دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون
نشریات علوم پزشکی کشور

تشخیص مولکولی هیپرکلسترولمی فامیلی

احمد موحدیان
گروه بیوشیمی بالینی ، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران

شهره علیزاده شرق
گروه ژنتیک پزشکی و بیولوژی ، دانشگاه 9-یول، ازمیر، ترکیه

سیّده زهرا رحمانی
گروه تشخیص، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

همایون دولتخواه
گروه بیوشیمی بالینی ، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و گروه بیوشیمی و آزمایشگاههای بالینی

نویسنده مسئول: همایون دولتخواه

تلفن : 09143117197

پست الکترونیک: dolatkhahh@gmail.com

آدرس : ایران، تبریز ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز دانشکده پزشکی

وصول مقاله: 90/8/28
اصلاح نهایی: 91/1/21
پذیرش مقاله:91/2/13

چکیده

زمینه و هدف *: هیپرکلسترولمی فامیلی (Familial Hypercholesterolemia) یک اختلال اتوزومال غالب است که مشخصه آن افزایش مقادیر کلسترول تام و لیپوپروتئین با چگالی پایین (Low Density Lipoprotein) است. فنوتیپ بالینی این بیماری همراه با افزایش خطر بیماریهای قلبی-عروقی و مرگ زودهنگام است. جهش‌های پدید آمده در ژن گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDLR) می‌تواند منجر به بروز فنوتیپ FH شود و جهش ژن‌های دیگر از جمله آپولیپوپروتئین B نیز می‌تواند همین تابلو را ایجاد کند. از آنجاییکه وراثت و جهش نیز تحت تاثیر عوامل مختلف محیطی از جمله رژیم غذایی و سایر ژن‌ها واقع می شوند، بنابراین اجرای آزمایشهای روتین برای تعیین سطح کلستول و LDL بعلت حساسیت بالا و ویژگی پایین، جهت تشخیص زودرس و درمان به موقع کافی نیست. انجام آزمایشات دقیق ملکولی بدلیل حساسیت و ویژگی 100 درصد، برای تعیین جهش‌های شایع در ژن LDLR (و احتمالاً ژن‌های دیگر) و تعیین دلیل قطعی بیماری، امکان درمان صحیح را تقویت میکند. درحال حاضر روش‌های PCR-SSCP و Southern-blotting جزو روشهای متداول ملکولی برای بررسی اکثر جهش‌های مهم است. به دلیل تنوع بسیار زیاد نوع جهش در ژن LDLR انجام منطقه‌ای آزمایشات و تعیین شیوع انواع جهش ها و سپس انجام آزمایشهای روتین برحسب آن نوع جهش‌ها توصیه می‌شود.*

واژه های کلیدی: *هیپرکلسترولمی فامیلی، جهش، ژن گیرنده لیپوپروتئین با چگالی کم (LDLR)، تشخیص مولکولی*

آدرس مقاله:
موحدیان ا، علیزاده شرق ش، رحمانی س ز، دولتخواه ه" تشخیص مولکولی هیپرکلسترولمی فامیلی". مجله علوم آزمایشگاهی بهار و تابستان ، 1391دوره ششم(شماره1) :84-73

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

هیپرکلسترولمی فامیلی (FH)یک بیماری بسیار پیچیده و چندعاملی است که مطابق با قوانین مندلی به ارث می رسد و بسیار ضروری است که امروزه دانش ما در مورد علائم بالینی ، تشخیص آزمایشگاهی و مدیریت این بیماری کاملاً بروز و کافی باشد. FH یکی از شایعترین اختلالات ارثی می باشد که میزان شیوع آن متاسفانه در جوامع انسانی نسبتاً بالا است (1). هیپرکلسترولمی فامیلی با افزایش غلظت پلاسمائی کلسترول و لیپوپروتئین با چگالی پایین (Low Density Lipoprotein) مشخص می‌شود که منجر به بیماری زودرس عروق کرونری قلبی می‌شود(2). عملکرد طبیعی گیرنده کبدی لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL) برای نگهداشتن غلظت پلاسمائی LDL-C ضروری است. این گیرنده غلظت پلاسمایی کلسترول و LDL-C را از طریق اینترنالیزه کردن آپولیپوپروتئین B-100 و لیپوپروتئین‌های محتوی آپولیپوپروتئین E (انجام آندوستیوز با واسطه گیرنده) تنظیم می‌نماید(3و4). جهش‌های پدید آمده در ژن کد کننده پروتئین گیرنده LDL-C منجر به بروز این اختلال شایع وراثتی کلاسیک در انسان می شود. این اختلال بطور کلی در دو فرم قابل بررسی است:

1-فرم هتروزیگوت، که بیمار دارای یک آلل سالم و یک آلل جهش یافته است که شایعترین فرم بوده و میزان شیوع آن در جوامه بشری حدود یک تولد در 500 تولد می باشد (0/2%)(3، 4). افراد هتروزیگوت با افزایش شدید کلسترول و LDL-C پلاسما در اوائل دوران کودکی مواجه هستند. که این افزایش بصورت گزانتوم تاندونی و افزایش قابل توجه خطر بیماری‌های قلبی-عروقی زودرس مشاهده می‌شود. خوشبختانه در صورت تشخیص سریع و قطعی، مبتلایان به این فرم نسبت به درمان پاسخ خوبی می دهند. کنترل مناسب سطح پلاسمائی کلسترول و LDL-C در اکثر هتروزیگوت‌ها قابل حصول می‌باشد. این امکان از راه ترکیبی از رژیم غذایی مناسب، درمان داروئی و کاهنده انتخابی LDL-C فراهم می‌آید (8-5). بنابراین آگاه بودن پزشک معالج از وجود چنین اختلال نسبتاً شایع از اهمیت فوق‌العاده زیادی برخوردار است چرا که دلایل محکمی وجود دارد که نشان دهنده تاثیر تشخیص زودرس بر درمان کاهش دهنده کلسترول بوده و این درمان باعث به تاخیر افتادن یا حتی پیشگیری کامل بیماریهای قلبی-عروقی در مبتلایان به FH فرم هتروزیگوت می‌شود.

2-فرم هموزیگوت که در آن بیمار دو آلل جهش یافته دارد که به این نوع اصطلاحاً اختلال اتوزومال هم بارز (Codominat) نیز گفته می شود. شیوع این فرم نسبت به فرم هتروزیگوت بسیار کمتر بوده و در حدود یک تولد در هر میلیون تولد می باشد. مبتلایان به این فرم بایستی در سنین بسیار پایین تشخیص داده شود چراکه اولاً نسبت به درمان های معمول پاسخ خوب نمی دهند و در ثانی در صورت عدم درمان، خیلی سریع به سمت بیماریهای قلبی-عروقی پیشرفته رفته و در سنین پایین ازبین خواهند رفت (3و 4).

متاسفانه هم اکنون درصد قابل توجهی از این افراد تشخیص داده نشده و مورد درمان مناسب واقع نمی‌شوند. به نظر می‌رسد قابلیت‌های تشخیصی موجود در روش‌های مولکولی امیدوارهایی در جهت بهبود وضع مذکور پدید خواهد آورد. استفاده از این روشها توانمندی لازم را برای کسب اطلاعات ارزشمند در رابطه با تکنولوژی تشخیصی برای جهش‌های رایج و تعیین درصد شیوع و گستردگی جهش‌های مربوط به گیرنده ژن LDL-C فراهم خواهد کرد. استفاده از روش‌هائی برای ارزیابی میزان پاتوژنیسیتی جهش درژن گیرنده LDL-C، رابطه بین فنوتیپ – ژئوتیپ در FH، تشخیص بالینی در مقابل تکنولوژی تشخیصی در بیماران FH از جمله اهداف این تحقیقات محسوب می‌شود.

دراین مقاله مروری سعی شده است مکانیسمهای ژنتیکی و مولکولی افزایش کلسترول در نزد انسان بررسی و شرح داده شده و روشهای جدید در تشخیص هیپرکلسترولمی فامیلی معرفی شود. چراکه تشخیص دقیق بالینی FH به همراه تشخیص قطعی آزمایشگاهی، به پزشکان این امکان را خواهد داد که بتوانند جهت اهداف درمانی اختصاصی، براحتی بین FH و سایر اختلالات لیپیدی تمایز قائل شوند. لذا برای به روز رسانی وضعیت هیپرکلسترومی خانوادگی باید با توجه

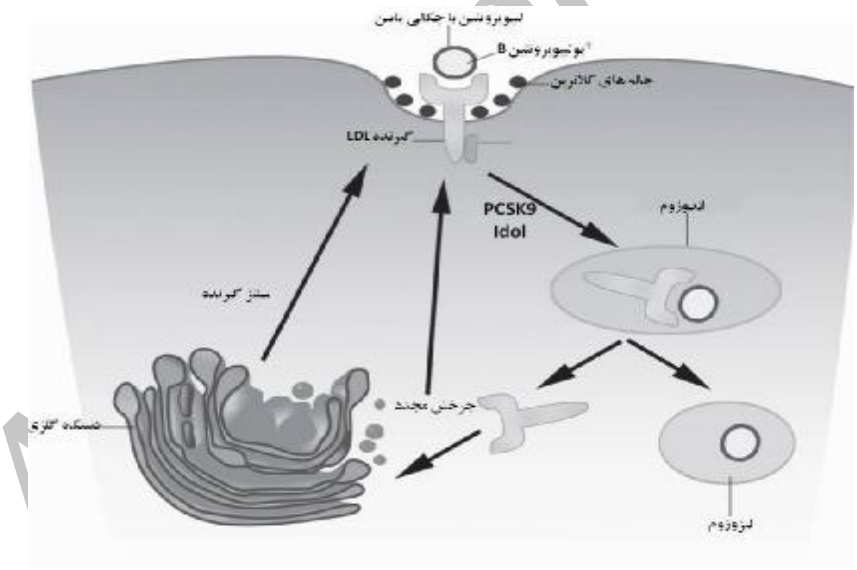
Archive of SID

www.SID.ir

ویژه بر روی ژنتیک، تشخیص آزمایشگاهی انجام شود.گرچه مکانیسم ایجاد بیماری FH در کشورهای مختلف بطور جامع مورد مطالعه قرار گرفته است ولی هم اکنون نیز هرساله جهش های ژنی جدیدی در ارتباط با این بیماری گزارش می شود. بنابراین باید با درنظر گرفتن تمامی جوانب علت و نوع بیماری مشخص شود تا یک استراتژی صحیح و اثربخش برای درمان بیماری هیپرکلسترولمی فامیلی اتخاذ شود.

گیرنده های LDL(LDL_R):

گیرنده LDL از یک پروتئین پیش ساز 120 کیلو دالتونی سنتز می شود. پس از اینکه توالی ترجمه از روی این پروتئین برداشته شد، جهت پردازش به سیستم رتیکولواندوتلیال و دستگاه گلژی منتقل خواهد شد. دراین قسمتها پروتئین گلیکوزیله شده و نهایتاً بشکل گیرنده بالغ به سطح سلول منتقل می شود. در غشاء در قسمت چاله های کلاترین، با مولکول کلاترین پوشش داده می شود. پوشش توسط کلاترین باعث خواهد شد که گیرنده بتواند مولکولهای غنی از آپولیپوپروتئین Bو E را براحتی شناسایی نماید. بلافاصله پس از اینکه گیرنده مولکولهای LDL ، که غنی از این دو آپولیپوپروتئین است، را شناسایی و جذب کرد، توسط مکانیسم اندوسیتوز به اندوزومها مهاجرت می کند. pH اسیدی اندوزومها باعث تفکیک LDL از گیرنده خود شده، گیرنده دوباره به غشاء برگشته و وارد چرخه جدید می شود. ذرات LDL نیز به لیزوزومها منتقل شده و در آنجا تخریب خواهند شد. دو پروتئین کنورتاز پره پروتئین subtilisin/kexin تیپ 9 (PCSK9) و پروتئین Idol از طریق کاهش مسیر چرخه مجدد رسپتورها و افزایش تخریب LDL به این مسیر کمک شایانی می کنند(شکل 1).

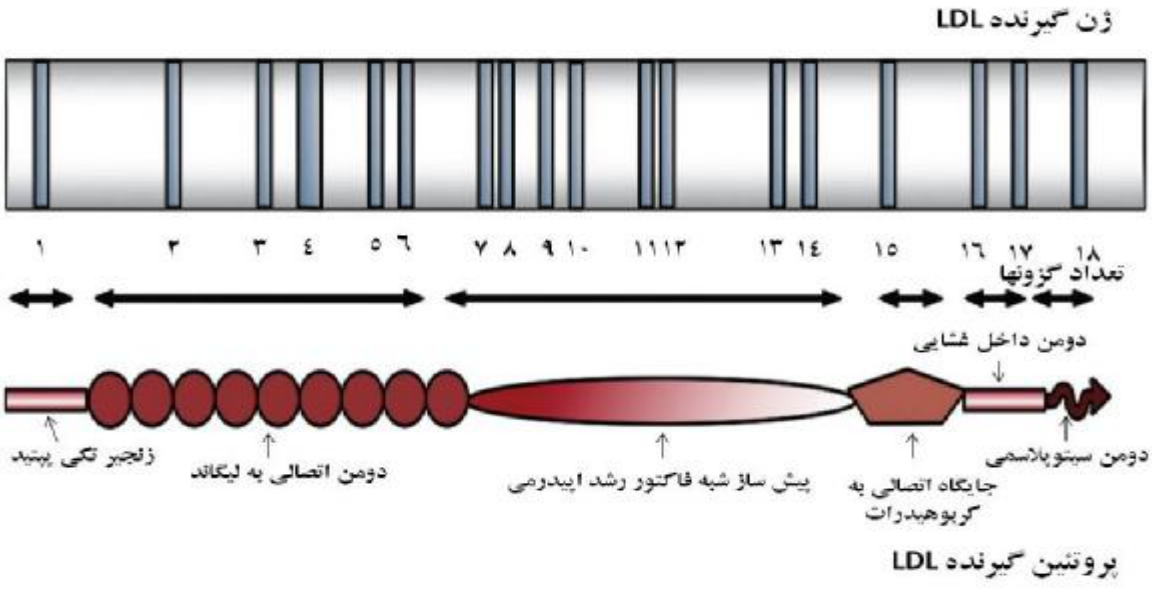


شکل 1. چرخه بیوسنتز و عملکرد گیرنده **LDL**

نقشه ژنتیکی تهیه شده از ژن کد کننده پیش پروتئین گیرنده LDL نشاندهنده آن است که این ژن برروی کروموزوم شماره 19 از ناحیه 13/1 تا ناحیه 13/3 با 45 هزار جفت باز می باشد و گلیکوپروتئینی که از روی این ژن سنتز شده و بعنوان گیرنده LDL شرح داده شده است، از 839 اسیدآمینه تشکیل شده است.

این ژن شامل 18 ناحیه اگزون، 17 ناحیه انترون و شش حوزه عملکردی می باشد که سنتز پروتئین را که مشتمل بر سنتز تک زنجیره پپتیدی، دومن اتصالی به لیگاند، پیش ساز شبه فاکتور رشد اپیدرمی، جایگاه اتصالی کربوهیدراتی (O-لینک)، ناحیه داخل غشایی و دومن سیتوپلاسمی را پشتیبانی می کند (شکل 2).

www.SID.ir



شکل 2. ژن و ساختار شماتیک پیش پروتئین گیرنده **LDL**

پیش بینی جایگاه حضور دومن های مختلف برروی گیرنده را با تعیین توالی ژنی می توان انجام داد. با این روش مشخص شده است که هر دومن بوسیله اگزون متفاوت یا گروهی از آنها کد می شود ولی اگزون اصلی و کنترل کننده مراحل بلوغ گیرنده هنوز بطور کامل مشخص نشده است. این مطلب نشاندهنده این امر می باشد که ممکن است مراحل بلوغ گیرنده توسط اگزون سایر ژنها صورت گیرد، چون در ساختار پروتئینی گیرنده های LDL قسمتهایی شبیه پروتئین های غیرمرتبطی با این گیرنده شناسایی شده است و بهمین دلیل است که موتاسیونهای مختلف و جدیدی هر ساله گزارش شده است که در ارتباط با بیماری هیپرکلسترولمی فامیلی است (2).

پاتوفیزیولوژی

FH اختلالی است که به طور عمده ناشی از اختلال کامل یا ناقص در عمکرد گیرنده LDL-C است. این پروتئین مهمترین عامل برداشت کلسترول توسط کبد است که تقریباً نزدیک به70% ذرات LDL-C گردشی را جذب می‌کند. همان طوریکه در بالا اشاره شد، LDL-C از طریق دو لیگاند به گیرنده متصل می‌شود: آپولیپو پروتئین B-100 (با محل کروموزومی 2p23-24) و آپولیپوپروتئین E(9).

گیرنده LDL-C به apoE با تمایل بالاتری نسبت به apo B-100 اتصال می‌یابد و بروز برخی جهش‌ها در ساختمان گیرنده می‌تواند منجر به مازاد در جذب LDL-C، در نتیجه افزایش تمایل اتصال به apoE شود. برای اولین بار گلدستین و براون در سال 1985 گیرنده LDL-C را شناسایی و توصیف نمودند و نیز مشخص کردند که FH یک بیماری اتوزومال غالب است و فعالیت گیرنده LDL-C در طیفی از فقدان کامل تا تقریباً 25% فعالیت گیرنده طبیعی متغیر است (11 و 10).

پنج دسته از جهش‌ها تاکنون شناسایی شده است:

- دسته اول شامل آلل‌های خنثی است که باعث فقدان کامل گیرنده LDL-C می‌شود.
- دسته دوم شامل آلل‌های انتقالی ناقصی است که تاخوردگی طبیعی گیرنده را از بین برده و همچنین باعث اختلال در انتقال به سطح سلول و اختلال در انتقال موفقیت‌آمیز گیرنده ناقص و جهش‌یافته می‌شود.
- دسته دوم زیر گروه a: جهش‌هایی است که به طور کامل انتقال گیرنده از شبکه رتیکولوم آندوپلاسمیک به دستگاه گلژی را متوقف می‌کند.

Archive of SID

www.SID.ir

- دسته دوم زیرگروه b: جهش‌هایی است که ناشی از بلوکه شدن ناقص انتقال گیرنده از رتیکولوم آندوپلاسمیک به دستگاه گلژی می‌شود.
- دسته سوم: شامل نقص در آلل‌های متصل شونده است که اتصال LDL-C را تحت تاثیر قرار داده در برخی موارد اتصال VLDL-C را نیز مخدوش می کند.
- دسته چهارم: شامل اختلالاتی در آلل‌های داخل کننده (Internalization) است که غلظت طبیعی گیرنده را در حفرات پوشیده از کلاترین را تحت تاثیر قرار داده و ورود گیرنده به سلول‌های کبدی را مختل سازد.
- دسته پنجم: شامل اختلالاتی در آلل‌های بازیافتی است که جدا شدن گیرنده از لیگاند را مهار نموده و در نتیجه گیرنده و بازیافت مجدد گیرنده مختل می‌شود (10).

میزان شیوع H:

شیوع هتروزیگوتی FH در اروپا مشابه ایالات متحده است اما در مناطق ویژه‌ای نظیر ایسلند و فنلاند دارای درصد شیوع بالاتری هستند. میزان شیوع در کانادائی‌های مقیم فرانسه 1 در 270 مورد و مسیحیان لبنانی 1 مورد در 170 است. به دلیل تاثیر پدیده تفکیک ژنتیکی و جمعیت‌های تقریباً ایزوله، 3 جمعیت مجزا در افریقای جنوبی دارای شیوع بی‌نهایت بالایی از FH هستند: 1 مورد در 67 مورد قوم اشکناری یهودی و 1 مورد در 100 نفر در هر دو جهت سیاهپوستان و سرخپوستان مقیم آفریقای جنوبی دیده می شود. درحال حاضر هیچ برآورد صحیحی از مبتلایان به هیپرکلسترولمی فامیلی در کشورهای آسیایی وجود ندارد و معمولاً دراین کشورها بیمارانی که جهت درمان به کلینیک مراجعه می کنند، فقط از نظر میزان تری گلیسرید، کلسترول، HDL و LDL مورد بررسی قرار می گیرند. در صورت بالا بودن مقادیر این پروفیلهای لیپیدی بصورت موردی درمان می شوند و متاسفانه هیچ پزشکی به خود زحمت این را نمی دهد که بیماران را از نظر هیپرکلسترولمی فامیلی مورد بررسی قرار دهند (1).

نژاد: نژادهای ویژه‌ای از جمله فنلاندی، لبنانی، یهودیان اشکناری، آفریقایی‌ها یا کانادائیهای فرانسوی دارای شیوع بالاتری هستند (12و13).

جنس: از نظر جنس درصد ابتلا یکسان است اما در فرم هیپرکلسترولمی هتروزیگوت، در سنین پایین شیوع بیماری در پسرها نسبت به دخترها بیشتر دیده می شود، چراکه در خانمها تا سنین یائسگی هورمون‌های استروئیدی میزان کلسترول را تا حدود زیادی کاهش می دهد. دختران و پسران هوموزیگوت خطر یکسانی برای بروز بیماری‌های قلبی – عروقی دارند(9).

کودکان مبتلا به FH از نوع هوموزیگوت:

این بیماران علائمی شامل بیماریهای ایسکمیک قلبی، یا بیماری‌های عروقی محیطی، بیماری‌های عروق مغزی یا استنوزآئورتی نشان می‌دهند(14). ممکن است این علائم با سایر نشانه‌هائیکه در موارد بسیار خوش خیم‌تر نیز بروز می‌نماید اشتباه شوند، مگر آنکه تشخیص مبتلایان به FH هوموزیگوت در آنها داده شود. ازطرفی این بیماران ممکن است عوارض شریانی نظیر tendonitis یا آرتراژی و وجود ضایعات غیرمعمول پوستی را نشان دهند.

والدین چنین بیمارانی به دلیل هتروزیگوت بودن اجباری و علی رغم داشتن سطح شدیداً بالای LDL-C ، اغلب جوانتر از آن هستند که علائم بیماری قلبی را نشان دهند. لذا گرفتن تاریخچه بیماری از هیپرکلسترولمی و نیز آزمایشات ژنتیکی می‌تواند باعث نجات جان خویشاوندان درجه دوم بیمار بشود.

کودکان مبتلا به FH از نوع هتروزیگوت:

کودکان هتروزیگوت علائمی ناشی از بیماریهای قلبی را نشان نمی‌دهند و یکی از والدین دارای هیپرکلسترولمی بسیار بالاست و به احتمال زیاد فردی از اعضای خانواده با حمله قلبی زودرس دارند. به دلیل غالب بودن ژن FH، 50% فرزندان فرد مبتلا از نظر FH هتروزیگوت خواهند بود.

بالغین هوموزیگوت:

بیش از 30 سال زندگی آنها دوام نمی‌یابد مگر آنکه با روشهای غیرمعمول از قبیل پیوند کبدی، آفرزLDL-C یا تحت عمل جراحی بای پس ایلئوم قرار گیرند.

افراد خانواده این بیمار هیپرکلسترولمی داشته و سابقه حملات قلبی زودرس دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

بالغین هترزیگوت:

این بیماران سابقه طولانی از هیپرکلسترولمی از زمان کودکی دارند. در صورت عدم بروز بیماری قلبی شدید، درصورت مصرف دخانیات (15) علائم بیشتر بصورت بیماری ایسکمیک قلبی می باشد. در موارد نقص در جذب لیگاند apo B-100 افراد مبتلا بیماری خوش‌خیم‌تری نسبت به سایر هتروزیگوت‌ها خواهند داشت.

هیپرکلسترولمی به شکل اتوزومال مغلوب:

نوع جدیدی از اختلال که اخیراً با روش‌های مولکولی شناسایی شده است و در عین حال منجر به افزایش شدید مقادیر LDL-C سرم می‌شود هیپرکلسترولمی مغلوب اتوزومال است این بیماران مقادیر LDL-C بالاتر از 40(میلی‌گرم در دسی لیتر) دارند با اینحال افراد هتروزیگوت دارای مقادیر نرمال LDL-C می باشند (هیپرکلسترولمی پلی ژنتیک)

استراتژی تشخیصی در بیماری‌های قلبی و عروقی:

مرحله A: قدم نخست در تشخیص افراد مستعد برای ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی انجام آزمایشات سرمی برای بررسی الگوی لیپیدهای خونی است:

LDL-C	**بیش از 130 میلی‌گرم در دسی لیتر**
HDL-C	**کمتر از 40 میلی‌گرم در دسی لیتر**
تری آسیل گلیسرول	**بیش از 400 میلی‌گرم در دسی لیتر**

در مرحله B: ارزیابی مجدد در عرض 5-1 سال در صورتیکه نتایج زیر بدست آید: (لازم به ذکر است که ریسک برای حمله قلبی وجود ندارد):

کلسترول تام	**کمتر از 200میلی‌گرم در دسی لیتر**
LDL-C	**کمتر از 130 میلی‌گرم در دسی لیتر**
HDL-C	**بیش از 35 میلی‌گرم در دسی لیتر**

مرحله C: ارزیابی بعد 2-1 سال بعد:

این بیمارداری ریسک متوسط ابتلا به بیماری‌های ناشی از افزایش چربی خون در 2-1 سال بعد خواهد بود اگر:

کلسترول تام	**بیش از 200 میلی‌گرم در دسی لیتر**
LDL-C	**بیش از 130 میلی‌گرم در دسی لیتر**
HDL-C	**کمتر از 40 میلی‌گرم در دسی لیتر**

علاوه بر این الگوی شناسایی هیپرکلسترولمی، اختلالات ارثی همراه با کنترل تهاجمی چربی خون به شکل زیر است: هیپرکلسترولمی خانوادگی که با افزایش شدید کلسترول تا 260 میلی‌گرم در دسی لیتر همراه است، گزانتوم تاندون و CHD زودرس را مشخص می‌کند و هیپرلیپیدمی ترکیبی خانوادگی که با افزایش در کلسترول تام و تری آسیل گلیسرولها یا هر دو، دراعضای مختلف یک خانواده همراه است و CHD زودرس را مشخص می کند (13). در بیمارانیکه هیپرکلسترولمی بسیار شدید نشان می دهند، بایستی تحت بررسی غربالی قرار بگیرند. سایر دلایل افزایش LDL-C شامل: نارسائی مزمن کلیوی و پس از پیوند کلیه (16) ، دیابت ملیتوس(17و 18)، مصرف الکل، ابتلا به HIV ، هیپوتروئیدیسم(19)، کاهش فعالیت بدنی(20)، سندرم نفروتیک ، چاقی، بیماری‌های انسدادی کبدی (21) و درمان با استروژن‌هاست (22).

انواع جهش‌های موجود در ژن‌های مرتبط با لیپوپروتئین‌ها در هیپرکلسترولمی فامیلی:

گرچه قسمت عمده فنوتیپ FH به دلیل نقائصی در ژن مربوط به گیرنده LDL-C دیده می‌شود اما بروز جهش در سایر ژن‌ها نظیر ژن آپولیپوپروتئین B(apoB) یا کنورتاز پروپروتئین subtilisin/kexin تیپ 9 (PCSK9) نیزمی‌تواند فنوتیپ فوق را ایجاد نماید. در این میان کاهش لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) یا هیپوآلفالیپو پروتئینی (Hypoalphalipoproteimenia) دراکثر هیپرکلسترولمی‌های فامیلی نیز بشکل بارزی وجود دارد که دلایل آن هنوز معلوم نمی‌باشد. در واقع یکی از راههای تشخیص FH، وجود مقادیر HDL-C کمتر از 40 میلی‌گرم در دسی لیتر است (25-22). یکی ازانواع جهش‌های گیرنده LDL-C نوعی انحراف کدون (Frame – shift) در قالب اگزون5 در ژن مربوطه است برای اثبات وجود اختلال در سایر ژن‌های مرتبط با متابولیسم HDL-C نظیر ApoAI، لکتین، آنزیم کلسترول استیل ترانسفراز (LCAT)، پروتئین کلسترول استر ترانسفر (CETP) و لیپوپروتئین‌لیپاز (LPL) با روشهای ایمنوتوربیدیمتریک قابل بررسی هستند (27و26). همچنین جهش‌های N370S و L444P که جزو شایعترین جهش‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

در ژن گلوکوسربروزیداز (GBA) است همراه با HALP ثابت شده است. جهش ازنوع $1VS3-23C \rightarrow A$ در ژن LCAT در بررسیهای اخیر بر روی برخی خانواده‌های مبتلا به FH در مراکش مشاهده شده است (28).

روش‌های مبتنی بر تشخیص مولکولی FH:

بررسی به روش Southern blot در ژن LDL_R قادر به شناسایی نقایص عمده در ژن نمی‌باشد، ولی انجام آزمایشات PCR-SSCP قادر به تشخیص دو الگوی غیرعادی در اگزون شماره 5 است. همچنین تعیین سکانس DNA روی محصولات PCR بیانگر یک نوع حذف جدید هفت جفت بازی درنوکلئوتید 756 در cDNA است (756del7) که در افراد هوموزیگوت دیده می شود. این نوع جهش انحراف قالب باعث ایجاد یک کدون توقف در موقعیت 241 می گردد و یک نوع پروتئین بریده و ناقص تولید می‌نماید. در انجام PCR والکتروفورز، دو باند دیده می‌شود، یک نوار 180 جفت بازی طبیعی و یک نوار موتانت 173 جفت بازی. ولی باید در نظر داشت که رابطه فنوتیپ – ژنوتیپ در افراد هتروزیگوت کم است(28).

در مطالعه دیگر که توسط Van Leuven (2001) و همکاران انجام شد، جهش‌های جدید در ژن LDL_R گزارش گردیده است: E10X، 518 ـ211 delG، C255X، Q136X، جهش تغییر قالب (delG، 1045delC، 2085 del19، 2207 insT و 2393 del 9) و پنج جهش برش (Splicing) ($313+1G \rightarrow C$، $1061-8T \rightarrow C$، $1845+1G \rightarrow C$، $2140+5G \rightarrow A$، $2390-1G \rightarrow C$)، در ژن LDL_R تشخیص داده شده است (32).

جهش‌های دیگر در جمعیت سن پترزبورگ روسیه توسط Chakir R و همکاران(33) گزارش شده است که از نوع 347 delGCC و E397X می‌باشند و در جمعیت چین PangQf و همکاران (34) جهش‌های دیگری به شکل C255R (R3500Q)، از انواع جدیدی بوده است که گزارش نموده‌اند. همانطورکه مشاهده می‌شود هتروژنیستی بسیار وسیعی در ژن LDL_R و سایر ژن‌های مرتبط وجود دارد که باعث پیچیدگی بیماری، تشخیص و نهایتاً درمان موثر آن می شود.

در مطالعات انجام شده توسط Jensen HK (1999) در دانمارک(30)، جهش منحصر به فرد دیگری در یک بیمار FH به شکل هش مضاعف C292W*1 و K290R شناسایی شده است که 5 نوع جهش غالب به صورت W23X، W556S، $313+1G \rightarrow A$، $1846-1G \rightarrow A$ وجود داشت.

انواع جهش‌های شایع از نوع نوترکیبی، انحراف کدون (Frame – shift) و جهش‌های بی‌معنی (non-sense) می‌باشند که کاملاً بیماریزا بوده و برخی جهش‌ها ازنوع اشتباه (missense) و جهش‌های کوچک حذفی داخل قالب کاملاً بیماریزا نیستد مانند جهش‌های N543H و 2393 del 9، همچنین جهش از نوع Splice- site (محل برش) مانند: $1592+5G \rightarrow A$ (30). این جهش ها باید تحت بررسی‌های دقیق mRNA واقع شوند تا بیماریزا بودن آنها کاملاً ثابت گردد.

نقص ارثی آپولیپوپروتئین B (Familial defective apolipoproteinemia) جهش R3500Q علائمی مشابه FH ایجاد می کند، اما علائم خفیف‌تراز نقص در ساختمان گیرنده LDL-C است. مطالعات مشابه توسط Wang J و Huff E (2001) در ایالاتهای مختلف کانادا (آنتاریو و کبک) انواع دیگری از جهش‌ها را مشخص ساخته است. از جمله حذف‌های داخل چارچوب و حذف یک آمینواسیدی (هریک در اگزون‌های 2 و4) و دو حذف بزرگتر که باعث لغزش چارچوب میگردد (هریک در اگزون‌های 4 و 10)، پنج جهش با معنی اشتباه (C42R، A370T، T413M، L561P، E760D) و دو جهشSplice acceptor (هر یک در اینترون‌های 3 و 8) (31).

جهش‌های گزارش شده در جمعیت اسپانیا توسط Mozasp و CenarroA و همکاران (2000) بیانگر انواع زیر بوده است: پنج جهش با معنی اشتباه: (Q71E، S1562، E256K، N543H، و T 705I)، چهار جهش بی‌معنی (E10x،W(-18)x ، 518 ـ211 delG، C255X، Q136X)، شش جهش تغییر قالب (delG، 1045delC، 2085 del19، 2207 insT و 2393 del 9) و پنج جهش برش (Splicing) ($313+1G \rightarrow C$، $1061-8T \rightarrow C$، $1845+1G \rightarrow C$، $2140+5G \rightarrow A$، $2390-1G \rightarrow C$)، در ژن LDL_R تشخیص داده شده است (32).

Archive of SID

www.SID.ir

روش‌های مولکولی تشخیص جهش‌ها در ژن LDL_R:

روش‌های مولکولی حاضر برای تشخیص جهش ها بیشتر براساس بررسی جهش‌ها روی اگزون‌ها و نواحی مجاور اینترونی و پروموتورها می‌باشد که این بررسی ها با استفاده از تکنیک‌هایPCR-SSCP(High-sensitive Fluorescent Single-strand Conformation Polymorphism) (38) ، توالی رفرانس (chol3) و تعیین توالی مستقیم DNA (direct DNA sequencing) با توجه به اطلاعات قبلی روی جهش‌های شایع ژن LDLR انجام می شود (28).

همچنین بررسی روی ژن آپولیپوپروتئین B (apoB) از نظر جهش شایع (R3500Q) با تکنیکPCR-RFLP (Polymerase-Chain Reaction –Restriction Fragment Length Polymorphism) انجام می گیرد (34).

به طور خلاصه مجموعه ژن‌های زیر در روش‌های فوق مورد بررسی قرار می گیرد:

ژن LDL_R: روش Southern blot و PCR-SSCP .

ژن ApoB: برای جهش‌های شایع R3500Q و R3531C از روش Rabes etal استفاده می شود (35).

ژن ApoE: ژنوتیپ ApoE با روش PCR-resrtiction analysis و HhaI طبق روش شرح داده شده توسط Hixon و Vernier، انجام می‌شود(36).

ژن Apo AI: ناحیه پروموتور، اگزون‌ها و اگزون – اینترون ژن مذکور با روش PCR-SSCP انجام می‌شود (37).

ژن LCAT: ناحیه پروموتور، اگزون‌ها و اتصالات اگزون – اینتروژن در ژن مذکور با روش‌های PCR-SSCP و تعیین سکانس قطعات PCR (اگزون 4) توسط روش Recalde انجام می‌شود. تایید وجود جهش با هضم PCR-restriction enzyme digestion با آنزیم MSPI در اگزونو سپس الکتروفورز با ژل آگارز 3% (Nusiere) انجام می‌شود.

ژن GBA: این ژن از نظر فراوانی جزو شایع‌ترین جهش‌ها می باشد و جهش های N370S و L444P با روش PCR و هضم با آنزیم‌های محدود کننده XhoI و NCiI شناسایی می‌شود (روش Beutler و همکاران 1990 و Tsuji و همکاران 1987).**ژن LPL**: ناحیه پروموتور، اگزون‌ها و اتصالات اگزون اینترون این ژن با تعیین سکانس مستقیم در دستگاه ABIPRISM 3100 انجام می‌شود (روش Abi fadel و همکاران 2004). علیرغم روش معمول -SSCP PCR، در صورتیکه جهش‌های نقطه‌ای یا ورود/ حذف‌های کوچک نوکئوتید – بازی تشخیص داده نشود می‌توان از روش Southern-blot یا روش Long PCR برای بررسی وجود نوترکیبی‌های بزرگتر ژنی استفاده کرد. روش خاص دیگری که همراه با PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش الکتروفورز می‌باشد (28)

بحث

تعیین مرز قطعی برای تشخیص هیپرکلسترولمی فامیلی کار بسیار دشواری است به ویژه در کودکان و بالغین میانسال که مقادیر کلسترول وابسته به سن است، معیارهای بالینی با اینکه دارای ویژگی‌های بالایی در تشخیص هستند، اما از حساسیت اندکی برخوردار می‌باشند. به عنوان مثال گزانتوم تاندونی با وجود داشتن ارزش تشخیص بالا در FH، تمام بیماران را درگیر نکرده و اغلب تا اوخر سنین عمر پدید نمی‌آید(36). استفاده از معیارهای آزمایشگاهی، حساسیت تشخیص را افزایش داده ولی همچنان ویژگی را پایین نگه می‌دارد، حتی در اعضاء یک خانواده از مبتلایان به FH، تشخیص مبتنی بر سطح کلسترول به تنهایی باعث مخفی ماندن یا تشخیص اشتباه 20-10 درصد موارد می‌گردد. برعکس آزمایشهای ژنی نشان داده است که پس از شناختن نوع جهش در خانواده، دارای ویژگی و حساسیت 100 درصد برای تشخیص افراد حامل ژن بیماری در خویشاوندان فرد مبتلاست(37).

آزمایشهای مبتنی بر بررسی ژنی امکان تشخیص قطعی FH را در فرد بنیانگذار (proband's) فراهم کرده و به این ترتیب به عنوان "استاندارد طلائی" برای تشخیص FH مطرح است، معیارهای ارزشمند برای انجام آزمایشهای ژنی شامل علائم CHD قبل از سنین 45 در مردان و قبل از 55 در زنان، افزایش قابل توجه کلسترول سرم در هر سنی و تاریخچه فامیلی از هیپرکلسترولمی می‌باشند. برای تعیین افراد خانواده، بررسی تمام ناحیه کدکننده ژن LDL_R در فرد بنیانگذار توصیه

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شود چرا که جهش‌های همراهی کننده هیپرکلسترولمی در تمام ژن پراکنده هستند. پس از تشخیص اولیه نوع جهش، تعیین توالی می‌تواند محدود به ناحیه‌ای باشد که جهش در آن واقع است و به این ترتیب سایر افراد در معرض خطر خانواده شناسایی می‌شوند. به عنوان مثال تمام جهش‌های apoB مرتبط با هیپرکلسترولمی دریک ناحیه 200 نوکلئوتیدی واقع هستند (LDL_R Apo).انجام چنین آزمایشهایی از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است زیرا با تشخیص و درمان سریع هزینه‌های درمان داروئی و انجام اعمال جراحی کاهش می‌یابد(38).

از طرف دیگر احتمال دارد جهش‌های از نوع اتوزومال مغلوب به دلیل سایر جهش‌ها که باعث هیپرکلسترولمی فامیلی می‌شود، حتی با بررسیهای مولکولی معمول ممکن است تشخیص داده نشوند که دلیل آنکه نقش سایر ژن‌ها و تاثیر عوامل محیطی است (11).

بنابراین بروز این بیماری که به شکل اتوزومال غالب انتقال می‌یابد، به دلیل تنوع فنوتیپی به راحتی می‌تواند تحت تاثیر سن، جنس، رژیم غذایی و نوع جهش‌های LDL_R (هتروزیگوت مضاعف، هوموزیگوت یا هتروزیگوت ساده) و سایر ژن‌ها قرار بگیرد و تابلوی بالینی متنوعی نشان دهد حتی تفاوت در نوع جهش‌ها قادر است تابلوی درمانی را نیز تغییردهد (39)

تشخیص ژنی- مولکولی صحیح و درمان به موقع مبتلایان بهFH می‌تواند از بروز زودهنگام بیماری‌های قلبی – عروقی پیشگیری نماید. به عنوان مثال در مقایسه مبتلایان در اروپای شمالی، افراد مبتلا در اسپانیا دارای سطوح پایین تر سرمی LDL-C و شیوع کمتری از گزانتومای تاندونی هستند(40).

بنابراین تشخیص ژنتیکی دراین مورد حتی اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. تشخیص جهش‌های ژن LDL_R در گروههای خانوادگی، روش پیگیری در افراد مبتلا را تسهیل نموده و مشکلات همراه با الگوی لیپیدی متناقص مخصوصاً در افراد جوان را از بین می‌برد(41). حتی در بالغین استفاده از شاخص کلسترول تام برای بیماری خطای تشخیصی تا بیش از 40% را همراه دارد. تفاوت در نوع جهش ژن LDL_R همراه با فنوتیپ‌های متفاوت بیان ژنی، پاسخ به استاتین‌ها (39) و درصد خطربیماری های قلبی-عروقی (42) همراه است به این ترتیب با تشخیص DNA، امکان برقراری رابطه ژنوتیپی – فنوتیپی را برای تخمین بالینی بیماری و پیش آگهی نیز فراهم می‌کند (43).

این نوع تشخیص مبتنی بر دستجات ویژه جمعیتی با استفاده از نرم‌افزارهای ویژه تشخیص مولکولی امروزه در دسترس است. با استفاده از الگوریتم ویژه تمام اگزون‌ها و اینترون‌های واقع در لوکوس ژنی حتی با درنظر گرفتن برش‌های متنوع بررسی گردیده و امکان تفسیر جهشهای تغییر قالب، اگزونی- اینترونی یا مترادف‌های SNP را فراهم می‌کند با این نرم‌افزار امکان بررسی اهمیت بالینی پروتئین تولید شده یا ساختمان و عمل محل برش (splice site) ، ساختن‌ها پلوتیپ‌هائی از مجموعه SNPها درمقایسه با اطلاعات مربوط به فرد یا گروه در لوکوس موردنظر وجود دارد. همچنین کاربر قادر است واریانت‌های جدید تشخیص داده شده DNA را تفسیر نماید. بنابراین تشخیص جهش‌های جدید در جایگاه ژنی، که دارای هتروژنیسیتی اللی بالائی است بسیار آسان‌تر خواهد بود. تغییر هتروزیگوتی در جهش‌های del/ins در این روش برخلاف سیستم‌های مبنی بر جفت سازی (alignment-based software) که این نوع جهش‌ها را تشخیص نمی‌دهد، به راحتی امکان‌پذیر است.

در بررسی جهش‌های موجود در ژن LDL_R ، تنوع و اختلاف در شیوع منطقه‌ای انواع جهش‌ها ملاحظه می‌گردد (45 و 44) علاوه بر آن جهش‌هائی که منجر به بروز هیپرکلسترولمی فامیلی می‌گردد، منحصر به جهش در ژن LDL_R نمی‌باشد. از جمله نقص‌های موجود در ژن آپولیپوپروتئین B و E (apoB)، (apoE)، ($apoA_1$) ژن LCAT، GBA و LPL از آن دسته می‌باشند(46)، که جملگی قادربه تقلید علائم هیپرکلسترولمی فامیلی ناشی از جهش در ژن گیرنده LDL-C می‌باشند (47). از میان روش‌های وقت‌گیر و دشوار ژنتیک روشPCR-SSCP به نظر می‌رسد که روش مناسبی برای سکانس‌های اینترونی splice-site و ناحیه پروموتور از ژن LDL-C می‌باشد (48) و با آماده کردن سکانس‌های DNA برای اگزون‌ها می‌توان الگوهای واریانتی SSCP را شناسایی کرد (49)، گرچه آزمایشهای

Archive of SID

www.SID.ir

southern blotting و PCR برای قطعات طویلتر ژن جهت تشخیص نوترکیبی‌های بزرگ در این مورد ضروری است.

. در تمام جمعیت دنیا بیش از 700 جهش برای ژن LDL_R شناخته شده است، وهمانطوریکه قبلاً اشاره شد، روش منطقی بررسی و تشخیص نوع جهش‌ها در یک منطقه و جمعیت ویژه و سپس استاندارد کردن روش تشخیص مولکولی براساس منطقه شایع ژنی برای جهش مذکور می‌باشد. چرا که حتی گاهی اوقات بر اثر تاثیر بنیانگذار (Founder) و مهاجرت دسته جمعی و افزایش جمعیت در یک زیر جمعیت خاص، نوع جهش از انواع شایع می‌تواند متفاوت‌ترباشد. از طرفی در تمام جهش‌های اتوزومال غالبی که از ژن گیرنده LDL_R به ارث می‌رسد، حتی در هتروزیگوت‌ها، بیماری به شکل حاد نبوده و دارای اشکال بالینی خفیف تا متوسط است. تشخیص مولکولی جهش‌های بی‌ضرر در این ژن با انواعی که منجر به بروز بیماری می‌شوند، نیز کار ساده‌ای نیست. همانطورکه قبلا نیز ذکر گردید، طبق مطالعات انجام شده، جهش‌های انوع نوترکیبی، تغییرقالب و بی‌معنی بیماری‌زا بوده ولی بیماریزائی کامل درجهش‌های با معنی اشتباه و جهش‌های کوچک بدون تغییر قالب دیده نمی‌شود.

بنابراین بررسیهای ژنتیک می‌تواند دربهبود تشخیص بالینی افراد مشکوک به FH بسیار مفید واقع شده و تعمیم پزشک برای استراتژی درمانی را تقویت نماید (50). اگر در آزمایشات ژنتیکی نشان دادن وجود جهش در ژن گیرنده LDL-C موفقیت‌آمیز نباشد، در این صورت باید سایر جهش‌های اتوزومال غالب که باعث هیپرکلسترولمی می‌شوند، مدنظر واقع شوند از جمله جهش در ژن آپولیپوپروتئین B که بیماری FH را از نظر بالینی تقلید می کند. اخیراً یک لوکوس سوم عمده در کروموزوم شماره 1 نیز مرتبط با بیماری تشخیص داده شده است گرچه ژن مسئول آن دقیقاً تشخیص داده نشده است (51).

نتیجه گیری

در مجموع تشخیص ژنتیکی FH برای تشخیص زودرس افراد خانواده فرد مبتلا به ویژه درافراد جوان اهمیت بسیاری دارد که در عین حال مقادیر کلسترول تام در آنان ممکن است بین افراد مبتلا و غیر مبتلا هم‌پوشانی نشان دهد. پروتکل سه مرحله‌ای تشخیص ژنتیکی (بررسی ژن درapo-B، بررسی نوترکیبی‌های بزرگ و جهش‌های نقطه‌ای پروتکل کوچک در ژن LDL-R)، قادر به تشخیص حدود 84% از جهش درژن مربوطه است درمقادیر پایه لیپیدی در بیمارانی که جهش‌های خنثی داشته‌اند مقادیر HDL-C پائینتر بوده است. به علاوه درجه پاسخ‌دهی به درمان با استاتین‌ها وابسته به نوع جهش‌های موجود در بیمار دارد. افرادیکه جهش‌های خنثی نشان می‌دهند (عدم تولید گیرنده به طورکامل)، پاسخ محدودی به دارو نشان می‌دهند و کاهش اندکی در LDL-C آنها بدون افزایش قابل توجه در HDL-C دیده می‌شود. ولی با اینحال تفاوت در نوع پاسخ در ناقلینی که با همان جهش‌ها هم ملاحظه می‌شود و تاثیر عوامل اضافی را نشان می‌دهد. با توجه به افزایش خطر زودرس بیماریهای عروق کرونر در بیماران FH و نیز توسعه روشهای مولکولی جهت شناسائی مستقیم جهش‌های ژنی LDLR ، تشخیص مولکولی این بیماران در اوایل زندگی، و به دنبال آن مشاوره و تغییرات در شیوه زندگی و اقدامات درمانی مناسب، می تواند بار مرگ و میر ناشی از اختلالات قلبی و عروقی را کاهش دهد.

به همین دلایل به نظر نویسندگان اجرای آزمایشات مولکولی برای تشخیص قطعی FH و پیش‌آگهی درمان به شکل روتین در آزمایشگاههای بالینی‌قویاً توصیه می گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1-Livy A, Hean Lye S. *Familial Hypercholesterolemia in Asia.* OMICS Res 2011; **1**(1): 22-31.

2-Castro-Orós I D, Pocoví M, Civeira F. *The genetic basis of familial hypercholesterolemia: inheritance, linkage, and mutations.* The Application of Clinical Genetics 2010; **3**: 53–64.

3-Dolatkhah H, Rahbani-Nobar M, Parvizi R, Eidari G R, Nourazarian M. *The value of highly sensitive CRP combined with LDL-C/HDL-C ratio in detection of patients at risk of coronary heart disease.* The 9th Iranian Congress of Biochemistry & The 2nd International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Oct. 29- Nov. 1, 2007.

4-Peter O. Kwiterovich Jr. *Clinical Implications of the Molecular Basis of Familial Hypercholesterolemia and Other Inherited Dyslipidemias.* Circulation. 2011; 123:1153-1155.

5-Darbin A, Pezeshkiyan M, Afrasiyabi A, Dolatkhah H, Vatankhah A M, Javadi L, Rashidi M R, Nouri M. *Effect of a High-Cholesterol Diet on Antioxidative/Prooxidative Balance in Rabbits.* Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences. 2011; 33(2): 37-42.

6-Movahedian A, Sajjadi S E, Ahmadi M. *Lipid Lowering Effect of Ethanolic Extract of Aerial Parts of Peucedanum pastinacifolium Boiss and Hausskn in Hypercholesterolemic Rats.* Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2009; 8 (4): 301-306.

7-Shargh SH, Yeghaneh MA, Mohades SM, Ayetollahi AA, Khalaj E, Khandan Del A. *Evaluation of Cholesterol Panel Changes in Fish Consumers in the West of Mazandaran Province, Iran.* Medical Laboratory Journal. 2010; 4(1): 13-19.

8-Sajjadi S E, Movahedian A, Yektaian A. *Antihyperlipidemic effect of hydroalcoholic extract, and polyphenolic fraction from Dracocephalum kotschyi Boiss.* Pharmaceutica Acta Helvetiae. 1998; 73: 167–170.

9-Movahedian A, Ghannadi A, Vashirnia M. *Hypocholesterolemic effects of purslane extract on serum lipids in rabbits fed with high cholesterol in rabbits fed with high cholesterol levels.* International Journal of Pharmacology. 2007; 3(3): 285-289.

10-Sibley C, Neil S, Stone I. *Familial hypercholesterolemia: a challenge of diagnosis and therapy.* Cleveland Clinic Journal of Medicine. 2006; 23(1): 57-65.

11-Palacio C H, Harring TR, Nguyen N TT, Goss JA, O'Mahony CA. *Homozygous Familial Hypercholesterolemia.* Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Transplantation. 2011; Article ID 154908: 1-5.

12-Melissa A.Austin, Carolyn M.Hutter etal. *Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a huge E association review.* American Journal of Epidemiology. 2003; 160(5): 421-429.

13-Pernette R.W, Marcel B. Twichler. *Elevated Remnant-like particles in heterozygous familial hypercholesteromia and response to Statin Therapy.* Circulation Journal of the American Heart Association. 2002; 106: 1-6.

14-Mahrooz A, Nouri M, Rashidi MR, Aslanabadi N, Qujeq D, Azari A. *Paroxonases and arylesterase activities of human serum paroxonases in coronary artery disease.* Journal of Semnan University of Medical Sciences. 2008; 10(1): 1-6.

15-Dolatkha H, Somi M H, Fattahi E. *Cigarette Smoking and DNA damage*.1th edition, Germany, LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG (2011-11-29); 20-22.

16-Dolatkhah H, Rahbani-Nobar M, Nourazarian A R, Nourazarian M, Mojtabaii-Motlag S, Mortazavy M. *Effect of omega 3 fatty acids on serum lipid profile and malondialdehyde in patients with end stage renal disease under regular haemodialysis.* V. International Nutrition and Dietetics Congress, Hacettepe University, Ankara, TURKEY. APRIL 12-15, 2006; P111.

17-Dolatkhah H, Rahbani-Nobar M, Fattahi E, Ansari M, Mirza-Aghazadeh A, Eftekhari-Vash L, Fakhrjo A, Bahrami A. *Evaluation of glycemic control, gastric juice nitric oxide and oxidative stress in diabetic patients infected by Helicobacter pylori.* Journal of Medical Genetics and Genomics. 2011; 3(1): 1 – 6.

18-Dolatkhah H, Babaee S, Rahban-Nobar M. *Diabetes Mellitus and Helicobacter Pylori*.1th edition, Germany, LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG (2011-09-27); 32-35.

19-Rahbani-Nobar M, Bahrami A, Norazarian M, Dolatkhah H. *Correlation between serum levels of cholesterol and homocysteine with oxidative stress in hypothyroid patients.* Int J Endocrinol Metab. 2004; 2:103-109.

20-Nouri M, Zahraei M, Pezeshkian M, Afrasiabi A, Mahboob SA, Samadikhah J and et al. *Effect of dietary regimen and aerobic exercise on the level of lipid peroxidation and antioxidant vitamins in patients with coronary heart disease.* Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences. 2000; 46(4)

21-Jalili Shishavan H, Sadeghi Shoja H, Rahbani M, Nouri M. *Study of plasma lipid and lipoprotein levels in 52 hypertensive patients.* Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences. 1995; 29(25)

22-Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection. Evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment Panel III). *JAMA* 2001 May 16; 285(19): 2486-97(National Guidelines clearing house (NGC) summery (Hyperlipidemia in Primary care).

23-Gatreh Samani K, Nouri M, Rahbani-Nobar M, Hashemzadeh M, Farrokhi A, Darabi-Amin m. *Investigation on two polymorphisms effective on HDL-C concentration in patients with coronary artery disease using restriction fragment length polymorphism.* Medical Journal of Shahr-e-Kord University of Medical Sciences. 2008; 10(2)

24-Rahbani-Nobar M, Nouri M. *HDL-Cholesterol and its subfractions in MI.* Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences. 1989

25-Nouri M, Darabi M, Rahimipour A, Rahbani-Nobar M, Aslanabadi N, Darabi M, Ghatresamani K. *Fatty acid composition of HDL phospholipids and coronary artery disease.* Journal of Clinical Lipidology. 2009; 3(1): 39-44.

Archive of SID

www.SID.ir

26-Ghatresamani K, Nouri M, Rahbani-Nobar M, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Farrokhi E, Darabi-Amin M. *1405V and -629C/A polymorphisms of the Cholesteryl Ester Transfer Protein Gene in patients with coronary artery disease.* Iran Biomed J. 2009; 13(2): 103-108.

27-Darabi M, Abolfathi AA, Nouri M, Kazami A, Ostadrahimi A, Rahimipour A, Darabi M, Ghatresamani K. *Cholesteryl Ester Transfer Protein 1405V polymorphism influences apolipoprotein A-I response to a change in dietary fatty acid composition.* Horm Metab Res. 2009; 41(7): 554-558.

28-Karima Ait chihab. *Familial hypercholesterolemia associated with severe hypoalphalipoproteinemia in a Moroccan Family.* Journal of Genetics. 2007; 86(2): 159-163.

29-F.Van Leuven, E.Thiry etal. *Sequencing of the coding exons of the LRP1 and LDLR genes on individual DNA samples reveals novel mutations in both genes.* Atherosclerosis. 2000; 154: 567-577.

30-Jansen HK, Jansen LG et al. *Spectrum of LDL receptor gene mutations in Denmark: Implication for molecular diagnostic strategy in heterozygous Familial hypercholesterolemia.* Atherosclerosis. 1999; 146(2):337-44.

31-Wang J, huff E, et al. *Low density lipoprotein receptor (LDLR) gene mutations in Canadian subjects with Familial hypercholesterolemia, but not of French descent.* Human Mutation. 2001; 18(4): 359-364.

32-Mozas P, Cenarro A, etal. *Mutation analysis in 36 unrelated Spanish subjects with Familial hypercholesterolemia: identification of 3 novel mutations in the LDL receptor gene.* Human Mutation. 2000; 15(5): 483-4.

33-Chakir k, JuMMetal. *Two novel low- density lipoprotein receptor gene mutations (E397X and 347delGCC) in St.Petersburg Familial hypercholesterolemia.* Mol Genet Metab. 1998; 65(4):311-4.

34-Pang QF, Wang Y etal. *Screening for low-density lipoprotein receptor gene mutations in Familial hypercholesterolemia chiness.* Zhonghua Nei Ke Zazhi. 2004; 43(a): 665-8.

35-Rabe` s JP, Varret M, Saint-Jore B, Erlich D, Jondeau G, Giraudet P, et al. *Familial ligand-defective apolipoprotein B-100: simultaneous detection of the Arg3500CPÆGln and Arg3531CPÆCys mutations in a French population*. Hum Mut, 1997; 10:160–163.

36-Hixson J E and Vernier DT. *Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI.* Journal of Lipid Research. 1990; 31: 545-548.

37-Recalde D, Cenarro A, García-Otín AL, Gómez-Coronado D, Civeira F, Pocoví M. *Analysis of apolipoprotein A-I, lecithin:cholesterol acyltransferase and glucocerebrosidase genes in hypoalphalipoproteinemia.* Atherosclerosis. 2002 Jul;163(1):49-58.

38-Mozas P, Castillo, et al. *Molecular characterization of Familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in LDLR.* Human Mutation. 2004; 24(2): 187-192.

39-Mahadev D, etal. *Aortic valve replacement and coronary bypass in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia.* Ind J Thorac Cardiovasc Surg. 2007; 23:36-38.

40-Correlagn (2006) "*Familial hypercholes terolemia and early-onset coronary heart disease- anoverview" Moleculan Diagnostics for Genes that matter*", online magazine 11/06: Pag 1-3.

41-Robert Garren."*Genetic Screening for familial hypercholesterolemia*",Proritising summary (www.horizonscanning.gov.au). (2007); vol(15), (3):1-9.

42-Vuorio A, Kuoppala J, Kovanen PT, Humphries SE, Strandberg T, Tonstad S, Gylling H. *Statins for children with familial hypercholesterolemia.* The Cochrane Collaboration. 2011;Published by JohnWiley & Sons, Ltd.

43-Famihal hypercholesterolemia, online Medical Eneyclopedia Medline Plus, A service of the U.S.NATIONAl LIBRARY of MECNE and the NATIONAL institute of health. human disease", *TRENDS in Genetics* 2007**;** 17(9):502-510

44-Fouchier SW, Kastelein JJ, Defesche JC. *Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in the Netherlands.* Human Mutation. 2005; 26:550-556.

45-Goldberg A C, Hopkins P N, Toth P P, Ballantyne C M, Rader D J, Robinson J G, et al. *Familial Hypercholesterolemia: Screening, diagnosis and management of pediatric and adult patients.* Journal of Clinical Lipidology. 2011; 5: 133–140.

46-Huijgen R, Stork ADM, Defesche JC, Peter J, Alonso R, Cuevas A, Kastelein JJP, Duran M, Stroes ESG. *Extreme xanthomatosis in patients with both familial hypercholesterolemia and cerebrotendinous xanthomatosis.* Clin Genet. 2012; 81: 24–28.

47-Nouck Ma, koster W, etal. *Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in German patients with familial hypercholesterolemia*. Human mutation. 2001; 18(2): 165-166.

48-Zakharova FM, Damgaard D, etal. *Familial hypercholesterolemia in St-Petersburg: the known and novel mutations found in the low density lipoprotein receptor gene in Russia.* BMC Medical Genetic. 2005; 8: 6-16.

49-Cenarro A, Jensen HK etal. *Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in Spanish patients with Familial hypercholesterolemia.* Mutations in brief no.135. On line, Human *Mutations* 1998; 11(s): 413-418.

50-Civeira, F. *International Panel on management of familial hypercholesterolemia, guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia*. Atherosclerosis 2004; 173:55-68.

51-El Messal M, Ait chohab k, etal. *Familial hypercholesterolemia in Morocco: first report of mutations in the LDL receptor gene.* Journal of Human Genetics. 2003; 48(4):199-203.

52-Zakharova FM,etal. *Familial hypercholesterolemia in st-Petersburg, the known and novel mutations found in the low density lipoprotein receptor gene in Russia.* BMC Med Genetics. 2005; 8: 6-12.

53-Reich DE and Lander ES. *On The allelic Spectrum of human disease.* TRENDS in Genetics. 2001; 17(9): 502-510.

54-Dawn Mahube Tladi. *Effects of acute exercise on Plasma Lipids and Lipoproteins of obeses women.* Ph.D Thesis, the Florida state university, college of Human sciences. 2006.

Archive of SID

www.SID.ir