71	232 \pm 33	<0,05
Ch-C mg/dl	364 \pm 76	321 \pm 41	<0,05
HDL-C mg/dl	57 \pm 16	58 \pm 13	NS
TG mg/dl	140 \pm 62	161 \pm 74	NS
Wiek (lata)	46 \pm 15	52 \pm 10	<0,05
suma punktów kryteriów klinicznych FH	8 \pm 2,4	6 \pm 1,7	<0,05



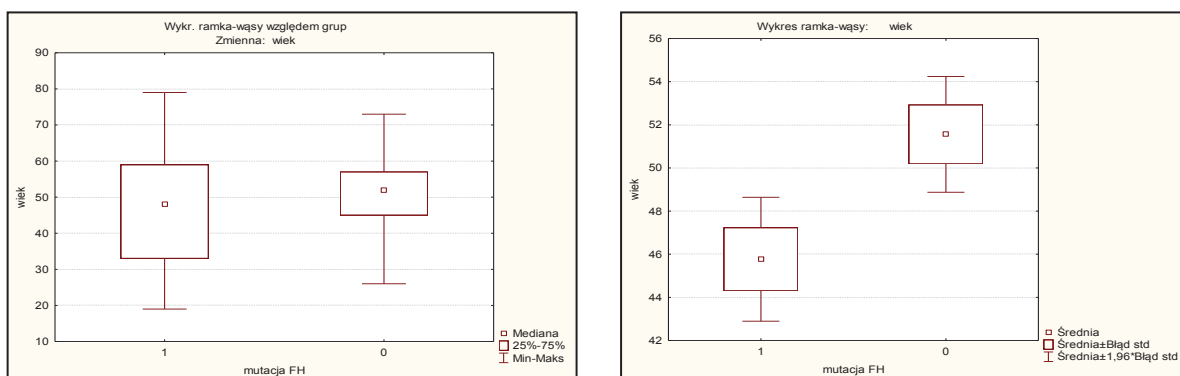
Rys. 2 Wykresy pudełkowe dla mediany (a) i średniej (b) sumy punktów (ilość punktów) kryteriów klinicznych FH z uwzględnieniem obecności lub nie mutacji LDLR i/lub APOB (mutacja FH). Grupa z potwierdzoną mutacją LDLR lub APOB oznaczona jako 1, grupa bez mutacji LDLR i/lub APOB oznaczona jako 0.



Rys. 3 Wykresy pudełkowe dla mediany (a) i średniej (b) stężenia LDL-C (LDL) z uwzględnieniem obecności lub nie mutacji LDLR i/lub APOB (mutacja FH). Grupa z potwierdzoną mutacją LDLR i/lub APOB oznaczona jako 1, grupa bez mutacji LDLR i/lub APOB oznaczona jako 0.



Rys. 4 Wykresy pudełkowe dla mediany (a) i średniej (b) stężenia cholesterolu całkowitego w mg/dl (CH) z uwzględnieniem obecności lub nie mutacji LDLR i/lub APOB (mutacja FH). Grupa z potwierdzoną mutacją LDLR lub APOB oznaczona jako 1, grupa bez mutacji LDLR i/lub APOB oznaczona jako 0.



Rys. 5 Wykresy pudełkowe dla mediany (a) i średniej (b) wieku (w latach) z uwzględnieniem obecności lub nie mutacji LDLR i/lub APOB (mutacja FH). Grupa z potwierdzoną mutacją LDLR i/lub APOB oznaczona jako- 1, grupa bez mutacji LDLR i/lub APOB oznaczona jako 0.

Analiza statystyczna testem U Manna-Whitney'a wykazała, że stężenia LDL-cholesterolu, cholesterolu całkowitego oraz wiek i suma punktów kryteriów klinicznych FH różniły się statystycznie pomiędzy pacjentami z obecną lub nie mutacją LDLR i/lub APOB. Pacjenci z potwierdzoną molekularnie FH mieli istotnie statystycznie wyższe poziomy LDL cholesterolu, cholesterolu całkowitego, byli młodsi oraz uzyskali wyższą liczbę punktów z kryteriów klinicznych FH (Tab. 13, Rys. 2-5).

W grupach pacjentów z obecną lub nieobecną mutacją LDLR i/lub APOB nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w stężeniach HDL-cholesterolu oraz trójglicerydów (Tab. 13).

4.3.2 Analiza pacjentów z obecnością lub nie mutacji LDLR i/lub APOB zależnie od rozpoznania FH na podstawie kryteriów klinicznych

Wykonano analizę statystyczną testem istotności Chi-kwadrat w trzech grupach pacjentów: z klinicznym rozpoznaniem FH określonym jako: pewne (>8 pkt), prawdopodobne (6-8 pkt) i możliwe (3-5 pkt).

Tab. 14 Częstość występowania mutacji LDLR i/lub APOB w podgrupie pacjentów z rozpoznaniem klinicznym FH możliwym (3-5 pkt). Wyniki przedstawiono jako liczbę pacjentów oraz procentowo.

Liczba punktów	mutacja LDLR i/lub APOB		
	nie	tak	razem
Pkt >5	26	75	101
	25,7%	74,3%	
Pkt 3-5	26	24	50
	52,0%	48,0%	
Ogół	52	99	151

Potwierdzono testem Chi-kwadrat Pearsona istotność statystyczną zależności między tymi cechami ($p < 0,002$).

Tab. 15 Częstość występowania mutacji LDLR i/lub APOB w podgrupie pacjentów z rozpoznaniem klinicznym FH pewnym (powyżej 8 pkt). Wyniki przedstawiono jako liczbę pacjentów oraz procentowo.

Liczba punktów	mutacja LDLR i/lub APOB		
	nie	tak	razem
pkt \leq8	49	64	113
	43,4%	56,6%	
pkt >8	3	35	38
	7,9%	92,1%	
ogół	52	99	151

Potwierdzono dokładnym testem Fishera istotność statystyczną zależności między tymi cechami ($p < 0,001$).

Mutację *LDLR* i/lub *APOB* stwierdzono w grupie pacjentów z rozpoznaniem możliwym (3-5 pkt) u 48%, z rozpoznaniem prawdopodobnym u 63,5%, a przy rozpoznaniu pewnym (>8 pkt) u 92,1% (Tab. 14 i 15). Analizę różnic częstości potwierdzono testem Chi-kwadrat Pearsona lub dokładnym testem Fishera, znajdując istotną statystycznie zależność.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić zgodnie z oczekiwaniem, że najwyższą częstość potwierdzenia molekularnego FH w badanej grupie polskich pacjentów uzyskano przy sumie ponad ośmiu punktów kryteriów klinicznych FH.

4.3.3 Rozkład częstości obecności mutacji *LDLR* i/lub *APOB* zależnie od wybranych cech klinicznych

Wykonano analizę statystyczną testem istotności Chi-kwadrat celem oceny częstości potwierdzenia mutacji *LDLR* i/lub *APOB* u pacjentów z przedwczesną chorobą wieńcową, wywiadem rodzinnym hipercholesterolemii oraz wywiadem rodzinnym w kierunku przedwczesnej choroby układu sercowo-naczyniowego.

Tab. 16 Częstość obecności mutacji *LDLR* i/lub *APOB* u pacjentów z wywiadem rodzinnym hipercholesterolemii. Wyniki przedstawiono jako liczbę pacjentów oraz procentowo.

Wywiad rodzinny hipercholesterolemii	Mutacja <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i>		
	nie	tak	razem
ujemny	39	19	58
	67,2%	32,8%	
dodatni	13	80	93
	14,0%	86,0%	
ogół	52	99	151

Potwierdzono testem Chi-kwadrat Pearsona istotność statystyczną zależności między tymi cechami ($p < 0,001$).

Tab. 17 Częstość obecności mutacji *LDLR* i/lub *APOB* u pacjentów z klinicznym rozpoznaniem *FH* i przedwczesną chorobą wieńcową. Wyniki przedstawiono jako liczbę pacjentów oraz procentowo.

Przedwczesna choroba wieńcowa	mutacja <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i>		
	nie	tak	razem
nie	28	60	88
	31,8%	68,2%	
tak	24	39	63
	38,1%	61,9%	
ogół	52	99	151

Testem Chi-kwadrat Pearsona nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności między badanymi parametrami ($p=0,423$).

U pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku hipercholesterolemii u 86% potwierdzono obecność mutacji *LDLR* i/lub *APOB*. Natomiast w grupie pacjentów z ujemnym wywiadem mutacja *LDLR* i/lub *APOB* występowała u 32,8% ($p<0,001$) (Tab. 16).

U pacjentów z przedwczesną chorobą wieńcową u 61,9% potwierdzono obecność mutacji *LDLR* i/lub *APOB*, natomiast u pacjentów bez pCAD mutacja *LDLR* i/lub *APOB* występowała u 68,2% (NS) (Tab. 17).

Tab. 18 Częstość obecności mutacji *LDLR* i/lub *APOB* u pacjentów z klinicznym rozpoznaniem *FH* i dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku choroby układu sercowo-naczyniowego. Wyniki przedstawiono jako liczbę pacjentów oraz procentowo.

Wywiad rodzinny CVD	mutacja <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i>		
	brak	obecna	razem
nie	21	49	70
	30,0%	70,0%	
tak	31	50	81
	38,3%	61,7%	
ogół	52	99	151

Testem Chi-kwadrat Pearsona nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności ($p=0,286$).

U pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku CVD u 61,7% potwierdzono obecność mutacji *LDLR* i/lub *APOB*. Natomiast w grupie pacjentów z ujemnym wywiadem mutacja *LDLR* i/lub *APOB* występowała u 70 % (NS) (Tab.18).

4.3.4 Charakterystyka pacjentów poniżej 40 r.ż. zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB*

Wykonano analizę statystyczną testem istotności Chi-kwadrat u pacjentów poniżej 40 r.ż. z obecnością lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB*

Tab. 19 Częstość potwierdzenia lub nie mutacji LDLR i/lub APOB u pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH zależnie od wieku. Wyniki przedstawiono jako liczbę pacjentów oraz procentowo.

Pacjenci z kliniczną FH <40 r.ż.	mutacja <i>LDLR</i> i/lub <i>APOB</i>		
	nie	tak	razem
≥40 r.ż.	48	62	110
	43,6%	56,4%	
<40 r.ż.	4	37	41
	9,8%	90,2%	
Ogół	52	99	151

Potwierdzono dokładnym testem Fishera istotną statystycznie zależność między tymi cechami ($p < 0,001$).

Tab. 20 Częstość dodatniego wywiadu rodzinnego hipercholesterolemii u pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH zależnie od wieku. Wyniki przedstawiono jako liczbę pacjentów oraz procentowo.

Pacjenci z kliniczną FH	Wywiad rodzinny hipercholesterolemii		
	nie	tak	razem
≥40 r.ż.	52	58	110
	47,3%	52,7%	
<40 r.ż.	6	35	41
	14,6%	85,4%	
ogół	58	93	151

Potwierdzono dokładnym testem Fishera istotną statystycznie zależność między tymi cechami ($p < 0,001$).

Tab. 21 Częstość dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku chorób układu sercowo-naczyniowego u pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH zależnie od wieku. Wyniki przedstawiono jako liczbę pacjentów oraz procentowo.

Pacjenci z kliniczną FH	Wywiad rodzinny CVD		
	nie	tak	razem
≥40 r.ż.	49	61	110
	44,5%	55,5%	
<40 r.ż.	21	20	41
	51,2%	48,8%	
Ogół	70	81	151

Potwierdzono testem Chi-kwadrat Pearsona, nie stwierdzając istotnej statystycznie zależności ($p = 0,464$).

Tab. 22 Częstość choroby wieńcowej u pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH zależnie od wieku. Wyniki przedstawiono jako liczbę pacjentów oraz procentowo.

Pacjenci z kliniczną FH zależnie od wieku	CAD		
	nie	tak	razem
≥40 r.ż.	49	61	110
	44,5%	55,5%	
<40 r.ż.	39	2	41
	95,1%	4,9%	
Ogół	88	63	151

Potwierdzono dokładnym testem Fishera istotną statystycznie zależność między tymi cechami ($p < 0,001$).

Analiza statystyczna testem Chi-kwadrat wykazała, że w badanej grupie z klinicznym rozpoznaniem FH poniżej 40 r.ż. uzyskano potwierdzenie molekularne FH aż u 90,2% chorych (n=37). W grupie pacjentów ≥ 40 r.ż. potwierdzono obecność mutacji *LDLR* i/lub *APOB* u 56,4% chorych ($p < 0,001$, Tab. 19).

Wywiad rodzinny w kierunku hipercholesterolemii był dodatni istotnie częściej u pacjentów poniżej 40 r.ż. (85,4% vs 52,7%; $p < 0,001$; Tab. 20). Stwierdzono także, że choroba wieńcowa występuje istotnie częściej u pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH ≥ 40 r.ż. (55,5% vs 4,9%; $p < 0,001$) (Tab. 22). Natomiast nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości występowania dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku chorób układu sercowo-naczyniowego w grupach poniżej i ≥ 40 r.ż. (Tab. 21).

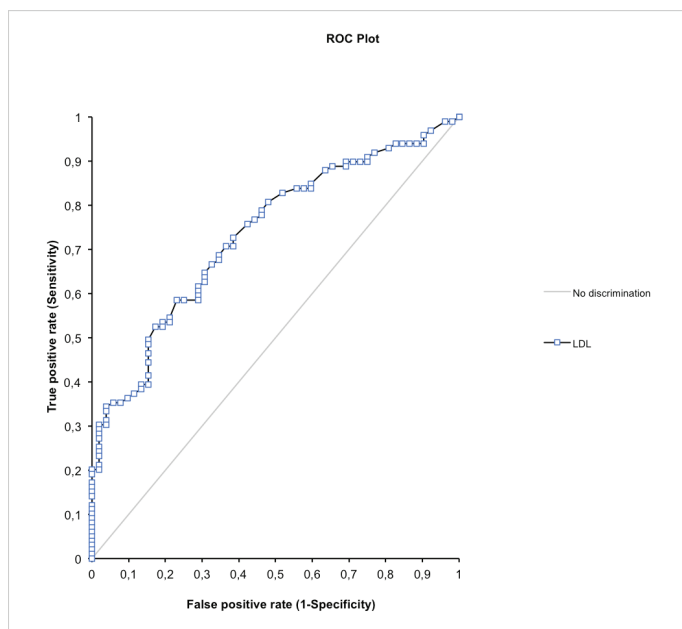
4.4 Wartości diagnostyczne obecności mutacji *LDLR* i/lub *APOB* w badanej grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH

4.4.1 Krzywa ROC wyznaczona dla stężenia LDL-cholesterolu zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/ lub *APOB*

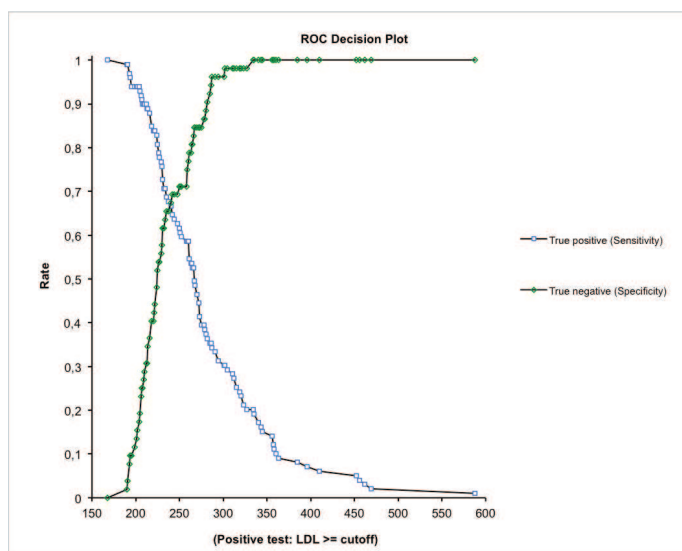
W kolejnym etapie wykonano obliczenia celem ewaluacji wartości diagnostycznych kryteriów klinicznych FH przy pomocy krzywej ROC (ang. *Receiver Operating Characteristic*). Wykonano analizę trzema metodami, aby wyznaczyć punkt odcięcia stężenia LDL-C jako najlepszą wartość diagnostyczną potwierdzenia obecności mutacji *LDLR* i/lub *APOB* u pacjentów z fenotypem HeFH. Metody te dały różne wyniki.

- Metodą optymalizacji wyników fałszywie dodatnich wykazano próg odcięcia stężenia LDL-C 225 mg/dl (czułość 81%, specyficzność 51%).
- Punkt przecięcia krzywych czułości i swoistości, w którym wartość czułości i swoistości jest jednocześnie największa wykazał próg odcięcia stężenia LDL-C 231 mg/dl (czułość 73%, specyficzność 61%) (Rys. 7)
- Metodą wyznaczania odpowiedniego punktu na krzywej ROC wykazano punkt odcięcia stężenia LDL-C 240 mg/dl (czułość 67%, specyficzność 67%) (Rys.6)

Uznano stężenie LDL-C 225 mg/dl za najlepszą wartość diagnostyczną w grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH, z czułością 81% i specyficzną 51% potwierdzenia mutacji *LDLR* i/lub *APOB*.



Rys. 6 Krzywa ROC wykreślona dla stężenia LDL-cholesterolu (LDL) zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB*.



Rys.7 Wykres przecięcia krzywych czułości i swoistości wykreślony dla stężenia LDL cholesterolu (LDL) zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB*.

Dla analizy ROC przeprowadzonej dla stężenia LDL-cholesterolu zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB* wartość AUC wynosiła 0,73; przedział ufności (CI) 0,65-0,82; błąd standardowy (SE) 0,041; $p < 0,001$.

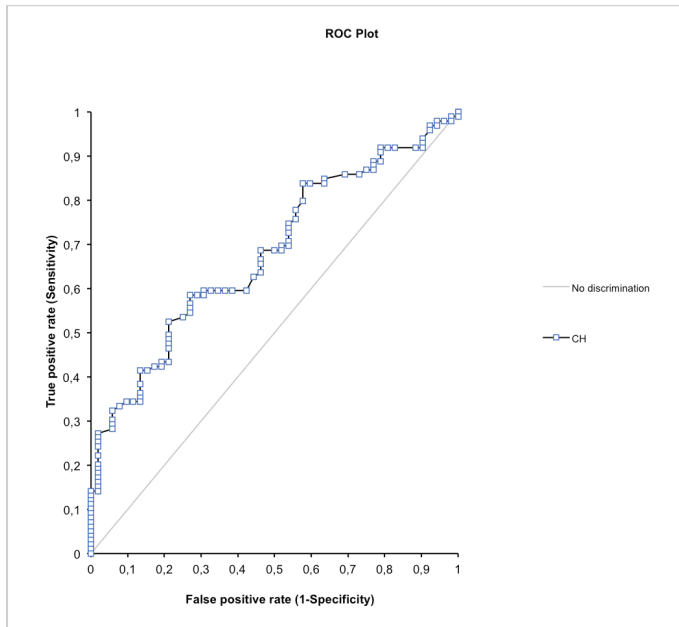
4.4.2 Krzywa ROC wyznaczona dla stężenia cholesterolu całkowitego zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB*

Wykonano analizę dwiema metodami, aby wyznaczyć punkt odcięcia stężenia cholesterolu całkowitego jako najlepszą wartość diagnostyczną potwierdzenia obecności mutacji *LDLR* i/lub *APOB* u pacjentów z fenotypem HeFH.

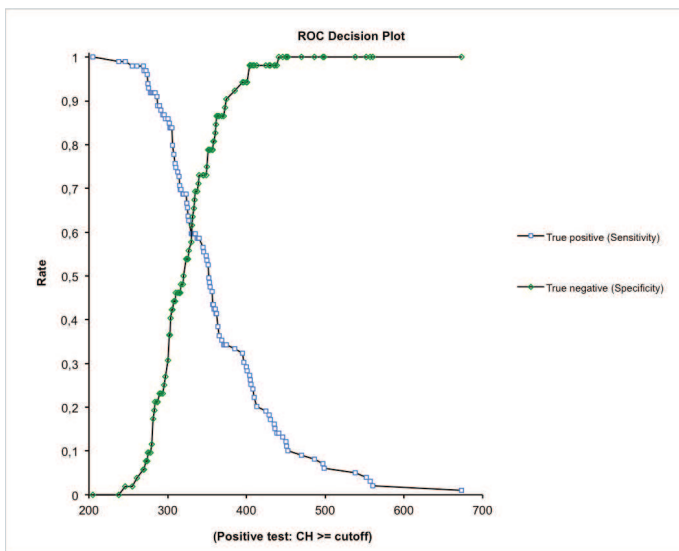
- Metodą optymalizacji wyników fałszywych stwierdzono punkt odcięcia stężenia cholesterolu całkowitego 305 mg/dl (czułość 84%, specyficzność 42%).
- Wykres przecięcia krzywych czułości i swoistości wykazał punkt odcięcia Ch-C 331 mg/dl (czułość 60%, specyficzność 61%) (Rys 9).

Nie wykonano analizy metodą wyznaczania optymalnego punktu odcięcia na krzywej ROC ze względu na przebieg krzywej (Rys. 8).

Poszukując wartości cholesterolu całkowitego z maksymalną czułością i minimum 50% swoistością uznano stężenie Ch-C 320 mg/dl za najlepszą wartość diagnostyczną molekularnego potwierdzenia FH w grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH (czułość 69 %, specyficzność 50%).



Rys. 8 Krzywa ROC wykreślona dla stężenia cholesterolu całkowitego (CH) zależnie od obecności lub nie mutacji LDLR i/lub APOB.



Rys. 9 Wykres przecięcia krzywych czułości i swoistości wykreślony dla stężenia cholesterolu całkowitego zależnie od obecności lub nie mutacji LDLR i/lub APOB.

W analizie krzywej ROC w badanej grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH przeprowadzonej dla cholesterolu całkowitego zależnie od obecności lub nie mutacji LDLR i/lub APOB wartość AUC wynosiła 0,68; przedział ufności (CI) 0,60-0,77; błąd standardowy (SE) 0,044; $p < 0,001$.

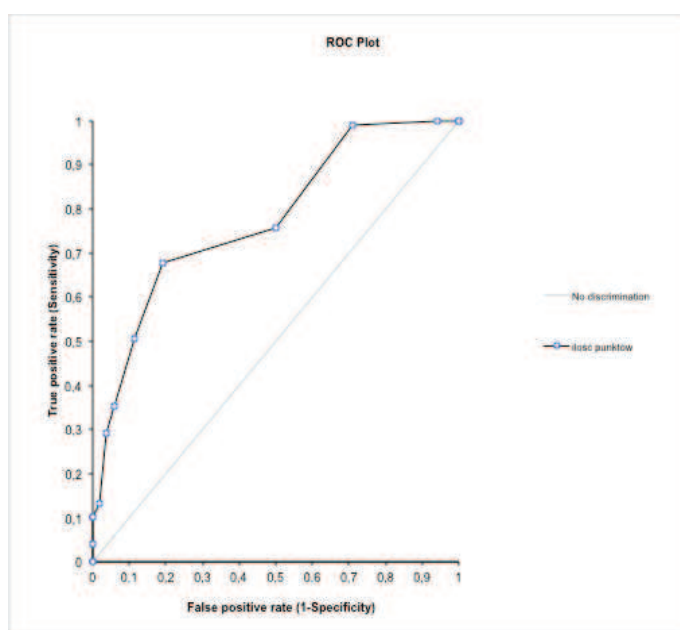
4.4.3 Krzywa ROC wyznaczona dla sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB*

Metodą optymalizacji wyników fałszywych wyznaczono punkt odcięcia sumy 5 punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH z czułością 99% i swoistością 29% potwierdzenia obecności mutacji *LDLR* i/lub *APOB*.

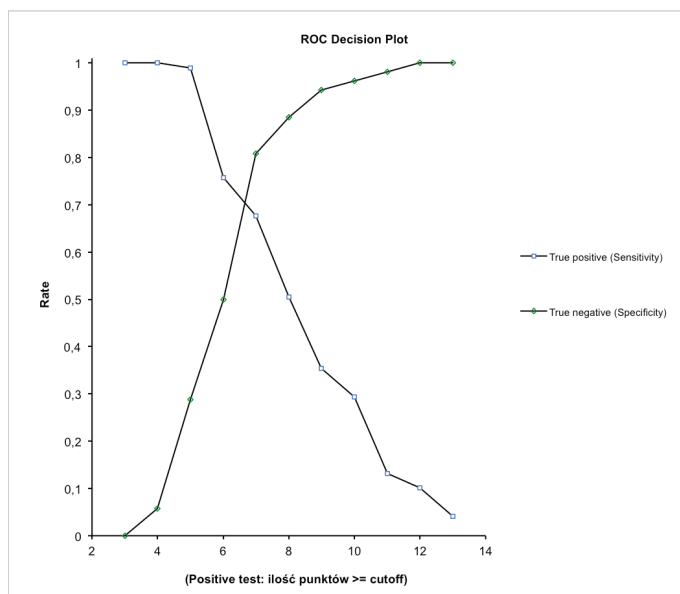
Analiza krzywej czułości i swoistości wykazała, że punkt przecięcia przechodzi pomiędzy sumą 6 a 7 punktów kryteriów klinicznych FH (Rys. 11).

Nie wykonano analizy metodą wyznaczania optymalnego punktu odcięcia na krzywej ROC ze względu na przebieg krzywej (Rys. 10).

Poszukując sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH z maksymalną czułością i minimum 50% swoistością wyznaczono sumę 6 punktów jako najlepszą wartość diagnostyczną w grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH, z czułością 76% i swoistością 50% potwierdzenia mutacji *LDLR* i/lub *APOB*.



Rys. 10 Krzywa ROC wykreślona dla sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH (ilość punktów) vs obecność mutacji *LDLR* i/lub *APOB*



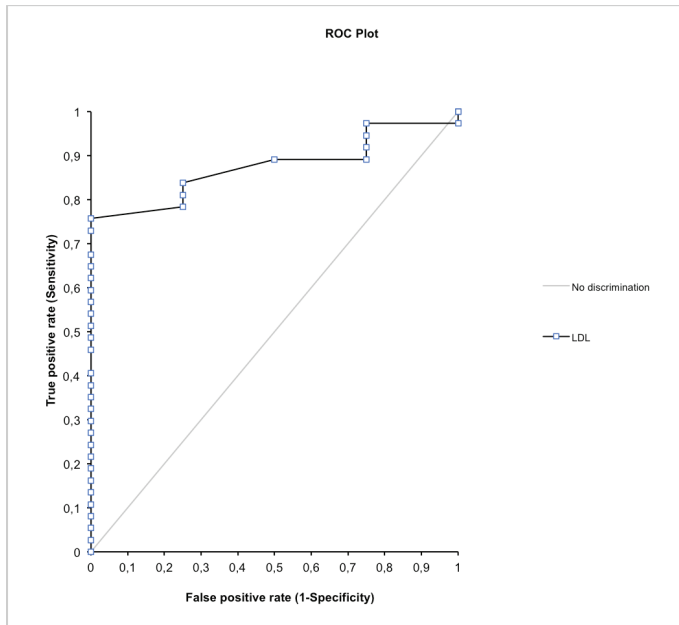
Rys. 11 Wykres przecięcia krzywych czułości i swoistości wykreślony dla sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH (ilość punktów) vs obecność mutacji *LDLR* i/lub *APOB*

W analizie krzywej ROC w badanej grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH przeprowadzonej dla sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB* wartość AUC wynosiła 0,78; przedział ufności (CI) 0,70-0,85; błąd standardowy (SE) 0,038; $p < 0,001$.

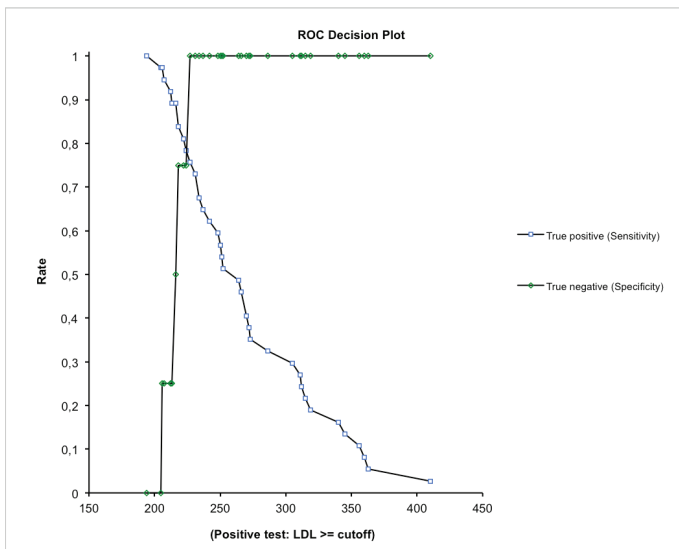
4.4.4 Krzywa ROC wyznaczona dla stężenia LDL cholesterolu zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB* w grupie pacjentów poniżej 40 r.ż.

W kolejnym etapie analiz wyznaczono wartości diagnostyczne obecności mutacji *LDLR* i/lub *APOB* w badanej grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH poniżej 40 r.ż. i ≥ 40 r.ż. Odstąpiono od analizy krzywej ROC ze względu na jej przebieg (Rys. 12).

Poszukując wartości LDL-cholesterolu z maksymalną czułością i minimum 50% swoistością wyznaczono stężenie 216 mg/dl za najlepszą wartość diagnostyczną w grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH poniżej 40 r.ż., z czułością 89% i specyficznością 50% molekularnego potwierdzenia FH.



Rys. 12 Krzywa ROC wykreślona dla stężenia LDL cholesterolu (LDL) zależnie od obecności mutacji LDLR i/lub APOB u pacjentów z FH poniżej 40 r.ż.



Rys. 13 Wykres przecięcia krzywych czułości i swoistości wykreślony dla stężenia LDL-cholesterolu (LDL) vs obecność mutacji LDLR i/lub APOB u pacjentów z FH poniżej 40 r.ż.

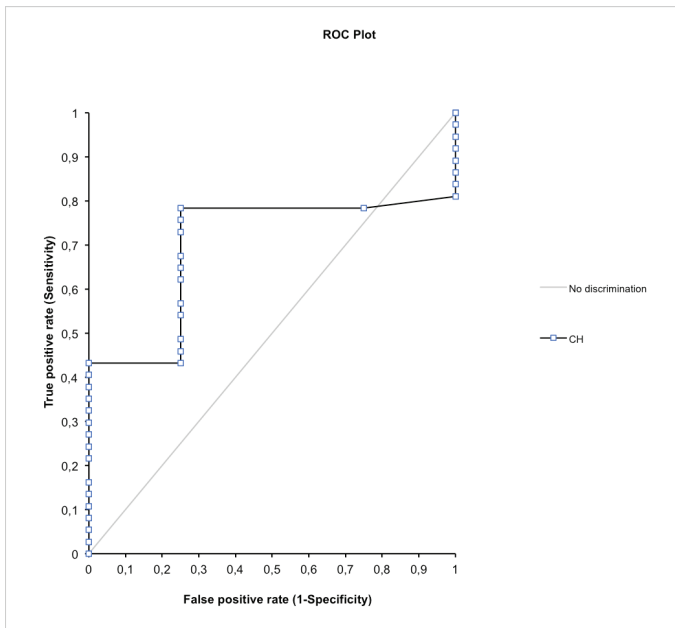
W analizie krzywej ROC w badanej grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH poniżej 40 r.ż. przeprowadzonej dla LDL-C zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB*, wartość AUC wynosiła 0,88; przedział ufności (CI) 0,76-0,99; błąd standardowy (SE) 0,06; $p < 0,001$.

4.4.5 Krzywa ROC wyznaczona dla stężenia cholesterolu całkowitego zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB* w grupie pacjentów poniżej 40 r.ż.

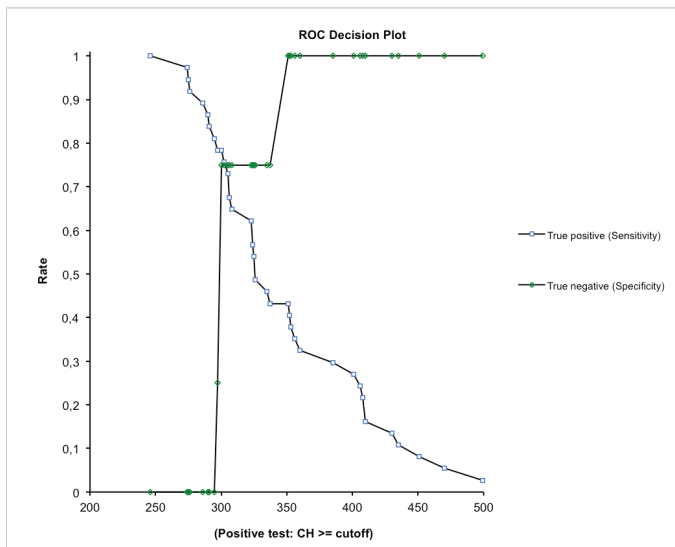
Analiza przeprowadzona metodą optymalizacji wyników fałszywych wykazała punkt odcięcia cholesterolu całkowitego 246 mg/dl z czułością 100% i specyficznością 0% potwierdzenia mutacji *LDLR* i/lub *APOB*.

Odstąpiono od analizy krzywej ROC dla cholesterolu całkowitego, ponieważ jej przebieg był nietypowy i niejasny diagnostycznie (Rys.14)

Analiza wykresu przecięcia krzywych czułości i swoistości wykazała próg odcięcia stężenia Ch-C 300 mg/dl za najlepszą wartość diagnostyczną molekularnego potwierdzenia FH w grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH poniżej 40 r.ż. (czułość 78%, specyficzność 75%) (Rys.15). Nie znaleziono innych wartości diagnostycznych Ch-C ze swoistością niższą od 75% i większą od 50%.



Rys. 14 Krzywa ROC wykreślona dla stężenia cholesterolu całkowitego (CH) zależnie od obecności mutacji LDLR i/lub APOB u pacjentów z FH poniżej 40 r.ż.



Rys. 15 Wykres przecięcia krzywych czułości i swoistości wykreślony dla stężenia cholesterolu całkowitego vs obecność mutacji LDLR i/lub APOB u pacjentów z FH poniżej 40 r.ż.

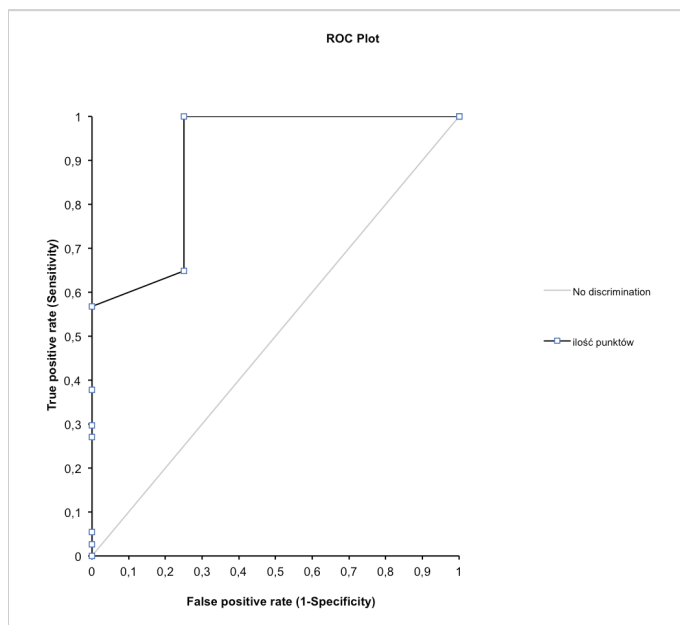
W analizie krzywej ROC w badanej grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH poniżej 40 r.ż. przeprowadzonej dla Ch-C zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB*, wartość AUC wynosiła 0,70; przedział ufności (CI) 0,49-0,91; błąd standardowy (SE) 0,109; $p < 0,001$.

4.4.6 Krzywa ROC wyznaczona dla sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB* w grupie pacjentów poniżej 40 r.ż.

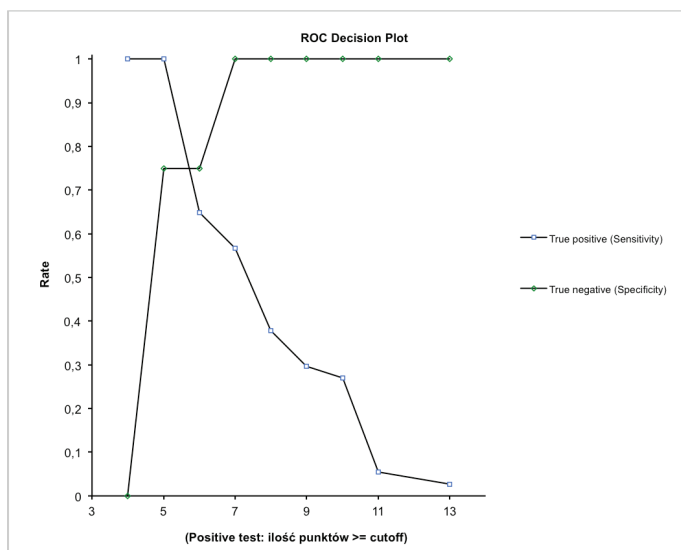
Analiza przeprowadzoną metodą optymalizacji wyników fałszywych wykazała najlepszą wartość diagnostyczną sumy 5 punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH w grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH <40 r.ż., z czułością 100% i swoistością 75%.

Odstąpiono od analizy krzywej ROC ze względu na nietypowy przebieg (Rys. 16).

Wykres przecięcia czułości i swoistości lokalizował punkt odcięcia pomiędzy sumą 5 a 6 punktów (Rys. 17).



Rys. 16 Krzywa ROC wykreślona dla liczby punktów kryteriów FH (ilość punktów) zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* lub *APOB* u pacjentów z FH <40 r.ż.



Rys. 17 Wykres przecięcia krzywych czułości i swoistości wykreślony dla sumy punktów kryteriów klinicznych (ilość punktów) vs obecność mutacji *LDLR* i/lub *APOB* u pacjentów z FH poniżej 40 r.ż.

W analizie krzywej ROC w badanej grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH poniżej 40 r.ż. przeprowadzonej dla sumy punktów kryteriów klinicznych FH zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB*, wartość AUC wynosiła 0,90; przedział ufności (CI) 0,71-1,0 ; błąd standardowy (SE) 0,1; $p < 0,001$.

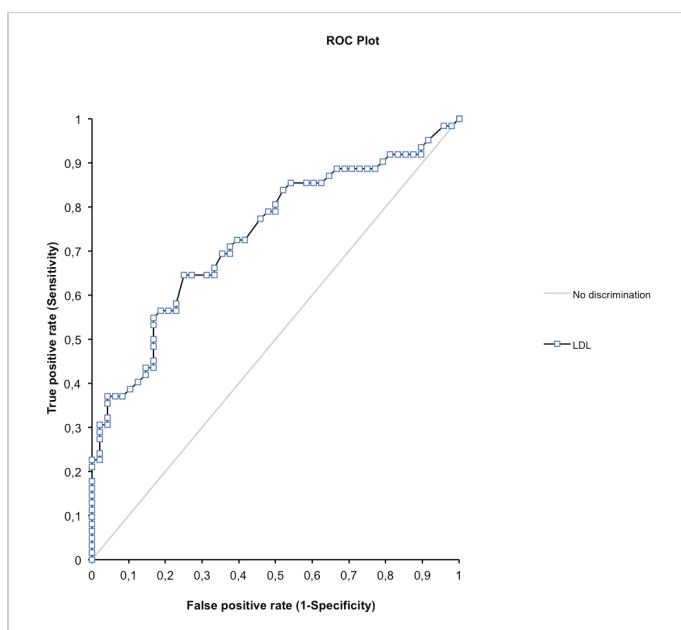
4.4.7 Krzywa ROC wyznaczona dla stężenia LDL cholesterolu zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB* w grupie pacjentów ≥ 40 r.ż.

Wykonano analizę trzema metodami, aby wyznaczyć punkt odcięcia stężenia LDL-C jako predyktora potwierdzenia obecności mutacji u pacjentów z fenotypem HeFH w wieku ≥ 40 lat.

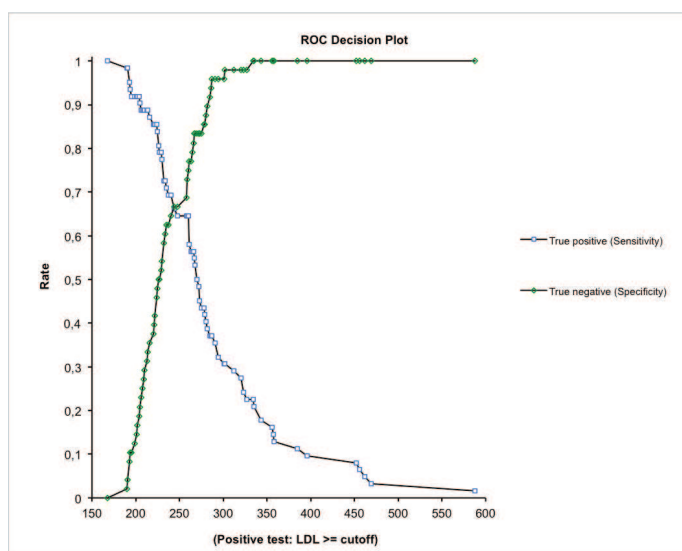
Analiza przeprowadzona metodą optymalizacji wyników fałszywych wyznaczyła punkt odcięcia LDL-C 225 mg/dl z czułością 84% i specyficznością 48%.

- Z wykresu przecięcia czułości i swoistości wyznaczono punkt odcięcia LDL-C 244 mg/dl z czułością 66% i specyficznością 66% (Rys. 19)
- Analizą krzywej ROC wykreślonej dla stężenia LDL-C vs obecność mutacji w grupie pacjentów ≥ 40 r.ż. wyznaczono punkt odcięcia 260 mg/dl z czułością 64% i specyficznością 75% (Rys. 20)

Poszukując wartości LDL-cholesterolu z maksymalną czułością i minimum 50% swoistością wyznaczono stężenie 226 mg/dl jako najlepszą wartość diagnostyczną molekularnego potwierdzenia FH w grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH ≥ 40 r.ż. (czułość 80 %, specyficzność 50%).



Rys. 18 Krzywa ROC wykreślona dla LDL-cholesterolu (LDL) zależnie od obecności lub nie mutacji LDLR i/lub APOB u pacjentów z FH ≥ 40 r.ż.



Rys. 19 Wykres przecięcia krzywych czułości i swoistości wykreślony dla LDL-cholesterolu (LDL) zależnie od obecności lub nie mutacji LDLR i/lub APOB u pacjentów z FH ≥ 40 r.ż.

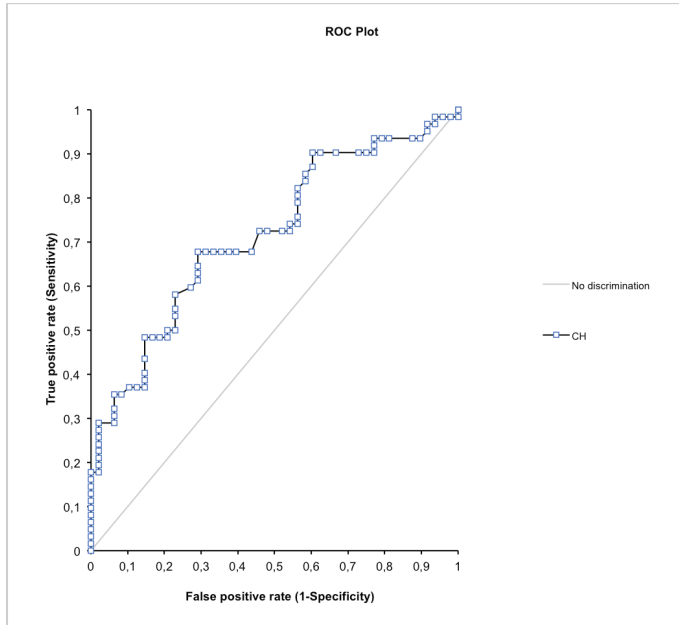
W analizie krzywej ROC w badanej grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH ≥ 40 r.ż. przeprowadzonej dla LDL-C zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB*, wartość AUC wynosiła 0,70; przedział ufności (CI) 0,64-0,83; błąd standardowy (SE) 0,047; $p < 0,001$.

4.4.8 Krzywa ROC wyznaczona dla stężenia cholesterolu całkowitego zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB* w grupie pacjentów ≥ 40 r.ż.

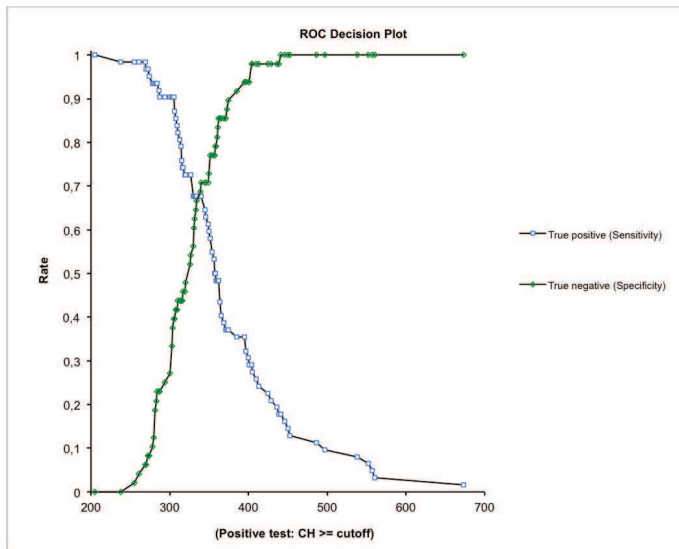
Analiza metodą optymalizacji wyników fałszywych wykazała punkt odcięcia cholesterolu całkowitego 305 mg/dl z czułością 90% i specyficznością 40%.

Z wykresu przecięcia czułości i swoistości wyznaczono punkt odcięcia Ch-C 244 mg/dl z czułością 66% i specyficznością 66% (Rys. 21). Nie analizowano krzywej ROC ze względu na jej przebieg (Rys. 20)

Poszukując wartości cholesterolu całkowitego z maksymalną czułością i minimum 50% swoistością wyznaczono stężenie 326 mg/dl jako najlepszą wartość diagnostyczną molekularnego potwierdzenia FH w grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH ≥ 40 r.ż. (czułość 73%, specyficzność 52%).



Rys.20 Krzywa ROC wykreślona dla cholesterolu całkowitego (CH) zależnie od obecności lub nie mutacji LDLR i/lub APOB u pacjentów z FH ≥ 40 r.ż.



Rys. 21 Wykres przecięcia krzywych czułości i swoistości wykreślony dla cholesterolu całkowitego (CH) zależnie od obecności lub nie mutacji LDLR i/lub APOB u pacjentów z FH ≥ 40 r.ż.

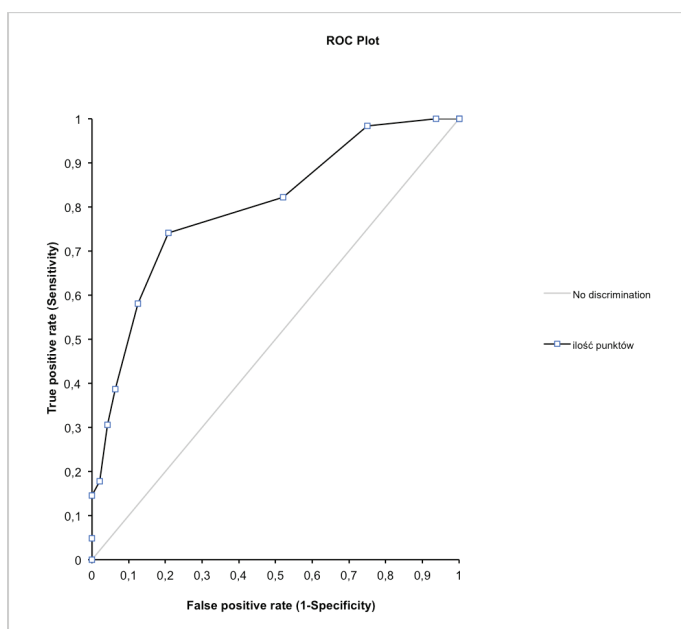
W analizie krzywej ROC w badanej grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH ≥ 40 r.ż. przeprowadzonej dla cholesterolu całkowitego zależnie od obecności lub nie

mutacji *LDLR* lub *APOB*, wartość AUC wynosiła 0,72; przedział ufności (CI) 0,62-0,81; błąd standardowy (SE) 0,049; $p < 0,001$.

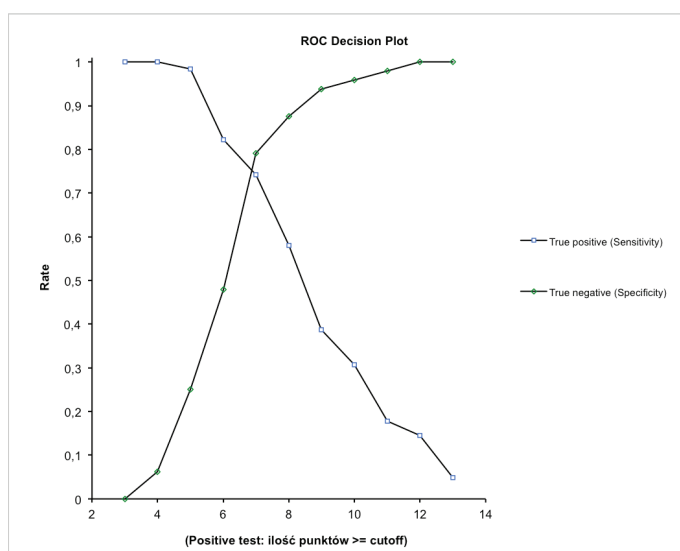
4.4.9 Krzywa ROC dla sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB* w grupie pacjentów ≥ 40 r.ż.

Analiza dwoma metodami: optymalizacji wyników fałszywych oraz wykresu przecięcia czułości i swoistości wyznaczyły sumę 7 punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH z czułością 74% i swoistością 79% (Rys. 23).

Poszukując wartości sumy punktów z maksymalną czułością i minimum 50% swoistością odnaleziono wartość najbliższą tym kryteriom: 6 punktów z czułością 82%, specyficzną 48%. Uznano sumę 6 punktów za najlepszą wartość diagnostyczną molekularnego potwierdzenia FH w grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH ≥ 40 r.ż.



Rys. 22 Krzywa ROC wykreślona dla sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH (ilość punktów) zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB* u pacjentów z FH ≥ 40 r.ż.



Rys. 23 Wykres przecięcia krzywych czułości i swoistości wykreślony dla sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH (ilość punktów) zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB* u pacjentów z FH ≥ 40 r.ż.

W analizie krzywej ROC w badanej grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH ≥ 40 r.ż. przeprowadzonej dla sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH zależnie od obecności lub nie mutacji *LDLR* i/lub *APOB*, wartość AUC wynosiła 0,80; przedział ufności (CI) 0,72-0,88 ; błąd standardowy (SE) 0,041; $p < 0,001$.

5. Dyskusja

Choroby układu krążenia pozostają najczęstszą przyczyną zgonów w Europie. Dane Eurostat za lata 2000-2010 wskazują, że najczęstszymi przyczynami zgonu była choroba wieńcowa oraz choroby naczyniowe mózgu. Najwyższe współczynniki umieralności na chorobę wieńcową, łącznie dla mężczyzn i kobiet, odnotowano w bałtyckich krajach członkowskich, Słowacji i na Węgrzech (powyżej 200 zgonów na 100 000 osób) [*eurostat.ec.europa.eu*].

Do najistotniejszych czynników ryzyka powodujących choroby sercowo-naczyniowe na podłożu miażdżycy należy hipercholesterolemia [7 145]. Pewnego dowodu na znaczenie cholesterolu w patogenezie miażdżycy dostarczył w 1913 roku eksperyment wykonany przez Aniczkowa. Dodając żółtka jaj do paszy królików, uzyskał w ścianach ich naczyń typowe zmiany miażdżycowe. Identyfikacja cholesterolu jako istotnej przyczyny wczesnego rozwoju miażdżycy tętnic wieńcowych i powstającego na jej podłożu zawału serca stała się możliwa dzięki dwóm dużym badaniom epidemiologicznym tj. Badaniu Framingham (Framingham Study) oraz Badaniu Siedmiu Krajów (Seven Country Study) [145].

Pomimo rosnącej świadomości społecznej oraz dostępności leczenia statynami podwyższony poziom cholesterolu nadal należy do najczęstszych i niedostatecznie kontrolowanych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego. W badaniu NATPOL 2011 hipercholesterolemię potwierdzono u 61% mężczyzn i kobiet w wieku od 18 do 79 lat. Jednak tylko 32% mężczyzn i 38% kobiet jest świadomych obecności tej choroby. Niepokojące są także wyniki analizy w zakresie skuteczności leczenia hypolipemizującego. Tylko u 7% mężczyzn i 8% kobiet obserwowano redukcję stężenia Ch-C poniżej 190 mg/dl w wyniku zastosowanej terapii [145].

W diagnostyce różnicowej hipercholesterolemii powinno się wykluczyć wtórne przyczyny. Dopiero wtedy należy rozważać hipercholesterolemię uwarunkowaną genetycznie. Jedną z lepiej poznanych chorób, w której wysokie stężenie cholesterolu powoduje przyspieszony proces miażdżycowy jest hipercholesterolemia rodzinna dziedziczona autosomalnie dominująco. W nieleczonej heterozygotycznej FH prawie połowa mężczyzn i kobiet nie osiąga odpowiednio 60 i 70 roku życia [50 62 65]. Niestety u zdecydowanej większości osób FH jest nierozpoznana i nieleczona

[62]. W diagnostyce hipercholesterolemii rodzinnej przydatne są kryteria kliniczne, rekomendowane przez Forum Ekspertów Lipidowych. Wytyczne ESC/EAS wskazują na znaczenie diagnostyki molekularnej w kierunku mutacji genów *LDLR*, *APOB* lub *PCSK9*, jeśli w systemie służby zdrowia danego kraju dostępne są środki finansowe [7].

5.1 Charakterystyka kliniczna i biochemiczna pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną

W niniejszej pracy poddano analizie 151 dorosłych pacjentów z klinicznym rozpoznaniem hipercholesterolemii rodzinnej, zgodnie z kryteriami zalecanymi przez Forum Ekspertów Lipidowych. Rozpoznanie kliniczne, określone jako możliwe, prawdopodobne i pewne, weryfikowano badaniem molekularnym genu *LDLR* i/lub *APOB*. Ograniczeniem tego badania był brak możliwości wykonania analizy genu *PCSK9*. Mutacje genu *PCSK9* są jednak relatywnie rzadkie, dotyczą około 2% przypadków FH. Należy zauważyć, że pomimo uznania diagnostyki molekularnej FH na świecie za złoty standard, w Polsce jest ona aktualnie finansowana jedynie z grantów naukowych, a jej koszty są stosunkowo wysokie. Jest to jednak metoda efektywna kosztowo, przy założeniu prowadzenia dalszej diagnostyki kaskadowej rodzin obciążonych FH i możliwości wykrycia choroby u bezobjawowych krewnych.

Średni wiek pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH w materiale własnym wynosił 48 lat (± 13). Zdecydowana większość chorych (73%) przekroczyła 40 r.ż. Prawdopodobnie taki rozkład wieku wynika z metody rekrutacji pacjentów - do badania włączono tylko probantów, czyli pierwsze osoby w rodzinie z rozpoznaniem klinicznym FH, często w przebiegu objawowej CAD. Najpewniej objęcie badaniem także członków rodziny, szczególnie dzieci probantów, znacznie obniżyłoby wiek badanej grupy.

W obrazie klinicznym hipercholesterolemii rodzinnej heterozygotycznej dominuje 2-3-krotne podwyższenie stężenia cholesterolu całkowitego i LDL-cholesterolu przy prawidłowych stężeniach trójglicerydów i HDL-cholesterolu oraz przedwczesna miażdżycza. W materiale własnym pacjenci z rozpoznaną klinicznie FH charakteryzowali się przed leczeniem hipolipemizującym wysokim średnim stężeniem cholesterolu całkowitego (350 ± 69 mg/dl) i LDL-cholesterolu (263 ± 65 mg/dl), natomiast stężenie HDL-

cholesterolu i trójglicerydów wynosiły odpowiednio 57 ± 15 i 147 ± 67 mg/dl. Podobne wyniki Bujo i wsp. uzyskali w grupie 641 japońskich pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH (średni wiek 51 lat): średnie stężenie LDL-C przed leczeniem wynosiło 248 ± 67 mg/dl, a cholesterolu całkowitego 338 ± 63 mg/dl [54].

W materiale własnym pacjenci z potwierdzoną molekularnie FH byli młodszy i mieli znamienne wyższe poziomy LDL cholesterolu w porównaniu do pacjentów bez potwierdzonej mutacji (46 ± 15 lat vs 52 ± 10 lat; 280 ± 71 mg/dl vs 232 ± 33 mg/dl). Analiza badań Mabuchi i wsp. pacjentów z potwierdzoną mutacją *LDLR* wykazała niższe średnie stężenie LDL-C (261 mg/dl). Można wytłumaczyć to tym, że populacja japońska była młodsza od badanej grupy polskiej o 4 lata (średni wiek 42 vs 46 lat) i miała prawdopodobnie zdrowsze nawyki żywieniowe [158]. W grupie Finów z regionu Północnej Karelii z molekularnie potwierdzoną FH obserwowano wyższe stężenia LDL-C niż w materiale własnym. Przykładowo u mężczyzn w wieku 31-40 lat średnia wartość LDL-C wynosiła 327 mg/dl, a u kobiet 297 mg/dl [146]. Tak wysokie stężenia LDL-C wytłumaczyć można występowaniem w Północnej Karelii efektu założyciela. Większość przypadków HeFH w Finlandii jest związana z mutacją FH-NK. Jest to delecja w eksonie 6 powodująca fenotyp FH receptorowo-negatywny, z bardzo wysokimi stężeniami LDL-C, obecnością żółtaków i przedwczesną chorobą wieńcową w młodym wieku.

W badanej przez mnie grupie przedwczesna choroba wieńcowa została rozpoznana u 42% pacjentów, a dodatni wywiad rodzinny w kierunku przedwczesnej choroby wieńcowej stwierdzono u 54% chorych. Warto zauważyć, że większość pacjentów zgłosiła się przed wystąpieniem objawowej choroby układu sercowo-naczyniowego, ale po ujawnieniu się w rodzinie schorzeń układu sercowo-naczyniowego.

Wyniki własne sugerują, że dodatni wywiad rodzinny w kierunku hipercholesterolemii może mieć większą wartość diagnostyczną dla rozpoznania FH niż obecność u pacjenta lub w rodzinie przedwczesnej choroby układu sercowo-naczyniowego. Obecność mutacji *LDLR* i/lub *APOB* w grupie z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku hipercholesterolemii potwierdzano u 86%, natomiast w grupie pacjentów z ujemnym wywiadem rodzinnym hipercholesterolemii była ona obecna u 33%.

Takie wyniki nie są zaskoczeniem. Istnieje wiele różnych czynników ryzyka przedwczesnej choroby układu sercowo-naczyniowego, a genetycznie uwarunkowana hipercholesterolemia jest tylko jednym z nich. Yagi i wsp. zidentyfikowali jako czynnik

ryzyka sercowo-naczyniowego w FH niskie stężenie HDL-C i cukrzycę [147]. Jensen i wsp. badając grupę 2400 pacjentów z HeFH w Holandii, wskazali, że stężenie lipoproteiny (a) powyżej 30 mg/dl zwiększa 1,5-krotnie ryzyko incydentu wieńcowego [148]. W materiale własnym nie oznaczano lipoproteiny (a) uznawanej obecnie za niezależny czynnik ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. Holmes i wsp. dowiedli, że wzrost stężenia lipoproteiny (a) powyżej 56 mg/dl w HeFH zwiększa ryzyko CAD 2,5-krotnie [151]. Dodatkowo Harada-Shiba i wsp. wskazała na następujące czynniki ryzyka CAD w hipercholesterolemii rodzinnej: wiek powyżej 30 r.ż. u mężczyzn i powyżej 45 r.ż. u kobiet, poziom LDL-C powyżej 260 mg/dl przed rozpoczęciem leczenia, zespół metaboliczny i zgrubienie ścięgna piętowego powyżej 15 mm [43 60].

5.2 Charakterystyka molekularna pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną

Podłoże molekularne hipercholesterolemii rodzinnej oraz częstość występowania poszczególnych mutacji może się różnić w rozmaitych regionach świata. Zidentyfikowano populacje z efektem założyciela, przykładowo we wspomnianej Północnej Karelii mutacja FH-NK stanowi 85% chorych z HeFH [146]. Hobbs i wsp. wykazali, że u Francuzów w Quebecu delecja promotora i eksonu 1 genu *LDLR* odpowiada za 63% przypadków HeFH [40 41].

Jednak w większości populacji na świecie podłoże molekularne FH jest heterogenne. Chmara i wsp. wykryła mutacje *LDLR* i/lub *APOB* u 51% polskich pacjentów z klinicznym rozpoznaniem hipercholesterolemii rodzinnej. Większość stanowiły mutacje punktowe, najczęstsza p.G592E odpowiadała za 10% przypadków HeFH. W badaniu Chmary i wsp. mutacje *APOB* stanowiły 6,6% badanego materiału [144].

W analizowanym materiale własnym mutacje potwierdzające hipercholesterolemię rodzinną (genu *LDLR* i/lub *APOB*) zostały wykryte nieco częściej (66%), większość stanowiły mutacje *LDLR* (59%). Mutacje genu *APOB* potwierdzono u 8% pacjentów. Wyniki własne potwierdzają, że populacja polska jest heterogenna, co skłania do zastosowania w diagnostyce molekularnej FH sekwencjonowania bezpośredniego i MLPA. Dodatkową korzyścią zastosowanej na materiale własnym metodyki badania molekularnego jest możliwość detekcji mutacji intronowych. Nicholls i wsp. dzięki uwzględnieniu mutacji intronowych uzyskali w grupie pacjentów z klinicznie pewnym

rozpoznaniem FH zwiększenie liczby wykrytych mutacji *LDLR* i/lub *APOB* z 79% do 90% [152]. Podobną liczbę potwierdzeń molekularnych (92%) uzyskano w materiale własnym, w grupie z rozpoznaniem klinicznym FH pewnym według skali punktowej. Pozostałe 8% pacjentów, u których nie stwierdzono mutacji *LDLR* lub *APOB*, może być obciążonych hipercholesterolemią wielogenową lub innymi mutacjami genów związanych z zaburzeniami lipidowymi, także genów nieanalizowanych w badanym materiale własnym. Warto przypomnieć w tym miejscu, że aktualnie znanych jest ponad 1700 mutacji genu *LDLR*, podczas gdy we wcześniejszych latach było ich około 1000 [46 47 53]. Prawdopodobnie następne lata przyniosą kolejne odkrycia, co pozwoli zwiększyć częstość detekcji mutacji potwierdzających FH. Szczegółowa analiza mutacji obecnych wśród pacjentów w materiale własnym będzie przedmiotem dalszych badań i publikacji.

Futema i wsp. uzyskali inne wyniki badając mieszkańców Wielkiej Brytanii. Częstość potwierdzenia mutacji przy rozpoznaniu pewnym wynosiła 54% [53]. Natomiast analiza wyników Bourbon i wsp. wykazała, że w badanej grupie dorosłych portugalskich pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH mutacja genu *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* występowała u 60,2% osób (62 z badanych 103 osób) [153]. Różnica ta może wynikać z zastosowanej metodologii badania molekularnego i klinicznego. W grupie tej do rozpoznania klinicznego użyto przede wszystkim kryteriów *Simon Broome Register*, a w polskiej kryteriów opartych na *Dutch Lipid Clinic Network*.

5.3 Charakterystyka pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną poniżej 40 r.ż.

Znany jest fakt wzrostu zachorowań na CAD wraz z wiekiem oraz późniejszego występowania chorób układu sercowo-naczyniowego u kobiet niż u mężczyzn. Podobnie jest u pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH. W materiale własnym wykazano, że typowa objawowa choroba wieńcowa występuje jedynie u 4,9% pacjentów poniżej 40 r.ż. Ponadto w przypadku młodych pacjentów z FH obciążający wywiad rodzinny w kierunku przedwczesnej CVD u krewnych może być jeszcze ujemny, szczególnie gdy pacjent odziedziczył mutację *LDLR* lub *APOB* po matce. Wyjątkowo starannie należy dążyć do wyjaśnienia obecności hipercholesterolemii w rodzinie u młodych chorych, poprzez zalecenie wykonania lipidogramu u krewnych I i II stopnia.

Należy podkreślić, że u młodych chorych z FH uzyskano szczególnie wysoki odsetek potwierdzenia mutacji *LDLR* i/lub *APOB* (90,2%). Jednocześnie stwierdzono u nich wysoką częstość dodatniego wywiadu rodzinnego hipercholesterolemii (85,4%). Można więc wnioskować, że główną przyczyną zgłoszenia się do poradni młodych chorych (18-39 r.ż.) był wysoki poziom cholesterolu LDL oraz dodatni wywiad rodzinny w kierunku hipercholesterolemii. Te dwa objawy mają dobrą wartość predykcyjną potwierdzenia molekularnego FH u młodych chorych.

Z analizy Rejestru Simon Broome wynika, że u młodych nieleczonych osób z FH występuje 100-krotnie wyższe ryzyko przedwczesnego zgonu sercowo-naczyniowego. Nadumieralność sercowo-naczyniowa w FH zmniejsza się z wiekiem, szczególnie po 60 r.ż [36]. Warto podkreślić, że młodzi pacjenci z FH poniżej 40 r.ż. mogą odnieść największą korzyść z prewencji wdrożonej wcześnie, przed wystąpieniem objawowej miażdżycy. Wczesne i efektywne leczenie oraz aktywne poszukiwanie objawów subklinicznej miażdżycy pozwala zmniejszyć częstość zawałów serca, zabiegów rewaskularyzacji naczyń wieńcowych oraz śmiertelność związaną z przedwczesną chorobą wieńcową i udarem mózgu. Statyny są lekami bezpiecznymi i skutecznymi w FH i można je zastosować już u dzieci w wieku 8-10 lat [52 131 154].

5.4 Predyktory mutacji *LDLR* i/lub *APOB* w populacji polskiej z hipercholesterolemią rodzinną

Hipercholesterolemia rodzinna jest uznana za chorobę, która spełnia warunki Wilsona i Jungnera dla prowadzenia programu przesiewowego [106 155]. Jednak skrining populacyjny FH, nawet w populacjach z efektem założyciela, nie jest efektywny kosztowo. Natomiast dzięki identyfikacji mutacji powodującej FH kaskadowy proces badań przesiewowych w rodzinie staje się łatwiejszy i efektywny kosztowo [108 156].

Wyzwaniem jest identyfikacja probanta z FH w populacji ogólnej i wybór optymalnej metody przesiewowej. Zgodnie z wytycznymi NICE, za populację zwiększonego ryzyka FH uznać można pacjentów z wysokim stężeniem cholesterolu całkowitego powyżej 300 mg/dl i dodatnim wywiadem rodzinnym hipercholesterolemii i/lub przedwczesnej choroby wieńcowej [157].

Idealny test przesiewowy, także w hipercholesterolemii rodzinnej, miałby 100% czułości i 100% swoistości. W praktyce klinicznej często stosuje się kolejno dwa różne testy: pierwszy o dużej czułości (wykrycie potencjalnych przypadków patologii) i drugi o dużej swoistości (potwierdzenie choroby). W badaniach przesiewowych zwiększenie czułości jest jednocześnie związane ze zmniejszeniem odsetka wyników fałszywie ujemnych, ale i też ze zmniejszeniem swoistości i zwiększeniem odsetka wyników fałszywie dodatnich. Zbyt duża czułość i zbyt mała swoistość testu powodują wzrost rozpoznania przypadków fałszywie dodatnich. Odwrotnie: zbyt mała czułość i zbyt duża swoistość powoduje rozpoznanie przypadków fałszywie ujemnych. Dlatego w materiale własnym w analizach za pomocą krzywej ROC za optymalny punkt odcięcia stężenia LDL-C i sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH uznawano wartość o największej czułości i co najmniej 50% swoistości [12 158 159].

Można wyróżnić trzy poziomy diagnostyczne dla pacjentów z podejrzeniem hipercholesterolemii rodzinnej:

- podstawowa opieka zdrowotna
- poradnia zaburzeń lipidowych
- diagnostyka molekularna

W podstawowej opiece zdrowotnej algorytm diagnostyczny FH powinien być prosty i szybki do oceny. Takie warunki spełnia skala punktowa klinicznego rozpoznania FH, którego istotnym elementem jest stężenie LDL-cholesterolu.

Na podstawie wykonanych analiz w materiale własnym można zaproponować optymalny punkt odcięcia potwierdzający mutację *LDLR* i/lub *APOB* dla stężenia LDL-cholesterolu 225 mg/dl, z czułością 81% i specyficznością 51%. Wyższe wartości LDL-C miały mniejszą czułość i wyższą swoistość, co stwarzało niebezpieczeństwo przeoczenia pacjentów z faktyczną FH. Oznaczenie stężenia LDL-C jest relatywnie tanie, proste w interpretacji, a w konsekwencji pozwala skierować pacjenta z podejrzeniem FH do specjalistycznej poradni lipidowej.

W ramach poradni zaburzeń lipidowych lekarz podejmie decyzję, czy jest konieczna analiza DNA w kierunku mutacji *LDLR* i/lub *APOB* u probanta i jego krewnych. Wyniki analizy materiału własnego wskazują, że najlepszą wartość odcięcia sumy punktów kryteriów klinicznych FH kwalifikującą do diagnostyki molekularnej stanowi 6 punktów z czułością 76% i swoistością 50%.

Przy stosowaniu skali punktowej kryteriów klinicznych FH konieczne jest poszukiwanie u pacjenta żółtaków ścięgien, przedwczesnego rąbka rogówkowego oraz objawów przedwczesnej choroby układu sercowo-naczyniowego. Konieczne jest dokładne zebranie wywiadu rodzinnego w kierunku hipercholesterolemii oraz przedwczesnej choroby wieńcowej. Zgodnie z wytycznymi ESC/EAS, lipidogram pacjenta powinien zostać wykonany dwukrotnie, najlepiej po 12 godzinach przebywania na czczo. Należy podkreślić, że wykrywanie żółtaków i rąbka rogówkowego przed 45 r.ż. w badaniu przedmiotowym, jak również ocena wywiadu rodzinnego w tym kierunku mogą być trudne. Warto rozważyć wprowadzenie techniki obrazowania umożliwiającej obiektywną detekcję żółtaków ścięgien, przykładowo badanie rentgenowskie ścięgna Achillesa. Stwierdzenie grubości ścięgna Achillesa powyżej 9 mm zostało określone przez Harada-Shiba i wsp. jako dobry parametr diagnostyczny [43 60 160]. Należy też pamiętać o wykluczeniu przyczyn hipercholesterolemii wtórnej, w szczególności niedoczynności tarczycy i działania niepożądanego stosowanych leków.

Na podstawie kryteriów klinicznych lekarz określi prawdopodobieństwo FH jako pewne (>8 pkt), prawdopodobne (6-8 pkt) oraz możliwe (3-5 pkt) i zakwalifikuje lub nie chorego do diagnostyki molekularnej w kierunku mutacji genu *LDLR* i/lub *APOB*. Jeśli pozwalają na to możliwości techniczne i finansowe dodatkowo warto zastosować analizę genu *PCSK9*.

W skryningu pacjentów z FH warto uwzględnić wiek. W opracowaniu Austin i wsp. zwracają uwagę, że czułość i swoistość progowych wartości diagnostycznych dla FH można poprawić, stosując podział na wiek [34]. Należy pamiętać, że objawowa choroba układu sercowo-naczyniowego na tle miażdżycy oraz żółtaki ścięgien pojawiają się u osoby z HeFH w późniejszym wieku, mają więc ograniczone zastosowanie w skryningu osób młodych, np. poniżej 40 r.ż. Ponadto czułość i specyficzność kryteriów FH zależą od badanej populacji, regionu świata, zamożności populacji oraz wieku pacjentów.

W badanym materiale własnym optymalne wartości diagnostyczne LDL-C i sumy punktów z kryteriów klinicznych FH są niższe dla młodych chorych poniżej 40 r.ż, niż dla chorych ≥ 40 r.ż. W grupie pacjentów poniżej 40 r.ż. z klinicznym rozpoznaniem FH można zaproponować przydatne wartości diagnostyczne potwierdzenia mutacji *LDLR* i/lub *APOB*: stężenie LDL-cholesterolu 216 mg/dl oraz sumę 5 punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH. W analizowanej grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH

≥40 r.ż. optymalne punkty odcięcia wynosiły dla LDL-C 226 mg/dl i 6 dla sumy punktów kryteriów klinicznych FH. Wyższe wartości LDL-C u starszych pacjentów można tłumaczyć faktem, że wraz z wiekiem zwiększa się stężenie LDL-cholesterolu.

W ocenie własnej zaproponowane wartości odcięcia mają wystarczającą swoistość i optymalną czułość dla kwalifikacji chorych do diagnostyki molekularnej. Zarówno stężenie LDL-cholesterolu, jak i oszacowanie sumy punktów kryteriów klinicznych FH nie wymaga dużych nakładów finansowych, jest proste w użyciu i bezpieczne dla pacjenta. Kosztem jest tu jedynie praca lekarza i oznaczenie stężenia LDL-C. Ostateczne potwierdzenie FH, czyli badanie molekularne, wymaga jedynie pobrania 5 ml krwi. W przypadku diagnostyki molekularnej probanta jest to badanie dość kosztowne, ale wykonuje się je raz w życiu.

Warto zwrócić uwagę, że zaproponowane wartości diagnostyczne (LDL-C i suma punktów kryteriów klinicznych) potwierdzenia molekularnego FH dotyczyły grupy pacjentów, u których nie stwierdzono w badaniu przedmiotowym obecności żółtaków ściegien i rąbka rogówkowego w badaniu przedmiotowym, jak i wywiadzie rodzinnym. Ponadto zaproponowano je, badając populację osób z klinicznym rozpoznaniem FH, które zgłosiły się do lekarza z powodu wysokich stężeń LDL-cholesterolu. Zaproponowane punkty odcięcia, szczególnie stężenie LDL-C, mogą być mniej czułe i swoiste w diagnostyce probanta w populacji ogólnej ze względu na duży odsetek hipercholesterolemii wtórnych [162].

5.5 Propozycja nowego algorytmu diagnostycznego hipercholesterolemii rodzinnej dla pacjentów poniżej 40 r.ż. w populacji polskiej

Wydaje się konieczne wdrożenie zmodyfikowanego algorytmu rozpoznawania FH dostosowanego do populacji polskiej, aby poprawić rokowanie u młodych chorych wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego z FH. W Polsce, w sytuacji ograniczonych możliwości finansowania może istnieć tendencja, aby do diagnostyki molekularnej w kierunku mutacji genu *LDLR* i *APOB* kwalifikować chorych z rozpoznaniem klinicznym FH pewnym lub prawdopodobnym.

Materiał własny wskazuje na konieczność modyfikacji nowych kryteriów klinicznych hipercholesterolemii rodzinnej dla młodych chorych poniżej 40 r.ż. w populacji polskiej.

Przed wszystkim można zaproponować obniżenie dolnego progu stosowanych aktualnie zakresów rozpoznania prawdopodobnego z 6-8 na 5-8 punktów. Dla uzyskania większej pewności co do słuszności tego postulatu wskazane jest kontynuowanie badań w ramach obecnie trwającego projektu Krajowe Centrum Diagnostyki i Leczenia Hipercholesterolemii Rodzinnej.

Dodatkowo należy zwrócić uwagę, że w erze szerokiego stosowania statyn w hipercholesterolemii, wiek wystąpienia objawowej CAD jest wyższy średnio o 7 lat, w porównaniu z okresem sprzed ich powszechnego stosowania [43]. Może to wpływać na czułość kryteriów opartych na *Dutch Lipid Clinic Network*.

5.6 Model wielospecjalistycznej opieki nad chorymi z FH

Nie ulega wątpliwości, że problem pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną jest w Polsce niedoceniony. Świadomość genetycznie uwarunkowanej hipercholesterolemii jest niska zarówno wśród lekarzy, jak i pacjentów. Brakuje także rozwiązań finansowanych ze środków publicznych.

Krajowe Centrum Diagnostyki i Leczenia Hipercholesterolemii Rodzinnej w Gdańsku powstało w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka dzięki 100% dofinansowaniu ze środków unijnych. Projekt ten zakłada szeroko prowadzoną edukację lekarzy i pacjentów w zakresie diagnostyki i leczenia hipercholesterolemii rodzinnej poprzez szkolenia, *e-learning*, stronę internetową www.hipercholesterolemia.com.pl. Cyfryzacja danych pacjentów z FH w bazie Pass Clinical z funkcją rysowania drzew rodowodowych pozwala na sprawne prowadzenie diagnostyki kaskadowej w rodzinach.

Zaplanowano także wykonanie diagnostyki molekularnej mutacji genu *LDLR* i *APOB* u 1000 osób z klinicznym rozpoznaniem FH (500 probantów i 500 krewnych) oraz genu *PCSK9* u 100 chorych z negatywnym wynikiem badania molekularnego. Wyniki dotychczasowych badań wskazują na heterogenność wykrywanych mutacji *LDLR* w populacji polskiej, co potwierdza konieczność stosowania kompleksowej analizy DNA, zarówno metodą sekwencjonowania, jak i techniką MLPA [144 163].

Zgodnie z założeniami projektu powstała Poradnia Hipercholesterolemii Rodzinnej, stanowiąca model wielospecjalistycznej opieki nad chorymi z FH. Opiekę nad chorymi

z FH prowadzi zespół złożony z kardiologa, genetyka, pediatry, pielęgniarki, dietetyka i psychologa. W ramach tej poradni prowadzi się edukację pacjentów, zaleca niezbędną modyfikację dodatkowych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, potwierdza rozpoznanie FH analizą DNA i wdraża diagnostykę kaskadową. Szybki dostęp do specjalistycznych badań pozwala wykryć obecność istotnej choroby układu sercowo-naczyniowego przed wystąpieniem objawów klinicznych.

Zgodnie z wytycznymi, u chorych z FH bez objawów klinicznych przedwczesnej miażdżycy zaleca się: elektrokardiograficzną próbę wysiłkową co 3-5 lat, badanie wskaźnika kostka-ramię co rok, USG tętnic szyjnych i wielorzędową tomografię komputerową z oceną wskaźnik Calcium Score co 3 lata u kobiet powyżej 50 lat i mężczyzn powyżej 40 lat [10].

Intensywna farmakoterapia wdrożona przed wystąpieniem objawów miażdżycy pozwala osiągnąć oczekiwaną dla całej populacji długość życia wśród osób obciążonych HeFH [68]. Pomimo jednak stosowania maksymalnie tolerowanej terapii hypolipemizującej, nadal pozostaje grupa pacjentów z HoFH i ciężką HeFH, którzy nie osiągają celu leczenia. Dla tych pacjentów ostatnią linią leczenia jest LDL-afereza. Opierając się na założeniu, że około 1:20 000 osób spełnia kryteria ciężkiej, odpornej na farmakoterapię FH, można szacować, że w Polsce jest około 1900 chorych kwalifikujących się do aferezy [164]. Obecnie jest tylko jeden ośrodek specjalizujący się w kompleksowym leczeniu hipercholesterolemii rodzinnej, prowadzący zabiegi LDL-aferezy dla dorosłych (w Gdańsku).

W wielu krajach prowadzone są programy dla chorych z hipercholesterolemią rodzinną. Najbardziej znane narodowe rejestry to: MEDPED w Stanach Zjednoczonych Ameryki, StOEH (*Stichting Opsporing Erfelijke Hypercholesterolemie*) w Holandii, HEART-UK (*The Nation's Cholesterol Charity*) w Anglii, *Fundacion Colesterol Familiar* w Hiszpanii [165]. W Holandii udało się dzięki rejestrowi StOEH, finansowanemu ze środków publicznych, rozpoznać FH u 75% potencjalnych pacjentów [50].

Warto podkreślić, że w polskiej opiece zdrowotnej nie istnieją nawet specjalistyczne poradnie lipidowe na wzór „*Lipid Clinic*” w większości krajów Europy Zachodniej. Znacząco utrudnia to dostęp osób z FH do diagnostyki i leczenia [119]. Systemowym rozwiązaniem opieki nad chorymi z FH byłoby utworzenie krajowej sieci poradni zaburzeń lipidowych oraz poprawienie współpracy lekarzy podstawowej opieki zdrowotnej oraz

specjalistów. Powinno się to wiązać w populacji polskiej z refundacją ze środków publicznych zarówno badania molekularnego w kierunku mutacji *LDLR* i/lub *APOB* (optymalnie także *PCSK9*), jak i leczenia farmakologicznego statynami. Wydaje się, że uzasadnionym postulatem jest wprowadzenie bezpłatnego leczenia farmakologicznego u pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Na podstawie wykonanych badań i przeprowadzonych analiz w grupie 151 chorych z klinicznym rozpoznaniem hipercholesterolemii rodzinnej wykazano:

- a. Istotny statystycznie związek sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH z potwierdzeniem obecności mutacji *LDLR* i/lub *APOB*
- b. Istotny statystycznie związek wieku z potwierdzeniem obecności mutacji *LDLR* i/lub *APOB*
- c. Istotny statystycznie związek stężenia LDL-cholesterolu, cholesterolu całkowitego z potwierdzeniem obecności mutacji *LDLR* i/lub *APOB*
- d. Istotny statystycznie związek obecności dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku hipercholesterolemii z potwierdzeniem obecności mutacji *LDLR* i/lub *APOB*.

2. Na podstawie uzyskanych wyników można zaproponować dla polskich pacjentów optymalne punkty odcięcia stężenia LDL-cholesterolu i sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH, jako wartości referencyjnych, z dużym prawdopodobieństwem potwierdzających obecność mutacji *LDLR* i/lub *APOB*.

- a. Dla pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH poniżej 40 r.ż.
 - stężenie LDL-C ≥ 216 mg/dl
 - suma 5 punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH
- b. Dla pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH ≥ 40 r.ż.
 - stężenie LDL-C ≥ 226 mg/dl
 - suma 6 punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH

3. Zmodyfikowane kryteria kliniczne rozpoznania hipercholesterolemii rodzinnej, zawarte w stanowisku Forum Ekspertów Lipidowych, są przydatne do kwalifikacji chorych do diagnostyki molekularnej w kierunku mutacji genu dla *LDLR* i/lub *APOB*, szczególnie w grupie pacjentów poniżej 40 r.ż.

7. STRESZCZENIE

Wstęp

Hipercholesterolemia rodzinna jest dziedzicznym autosomalnie dominującym schorzeniem, powodującym podwyższone stężenie LDL-cholesterolu w osoczu oraz złogi tkankowe cholesterolu i przedwczesną chorobę wieńcową. Młodzi pacjenci z heterozygotyczną postacią FH w wieku 20 do 39 lat mają 100-krotnie wyższe ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych względem zdrowych osób w tym samym wieku.

U podłoża choroby leży mutacja jednego z trzech genów: genu LDL-receptora, apolipoproteiny B lub genu *PCSK9*. Ze względu na sposób dziedziczenia wyróżnia się dwie postaci choroby: heterozygotyczną i homozygotyczną (HoFH). Szacuje się, że problem heterozygotycznej FH dotyczy około 1:300 do 1:500, a homozygotycznej 1:1 000 000 osób. W rozpoznawaniu choroby przydatne są kryteria kliniczne (*MEDPED*, *Simon Broome Register* lub *Dutch Lipid Clinic Network*), jednak ostateczną i uznaną metodą diagnostyki FH jest analiza molekularna.

Większość chorych z FH w Polsce pozostaje dotychczas nierozpoznana, a co za tym idzie – nieleczona. Dzięki wczesnej identyfikacji pacjentów z FH możliwa jest efektywna prewencja przedwczesnej miażdżycy i nagłego zgonu sercowego.

Cel pracy

Celem prowadzonych badań jest ocena zgodności klinicznego rozpoznania hipercholesterolemii rodzinnej z wykorzystaniem zmodyfikowanych kryteriów FH, zawartych w stanowisku Forum Ekspertów Lipidowych, z wynikami badań molekularnych, z uwzględnieniem wieku.

Material i metody

Badania zostały przeprowadzone w grupie 151 dorosłych pacjentów Poradni Kardiologicznej przy I Klinice Kardiologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Wszyscy chorzy byli rasy kaukaskiej, mieszkali w regionie pomorskim i zostali zakwalifikowani do badania ze stężeniami LDL-cholesterolu w osoczu powyżej 190 mg/dl i trójglicerydów poniżej 250 mg/dl. Rozpoznanie kliniczne hipercholesterolemii rodzinnej zostało określone zgodnie z kryteriami rekomendowanymi przez Forum Ekspertów Lipidowych jako pewne, prawdopodobne i możliwe. Za młodych chorych z FH

uznano pacjentów poniżej 40 r.ż. Granicę wieku 40 lat ustalono na podstawie dostępnych danych z piśmiennictwa, które wskazują, że śmiertelność w grupie nieleczonych pacjentów z FH pomiędzy 20 a 39 r.ż. jest 100-krotnie wyższa niż w populacji osób zdrowych.

U wszystkich chorych wykonano analizę DNA w kierunku mutacji genu dla *LDLR* i/lub *APOB*. Analizę statystyczną wykonano oprogramowaniem Statsoft.

Wyniki

Pacjenci z rozpozną klinicznie FH, średnio w wieku 48 lat (± 13), charakteryzowali się wysokim średnim stężeniem cholesterolu całkowitego (350 ± 69 mg/dl) i LDL-cholesterolu (263 ± 65 mg/dl). Mutacje potwierdzające hipercholesterolemię rodzinną, *LDLR* i/lub *APOB* zostały wykryte u 66% pacjentów. Mutacje genu *LDLR* wystąpiły u 59%, a mutacje genu *APOB* u 8% pacjentów. 2% pacjentów stanowiło podwójne heterozygoty.

Pacjenci z potwierdzoną molekularnie FH mieli istotnie statystycznie wyższe poziomy LDL-cholesterolu (280 ± 71 vs 232 ± 33 mg/dl), cholesterolu całkowitego (364 ± 76 vs 321 ± 41 mg/dl) oraz byli młodsi (46 ± 15 vs 52 ± 10 lat) względem pacjentów bez obecnej mutacji *LDLR* i/lub *APOB*.

W badanej grupie z klinicznym rozpoznaniem FH poniżej 40 r.ż. istotnie częściej niż u pacjentów ≥ 40 r.ż. uzyskano potwierdzenie molekularne FH (90,2% vs 56,4%).

Zaobserwowano także, że wywiad rodzinny w kierunku hipercholesterolemii był dodatni istotnie częściej u pacjentów poniżej 40 r.ż. (85,4% vs 52,7%).

W grupie pacjentów z rozpoznaniem klinicznym FH pewnym, mutacje *LDLR* i/lub *APOB* znaleziono u 92% osób. Badając chorych z rozpoznaniem klinicznym FH możliwym (3-5 pkt) i prawdopodobnym (6-8 pkt) potwierdzono molekularnie hipercholesterolemię rodzinną odpowiednio u 48% i 63%.

Ponadto na podstawie analizy ROC zaproponowano optymalne punkty odcięcia stężenia LDL-cholesterolu oraz sumy punktów klinicznego rozpoznania FH dla potwierdzenia mutacji *LDLR* i/lub *APOB*, z maksymalną czułością i co najmniej 50% swoistością. Punkty odcięcia dla LDL-C wynosiły 216 mg/dl dla osób z FH poniżej 40 r.ż. i 226 mg/dl dla chorych ≥ 40 r.ż. Podobnie wyznaczono punkty odcięcia dla sumy punktów kryteriów klinicznych rozpoznania FH: 5 dla osób poniżej 40 r.ż. i ≥ 40 r.ż.

Wnioski

Badanie na materiale własnym potwierdziło, że zmodyfikowane kryteria kliniczne hipercholesterolemii rodzinnej w populacji polskiej są przydatne do kwalifikacji chorych do diagnostyki molekularnej w kierunku mutacji genu dla *LDLR* i/lub *APOB*, szczególnie w grupie pacjentów poniżej 40 r.ż. Diagnostyka molekularna, kaskadowe badania przesiewowe oraz efektywna prewencja pierwotna mogą wydłużyć życie pacjentom z FH.

8. ABSTRACT

Introduction

Familial hypercholesterolaemia is an autosomal co-dominant inherited disorder, characterized by elevated plasma LDL-cholesterol concentrations, leading to cholesterol deposits in the tissues and premature coronary artery disease. Young HeFH adults aged 20-39 have significantly 100-fold increase in mortality from coronary heart disease versus the general population.

The clinical phenotype of FH results from mutations in three genes for: LDL-receptor (*LDLR*), Apolipoprotein B (*APOB*) and pro-protein convertase subtilisin/kexin 9 (*PCSK9*). There are both, heterozygous and homozygous form of FH. The prevalence of heterozygous FH is estimated to 1:500 and homozygous to 1:1 000 000 in the general population.

Diagnosis of FH is based on clinical criteria (MEDPED, Simon Broome Register or Dutch Lipid Clinic Network Criteria). Nevertheless, genetic testing is the preferred method of diagnostic method for FH. Generally, FH in Poland is underrecognized and undertreated. Early diagnosis of FH enables prompt treatment and prevention of consequent morbidity and mortality from coronary heart disease.

Objectives

The aim of the study was to evaluate the clinical criteria for familial hypercholesterolaemia, accepted by Polish Lipid Expert Forum, in the general population and depending on age (<40 years and \geq 40 years).

Methods

The study population consisted of 151 adult subjects, that had been referred to our Outpatient Cardiology Clinic. All individuals were Caucasian, lived in Pomeranian district and were qualified to study with clinical diagnosis of FH, untreated elevated LDL-cholesterol concentrations over 190 mg/dl and triglycerides levels below 250 mg/dl. Clinical diagnosis of FH was based on criteria adapted from Dutch Lipid Clinic Network-WHO, recommended by Polish Lipid Expert Forum, classified as possible, probable and definite. Young patients were identified as individuals aged 20-39 years, according to data

indicating the 100-fold increased risk of cardiovascular mortality in this groups vs the general population.

The genetic diagnosis of FH in this study was established through the analysis of two genes, *LDLR* and *APOB*. Data were analyzed with the Statsoft software.

Results

In a cohort of patients with clinical diagnosis of FH mean age was 48 (± 13) yrs., mean total cholesterol level was 350 (± 69) mg/dl and LDL-cholesterol 263 (± 65) mg/dl.

The study identified a genetic defect in 66% of total patients. The *LDLR* gene mutations alone were found in 59% patients. 8% of individuals were found to have *APOB* mutations. Among all patients were found 2% of double heterozygous.

Analyzing the groups with genetically confirmed and nonconfirmed FH I found, that the FH carriers of *LDLR* or *APOB* mutations were significantly younger (46 ± 15 vs 52 ± 10 years of age), showed significantly higher plasma concentrations of LDL-C (280 ± 71 vs 232 ± 33 mg/dl) and TC (364 ± 76 vs 321 ± 41 mg/dl).

Young adults aged 20-39 years were significantly frequently carriers of *LDLR* and *APOB* mutations compared to FH subjects aged ≥ 40 yrs. (90,2% vs 56,4%). Positive family history of hypercholesterolaemia was present in 85,4% patients age under 40 yrs. and 52,7% age ≥ 40 yrs. ($p < 0,05$).

In patients with definite clinical diagnosis of HeFH, *LDLR* and *APOB* mutations were found in 92%. We examined also patients with possible (3-5 points) and probable FH (6-8 points) confirming molecular diagnosis in 48% and 63%, respectively.

Additionally, the cut-off points of LDL-C concentration and the clinical FH criteria score were assessed by the ROC curve, to identify patients with a high probability of carrying an FH-causing mutation. The cut-off values of LDL cholesterol and clinical criteria score to predict molecular diagnosis of FH were searched with the highest sensitivity and with 50% specificity of Receiver Operating Characteristic curves. LDL-cholesterol thresholds for the molecular diagnosis of FH were 216mg/dl and 226 mg/dl for subjects aged under 40 and ≥ 40 years, respectively. The threshold values for modified Dutch Lipid Clinic Network score were 5 and 6 point for individuals aged under 40 and ≥ 40 years, respectively.

Conclusions

The study results confirm usefulness of the modified Dutch Lipid Clinic Network diagnostic criteria for familial hypercholesterolemia in Polish population, especially in FH adults aged 20-39 years. Young patients with FH with 100-fold cardiovascular risk had significantly lower TG levels, positive family history of FH and high rate of *LDLR* and *APOB* detections. The molecular diagnosis with cascade screening and effective primary prevention can simply save their lives.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Bankowski R. Biochemia: podręcznik dla studentów uczelni medycznych. Wrocław: Wydaw. Urban i Partner .
2. Murray R, Rodwell V. Biochemia Harpera: Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1995.
3. Stryer L. Biochemia. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003.
4. Murray R, Rodwell V. Biochemia Harpera: Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2005.
5. Bankowski E. Biochemia: podręcznik dla studentów uczelni medycznych. Wrocław: Wydaw. Urban i Partner, 2005.
6. Cybulska B, Szostak WB, Podolec P, et al. Polish forum for prevention guidelines on dyslipidaemia. *Kardiol Pol* 2008;66(11):1239-42
7. Catapano AL, Reiner Z, De Backer G, et al. 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* 2011;217(1):3-46
8. Reiner Z. New ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias - any controversies behind the consensus? *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011;18(5):724-7
9. Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary: Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J* 2007;28(19):2375-414
10. Civeira F, Hypercholesterolemia IPoMoF. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2004;173(1):55-68
11. Pocovi M, Civeira F, Alonso R, et al. Familial hypercholesterolemia in Spain: case-finding program, clinical and genetic aspects. *Semin Vasc Med* 2004;4(1):67-74
12. Civeira F, Ros E, Jarauta E, et al. Comparison of genetic versus clinical diagnosis in familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2008;102(9):1187-93, 93.
13. Garcia CK, Wilund K, Arca M, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science* 2001;292(5520):1394-8
14. Dequeker J, Muls E, Leenders K. Xanthelasma and lipoma in Leonardo da Vinci's Mona Lisa. *Isr Med Assoc J* 2004;6(8):505-6
15. Ose L. The real code of leonardo da vinci. *Curr Cardiol Rev* 2008;4(1):60-2
16. Khachadurian AK. The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med* 1964;37:402-7
17. Khachadurian AK. The diagnosis and management of hyperlipidemias: a review based on 12 years' experience in Lebanon. *J Med Liban* 1972;25(1):31-54
18. Khachadurian AK. Clinical features, diagnosis and frequency of familial hypercholesterolemia. *Beitr Infusionsther* 1988;23:26-32
19. Brown MS, Goldstein JL. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science* 1974;185(4145):61-3

20. Goldstein JL, Dana SE, Brown MS. Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71(11):4288-92
21. Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. A genetic regulatory defect in cholesterol metabolism. *Am J Med* 1975;58(2):147-50
22. Goldstein JL, Dana SE, Brunschede GY, et al. Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia: evidence for two different mutations affecting functions of low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72(3):1092-6
23. Brown MS, Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: A genetic defect in the low-density lipoprotein receptor. *N Engl J Med* 1976;294(25):1386-90
24. Brown MS, Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: unraveling a genetic receptor disease. *Trans Assoc Am Physicians* 1977;90:91-108
25. Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia: pathogenesis of a receptor disease. *Johns Hopkins Med J* 1978;143(1):8-16
26. Brown MS, Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: model for genetic receptor disease. *Harvey Lect* 1979;73:163-201
27. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor locus and the genetics of familial hypercholesterolemia. *Annu Rev Genet* 1979;13:259-89
28. Soutar AK. Rare genetic causes of autosomal dominant or recessive hypercholesterolaemia. *IUBMB Life* 2010;62(2):125-31
29. Liyanage KE, Burnett JR, Hooper AJ, et al. Familial hypercholesterolemia: epidemiology, Neolithic origins and modern geographic distribution. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011;48(1):1-18
30. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(19):6919-23.
31. Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1990;31(8):1337-49 .
32. Ejarque I, Real JT, Chaves FJ, et al. [Clinical and biochemical characteristics of familial ligand-defective apo B-100 in a South European population]. *Med Clin (Barc)* 2004;123(12):456-9 .
33. Abifadel M, Varret M, Rabès JP, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003;34(2):154-6.
34. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, et al. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. *Am J Epidemiol* 2004;160(5):407-20
35. Huijgen R, Fouchier SW, Denoun M, et al. Plasma levels of PCSK9 and phenotypic variability in familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2012;53(5):979-83
36. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. *BMJ* 1991;303(6807):893-6
37. Craig IH. Make early diagnosis, prevent early death from familial hypercholesterolaemia. The MED-PED FH program. *Med J Aust* 1995;162(9):454-5
38. Sullivan DR, Hamilton-Craig I, van Bockxmeer F, et al. INTERIM guidelines for the diagnosis and management of familial hypercholesterolaemia. *Heart Lung Circ* 2012;21(3):159-62

39. Hopkins PN, Toth PP, Ballantyne CM, et al. Familial hypercholesterolemias: prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol* 2011;5(3 Suppl):S9-17
40. Hobbs HH, Brown MS, Russell DW, et al. Deletion in the gene for the low-density-lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1987;317(12):734-7
41. Moorjani S, Roy M, Gagné C, et al. Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Québec Province. *Arteriosclerosis* 1989;9(2):211-6
42. Fahed AC, Safa RM, Haddad FF, et al. Homozygous familial hypercholesterolemia in Lebanon: a genotype/phenotype correlation. *Mol Genet Metab* 2011;102(2):181-8
43. Harada-Shiba M, Arai H, Oikawa S, et al. Guidelines for the management of familial hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb* 2012;19(12):1043-60
44. Defesche JC, Kastelein JJ. Molecular epidemiology of familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 1998;352(9141):1643-4
45. Bradley J. *Genetyka medyczna*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2009.
46. Leigh SE, Foster AH, Whittall RA, et al. Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. *Ann Hum Genet* 2008;72(Pt 4):485-98
47. Usifo E, Leigh SE, Whittall RA, et al. Low-density lipoprotein receptor gene familial hypercholesterolemia variant database: update and pathological assessment. *Ann Hum Genet* 2012;76(5):387-401
48. Francke U, Brown MS, Goldstein JL. Assignment of the human gene for the low density lipoprotein receptor to chromosome 19: synteny of a receptor, a ligand, and a genetic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(9):2826-30
49. Michael B. *Genetyka medyczna* Urban & Partner, 2013.
50. Hovingh GK, Davidson MH, Kastelein JJ, et al. Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Eur Heart J* 2013;34(13):962-71
51. Akram ON, Bernier A, Petrides F, et al. Beyond LDL cholesterol, a new role for PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(7):1279-81
52. Justo RN. Management of familial hypercholesterolaemia in children and adolescents. *J Paediatr Child Health* 2012;48(2):E53-8
53. Futema M, Whittall RA, Kiley A, et al. Analysis of the frequency and spectrum of mutations recognised to cause familial hypercholesterolaemia in routine clinical practice in a UK specialist hospital lipid clinic. *Atherosclerosis* 2013;229(1):161-8
54. Bujo H, Takahashi K, Saito Y, et al. Clinical features of familial hypercholesterolemia in Japan in a database from 1996-1998 by the research committee of the ministry of health, labour and welfare of Japan. *J Atheroscler Thromb* 2004;11(3):146-51
55. Kubalska J, Chmara M, Limon J, et al. Clinical course of homozygous familial hypercholesterolemia during childhood: report on 4 unrelated patients with homozygous or compound heterozygous mutations in the LDLR gene. *J Appl Genet* 2008;49(1):109-13
56. Walzer S, Travers K, Rieder S, et al. Homozygous familial hypercholesterolemia (HoFH) in Germany: an epidemiological survey. *Clinicoecon Outcomes Res* 2013;5:189-92
57. Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, et al. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet* 2013;132(10):1077-130

58. Graham CA, McClean E, Ward AJM, et al. Mutation screening and genotype : phenotype correlation in familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1999;147(2):309-16
59. Motazacker MM, Pirruccello J, Huijgen R, et al. Advances in genetics show the need for extending screening strategies for autosomal dominant hypercholesterolaemia. *Eur Heart J* 2012;33(11):1360-6
60. Harada-Shiba M, Arai H, Okamura T, et al. Multicenter study to determine the diagnosis criteria of heterozygous familial hypercholesterolemia in Japan. *J Atheroscler Thromb* 2012;19(11):1019-26
61. Harada-Shiba M, Nagumo A. [Familial hypercholesterolemia (FH)]. *Nihon Rinsho* 2007;65 Suppl 7:295-300
62. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus Statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* 2013
63. Real JT, Chaves FJ, Ejarque I, et al. Influence of LDL receptor gene mutations and the R3500Q mutation of the apoB gene on lipoprotein phenotype of familial hypercholesterolemic patients from a South European population. *Eur J Hum Genet* 2003;11(12):959-65
64. Reiner Ž, Catapano AL, De Backer G, et al. [ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias]. *Rev Esp Cardiol* 2011;64(12):1168.e1-68.e60
65. Wierzbicki AS, Humphries SE, Minhas R, et al. Familial hypercholesterolaemia: summary of NICE guidance. *BMJ* 2008;337:a1095
66. Humphries SE, Whittall RA, Hubbart CS, et al. Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK: relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. *J Med Genet* 2006;43(12):943-9
67. Defesche JC, Lansberg PJ, Umans-Eckenhausen MA, et al. Advanced method for the identification of patients with inherited hypercholesterolemia. *Semin Vasc Med* 2004;4(1):59-65
68. Rynkiewicz A, Cybulska B, Banach M, et al. Management of familial heterozygous hypercholesterolemia: Position Paper of the Polish Lipid Expert Forum. *J Clin Lipidol* 2013;7(3):217-21
69. Huijgen R, Vissers MN, Kindt I, et al. Assessment of Carotid Atherosclerosis in Normocholesterolemic Individuals With Proven Mutations in the Low-Density Lipoprotein Receptor or Apolipoprotein B Genes. 2011
70. Węgrzyn A. Hipercholesterolemia rodzinna. Podręcznik polskiego forum profilaktyki T. 2 / pod red Piotra podolca. Krakow: Med. Prakt., 2010.
71. Lewandowski P, Węgrzyn A Diagnostyka i leczenie pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną. *Diagnosis and management of familial hypercholesterolemia: Terapia*, 2009:67-73.
72. Goldberg AC, Hopkins PN, Toth PP, et al. Familial hypercholesterolemia: screening, diagnosis and management of pediatric and adult patients: clinical guidance from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol* 2011;5(3):133-40
73. Versmissen J, Oosterveer DM, Yazdanpanah M, et al. Efficacy of statins in familial hypercholesterolaemia: a long term cohort study. *BMJ* 2008;337:a2423

74. Marais AD, Raal FJ, Stein EA, et al. A dose-titration and comparative study of rosuvastatin and atorvastatin in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2008;197(1):400-6
75. Stein EA, Marais AD, Ducobu J, et al. Comparison of short-term renal effects and efficacy of rosuvastatin 40 mg and simvastatin 80 mg, followed by assessment of long-term renal effects of rosuvastatin 40 mg, in patients with dyslipidemia. *J Clin Lipidol* 2007;1(4):287-99
76. Stein EA, Amerena J, Ballantyne CM, et al. Long-term efficacy and safety of rosuvastatin 40 mg in patients with severe hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2007;100(9):1387-96
77. Stein EA, Strutt K, Southworth H, et al. Comparison of rosuvastatin versus atorvastatin in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2003;92(11):1287-93
78. Jansen AC, van Aalst-Cohen ES, Tanck MW, et al. The contribution of classical risk factors to cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: data in 2400 patients. *J Intern Med* 2004;256(6):482-90
79. Lim GB. Atherosclerosis: Addition of niacin to optimal statin therapy does not affect plaque regression. *Nat Rev Cardiol* 2013;10(10):554
80. Masana L, Cabré A, Plana N. HPS2-THRIVE results: bad for niacin/laropiprant, good for ezetimibe? *Atherosclerosis* 2013;229(2):449-50
81. Teo KK, Goldstein LB, Chaitman BR, et al. Extended-release niacin therapy and risk of ischemic stroke in patients with cardiovascular disease: the Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome with low HDL/High Triglycerides: Impact on Global Health Outcome (AIM-HIGH) trial. *Stroke* 2013;44(10):2688-93
82. Huijgen R, Abbink EJ, Bruckert E, et al. Colesevelam added to combination therapy with a statin and ezetimibe in patients with familial hypercholesterolemia: a 12-week, multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. *Clin Ther* 2010;32(4):615-25
83. Hamilton-Craig I, Kostner K, Colquhoun D, et al. Combination therapy of statin and ezetimibe for the treatment of familial hypercholesterolemia. *Vasc Health Risk Manag* 2010;6:1023-37
84. Graesdal A, Bogsrud MP, Holven KB, et al. Apheresis in homozygous familial hypercholesterolemia: the results of a follow-up of all Norwegian patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol* 2012;6(4):331-9
85. Raper A, Kolansky DM, Cuchel M. Treatment of familial hypercholesterolemia: is there a need beyond statin therapy? *Curr Atheroscler Rep* 2012;14(1):11-6
86. Winters JL. Lipid apheresis, indications, and principles. *J Clin Apher* 2011;26(5):269-75 doi: 10.1002/jca.20299[published Online First: Epub Date].
87. Thompson GR. Lipoprotein apheresis. *Curr Opin Lipidol* 2010;21(6):487-91
88. Thompson GR, Group H-ULAW. Recommendations for the use of LDL apheresis. *Atherosclerosis* 2008;198(2):247-55
89. Julius U, Frind A, Tselmin S, et al. Comparison of different LDL apheresis methods. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008;6(5):629-39
90. Thompson GR, Catapano A, Saheb S, et al. Severe hypercholesterolaemia: therapeutic goals and eligibility criteria for LDL apheresis in Europe. *Curr Opin Lipidol* 2010;21(6):492-8

91. Fahed AC, Nassar AH. Pregnancy in a woman with homozygous familial hypercholesterolemia not on low-density lipoprotein apheresis. *AJP Rep* 2012;2(1):33-6
92. Therapy: Efficacy and safety of lomitapide in homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Endocrinol* 2012
93. Stefanutti C, Morozzi C, Di Giacomo S. New clinical perspectives of hypolipidemic drug therapy in severe hypercholesterolemia. *Curr Med Chem* 2012;19(28):4861-8
94. Bell DA, Hooper AJ, Watts GF, et al. Mipomersen and other therapies for the treatment of severe familial hypercholesterolemia. *Vasc Health Risk Manag* 2012;8:651-9
95. McGowan MP, Tardif JC, Ceska R, et al. Randomized, placebo-controlled trial of mipomersen in patients with severe hypercholesterolemia receiving maximally tolerated lipid-lowering therapy. *PLoS One* 2012;7(11)
96. Patel N, Hegele RA. Mipomersen as a potential adjunctive therapy for hypercholesterolemia. *Expert Opin Pharmacother* 2010;11(15):2569-72
97. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, et al. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* 2005;37(2):161-5
98. Hooper AJ, Burnett JR. Anti-PCSK9 therapies for the treatment of hypercholesterolemia. *Expert Opin Biol Ther* 2012
99. Sijbrands EJ. Inhibition of PCSK9 in familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 2012;380(9836):6-7
100. Stein EA, Gipe D, Bergeron J, et al. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9, REGN727/SAR236553, to reduce low-density lipoprotein cholesterol in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia on stable statin dose with or without ezetimibe therapy: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 2012;380(9836):29-36
101. Emre S, Dugan C, Frankenberg T, et al. Surgical portosystemic shunts and the Rex bypass in children: a single-centre experience. *HPB (Oxford)* 2009;11(3):252-7
102. Raal FJ, Santos RD. Homozygous familial hypercholesterolemia: current perspectives on diagnosis and treatment. *Atherosclerosis* 2012;223(2):262-8
103. Van Craeyveld E, Jacobs F, Gordts SC, et al. Gene therapy for familial hypercholesterolemia. *Curr Pharm Des* 2011;17(24):2575-91
104. Neil A, Cooper J, Betteridge J, et al. Reductions in all-cause, cancer, and coronary mortality in statin-treated patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia: a prospective registry study. *Eur Heart J* 2008;29(21):2625-33
105. Langslet G, Ose L. Screening methods in the diagnosis and assessment of children and adolescents with familial hypercholesterolemia. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2013;11(8):1061-6
106. Wilson C. Lipids: Targeting cascade screening in familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Cardiol* 2013;10(5):238
107. Hallowell N, Jenkins N, Douglas M, et al. Patients' experiences and views of cascade screening for familial hypercholesterolemia (FH): a qualitative study. *J Community Genet* 2011;2(4):249-57
108. Ned RM, Sijbrands EJ. Cascade Screening for Familial Hypercholesterolemia (FH). *PLoS Curr* 2011;3

109. Taylor A, Wang D, Patel K, et al. Mutation detection rate and spectrum in familial hypercholesterolaemia patients in the UK pilot cascade project. *Clin Genet* 2010;77(6):572-80
110. Marks D, Thorogood M, Neil SM, et al. Cascade screening for familial hypercholesterolaemia: implications of a pilot study for national screening programmes. *J Med Screen* 2006;13(3):156-9
111. Leren TP. Cascade genetic screening for familial hypercholesterolemia. *Clin Genet* 2004;66(6):483-7 d
112. Kusters DM, Homsma SJ, Hutten BA, et al. Dilemmas in treatment of women with familial hypercholesterolaemia during pregnancy. *Neth J Med* 2010;68(1):299-303
113. Avis HJ, Hutten BA, Twickler MT, et al. Pregnancy in women suffering from familial hypercholesterolemia: a harmful period for both mother and newborn? *Curr Opin Lipidol* 2009;20(6):484-90
114. Rutherford JD. Maternal heterozygous familial hypercholesterolemia and its consequences for mother and child. *Circulation* 2011;124(15):1599-601
115. Khader YS, Rice J, John L, et al. Oral contraceptives use and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis. *Contraception* 2003;68(1):11-7
116. Toleikyte I, Retterstøl K, Leren TP, et al. Pregnancy outcomes in familial hypercholesterolemia: a registry-based study. *Circulation* 2011;124(15):1606-14
117. Anedda S, Mura S, Marcello C, et al. HELP LDL-apheresis in two cases of familial hypercholesterolemic pregnant women. *Transfus Apher Sci* 2011;44(1):21-4
118. Ertorer ME, Guvenc B, Haydardedeoglu B, et al. A case report of the cascade filtration system: a safe and effective method for low-density lipoprotein apheresis during pregnancy. *Ther Apher Dial* 2008;12(5):396-400.
119. Węgrzyn A. Statyny w leczeniu hipercholesterolemii rodzinnej. In: Andrzej R, ed. Aktualny stan wiedzy na temat statyn. Wyd 2 zm. i uzup. pod red M Banacha, k J Filipiaka i g Opolskiego. Poznań: Termedia wydawnictwa medyczne, 2013.
120. Langer RD, Pradhan AD, Lewis CE, et al. Baseline associations between postmenopausal hormone therapy and inflammatory, haemostatic, and lipid biomarkers of coronary heart disease. *The Women's Health Initiative Observational Study. Thromb Haemost* 2005;93(6):1108-16
121. Seed M. The choice of hormone replacement therapy or statin therapy in the treatment of hyperlipidemic postmenopausal women. *Atheroscler Suppl* 2002;3(1):53-63
122. Daniel KR, Herrington DM. Statin therapy in the heart and estrogen/progestin replacement study. *Minerva Ginecol* 2003;55(3):209-15
123. Vittinghoff E, Shlipak MG, Varosy PD, et al. Risk factors and secondary prevention in women with heart disease: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. *Ann Intern Med* 2003;138(2):81-9
124. Herrington DM, Vittinghoff E, Lin F, et al. Statin therapy, cardiovascular events, and total mortality in the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS). *Circulation* 2002;105(25):2962-7
125. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288(3):321-33
126. Blakely JA. The heart and estrogen/progestin replacement study revisited: hormone replacement therapy produced net harm, consistent with the observational data. *Arch Intern Med* 2000;160(19):2897-900

127. Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC, et al. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol* 1993;72(2):171-6
128. Myśliwiec M, Walczak M, Małecka-Tendera E, et al. Management in familial hypercholesterolaemia in children and adolescents. Position of the Lipid Expert Forum. *Kardiol Pol* 2013;71(10):1099-105
129. Martin AC, Coakley J, Forbes DA, et al. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: A new paediatric model of care. *J Paediatr Child Health* 2012
130. McCrindle BW. Familial hypercholesterolemia in children and adolescents. *Curr Opin Lipidol* 2012;23(6):525-31
131. Vuorio A, Docherty KF, Humphries SE, et al. Statin treatment of children with familial hypercholesterolemia - Trying to balance incomplete evidence of long-term safety and clinical accountability: Are we approaching a consensus? *Atherosclerosis* 2012
132. Carreau V, Girardet JP, Bruckert E. Long-term follow-up of statin treatment in a cohort of children with familial hypercholesterolemia: efficacy and tolerability. *Paediatr Drugs* 2011;13(4):267-75
133. Davidson MH. A systematic review of bile acid sequestrant therapy in children with familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol* 2011;5(2):76-81
134. Descamps OS, Tenoutasse S, Stephenne X, et al. Management of familial hypercholesterolemia in children and young adults: consensus paper developed by a panel of lipidologists, cardiologists, paediatricians, nutritionists, gastroenterologists, general practitioners and a patient organization. *Atherosclerosis* 2011;218(2):272-80
135. Avis HJ, Hutten BA, Gagné C, et al. Efficacy and safety of rosuvastatin therapy for children with familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2010;55(11):1121-6
136. Lebars MA, Rieu D, Girardet JP. [Dietary recommendations for children with hypercholesterolemia]. *Arch Pediatr* 2010;17(7):1126-32
137. Vuorio A, Kuoppala J, Kovanen PT, et al. Statins for children with familial hypercholesterolemia. *Cochrane Database Syst Rev* 2010(7):CD006401
138. van der Graaf A, Kastelein JJ, Wiegman A. Heterozygous familial hypercholesterolaemia in childhood: cardiovascular risk prevention. *J Inherit Metab Dis* 2009;32(6):699-705
139. Simell O, Niinikoski H, Rönnemaa T, et al. Cohort Profile: the STRIP Study (Special Turku Coronary Risk Factor Intervention Project), an Infancy-onset Dietary and Life-style Intervention Trial. *Int J Epidemiol* 2009;38(3):650-5
140. Wiegman A, Hutten BA, de Groot E, et al. Efficacy and safety of statin therapy in children with familial hypercholesterolemia: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;292(3):331-7
141. Rodenburg J, Vissers MN, Wiegman A, et al. Statin treatment in children with familial hypercholesterolemia: the younger, the better. *Circulation* 2007;116(6):664-8
142. Wiegman A, de Groot E, Hutten BA, et al. Arterial intima-media thickness in children heterozygous for familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 2004;363(9406):369-70
143. Stein EA, Marais AD, Szamosi T, et al. Colesevelam hydrochloride: efficacy and safety in pediatric subjects with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Pediatr* 2010;156(2):231-6.e1-3

144. Chmara M, Wasag B, Zuk M, et al. Molecular characterization of Polish patients with familial hypercholesterolemia: novel and recurrent LDLR mutations. *J Appl Genet* 2010;51(1):95-106
145. Zdrojewski T, Rutkowski M, Bandosz P, et al. Prevalence and control of cardiovascular risk factors in Poland. Assumptions and objectives of the NATPOL 2011 Survey. *Kardiol Pol* 2013;71(4):381-92
146. Vuorio AF, Turtola H, Piilhti KM, et al. Familial hypercholesterolemia in the Finnish north Karelia. A molecular, clinical, and genealogical study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(11):3127-38
147. Yagi K, Hifumi S, Nohara A, et al. Difference in the risk factors for coronary, renal and other peripheral arteriosclerosis in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Circ J* 2004;68(7):623-7
148. Brorholt-Petersen JU, Jensen HK, Raungaard B, et al. LDL-receptor gene mutations and the hypocholesterolemic response to statin therapy. *Clin Genet* 2001;59(6):397-405
149. Jensen HK. The molecular genetic basis and diagnosis of familial hypercholesterolemia in Denmark. *Dan Med Bull* 2002;49(4):318-45
150. Jensen JM, Gerdes LU, Jensen HK, et al. Association of coronary heart disease with age-adjusted aortocoronary calcification in patients with familial hypercholesterolaemia. *J Intern Med* 2000;247(4):479-84
151. Holmes DT, Schick BA, Humphries KH, et al. Lipoprotein(a) is an independent risk factor for cardiovascular disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2005;51(11):2067-73
152. Nicholls P, Young I, Lyttle K, et al. Screening for familial hypercholesterolaemia. Early identification and treatment of patients is important. *BMJ* 2001;322(7293):1062
153. Bourbon M, Rato Q, Familiar IdEPdH. Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study: presentation of the study and preliminary results. *Rev Port Cardiol* 2006;25(11):999-1013
154. Goldberg AC, Hopkins PN, Toth PP, et al. Familial hypercholesterolemia: screening, diagnosis and management of pediatric and adult patients: clinical guidance from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol* 2011;5(3 Suppl):S1-8 doi: 10.1016/j.jacl.2011.04.003[published Online First: Epub Date].
155. O'Kane MJ, Menown IB, Graham I, et al. The detection of heterozygous familial hypercholesterolemia in Ireland. *Adv Ther* 2012;29(5):456-63
156. Nherera L, Marks D, Minhas R, et al. Probabilistic cost-effectiveness analysis of cascade screening for familial hypercholesterolaemia using alternative diagnostic and identification strategies. *Heart* 2011;97(14):1175-81
157. Nherera L, Calvert NW, Demott K, et al. Cost-effectiveness analysis of the use of a high-intensity statin compared to a low-intensity statin in the management of patients with familial hypercholesterolaemia. *Curr Med Res Opin* 2010;26(3):529-36
158. Mabuchi H, Higashikata T, Nohara A, et al. Cutoff point separating affected and unaffected familial hypercholesterolemic patients validated by LDL-receptor gene mutants. *J Atheroscler Thromb* 2005;12(1):35-40

159. Sharma P, Boyers D, Boachie C, et al. Elucigene FH20 and LIPOchip for the diagnosis of familial hypercholesterolaemia: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2012;16(17):1-266
160. Harada-Shiba M, Sugisawa T, Makino H, et al. Impact of statin treatment on the clinical fate of heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb* 2010;17(7):667-74
161. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, et al. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review. *Am J Epidemiol* 2004;160(5):421-9
162. Fahed AC, Nemer GM. Familial hypercholesterolemia: the lipids or the genes? *Nutr Metab (Lond)* 2011;8(1):23
163. Varret M, Abifadel M, Rabès JP, et al. Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet* 2008;73(1):1-13
164. Familial hypercholesterolemia and estimation of U.S. patients eligible for low-density lipoprotein apheresis following maximally tolerated lipid-lowering therapy. 2013
165. Banach M, Filipiak KJ, Opolski G. Aktualny stan wiedzy na temat statyn / pod red. Macieja Banacha, Krzysztofa J. Filipiaka i Grzegorza Opolskiego: Poznań: Termedia Wydawnictwa Medyczne, cop. 2008.