Journal of Gorgan University of Medical Sciences

e-ISSN: 2008-4080 p-ISSN: 1562-4765

2022 / Vol 23 / No 4

OPEN ACCESS

Original Paper

Common Mutations in *LDLR* Gene in Familial Hypercholesterolemia

Fatemeh Vali Mohammadi Rahmani (M.Sc)*[1], Hossin Rasi (Ph.D)[2], Vajiheh Zarrinpour (Ph.D)[3]

1 M.Sc in Biology - Genetics, Department of Faculties of Basic Sciences, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran. 2 Assistant Professor, Department of of Biology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. 3 Assistant Professor, Department of of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Familial hypercholesterolemia (FH) is one of the most common inherited familial diseases that cause lipid accumulation in tendons and arteries by increasing the level of low density plasma lipoprotein (LDL). The main cause of FH is a mutation in the low-density lipoprotein receptor (*LDLR*) gene. This study was performed to evaluate common mutations in *LDLR* gene in FH patients.

Methods: This descriptive study was performed on 100 patients with suspected familial hypercholesterolemia referred to Sepehr laboratory according to the Simon Broom international standard in Karaj city, Iran during 2015. After complate the questionnaire form and drawing the family tree, it was found that 17 of them had a history of disease in at least one of the first degree relatives. The presence of changes was investigated using PCR-SSCP method, and after identifying the suspected cases direct DNA sequencing was performed.

Results: Among of 17 patients with a history of FH disease, 13 patients had a heterozygote mutation in the LDLR gene. Mutations included: c.97C>T, c.445G>T, c.651-653 (DEL3), c.652-654 (DEL3), c.682G>T, c.925-931 (DEL7), c.936-940 (DEL5), c.986G>T, c.2054C>T, c.2177C>T and c.313+1G>A. Four patients did not have mutations in their LDLR gene. In two patients the common polymorphism c.1959T>C was identified.

Conclusion: The *LDLR* gene was involved in the development of FH in the study population. However, another gene or locus may be involved in the outbreak of this disease in the studied population.

Keywords: Familial hypercholesterolemia, LDL, Mutation, *LDLR*

***Corresponding Author:** Fatemeh Vali Mohammadi Rahmani (M.Sc), E-mail: farnazrahmani33@yahoo.com

Received 15 Mar 2021
Revised 6 Sep 2021
Accepted 11 Sep 2021
Published online 12 Mar 2022

Cite this article as: Vali Mohammadi Rahmani F, Rasi H, Zarrinpour V. [Common Mutations in *LDLR* Gene in Familial Hypercholesterolemia]. J Gorgan Univ Med Sci. 2022; 23(4): 89-94. [Article in Persian]

© The author(s)

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان

زمستان ۱۴۰۰ / دوره ۲۳ / شماره ۴ (پی در پی ۸۰)

دارای رتبه علمی -پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

e-ISSN: ۲۰۰۸-۴۰۸۰ p-ISSN: ۱۵۶۲-۴۷۶۵

با دسترسی آزاد

تحقیقی

ارزیابی مولکولی جهش‌های شایع در ژن گیرنده LDL در مبتلایان به هایپرکلسترولمی فامیلی

فاطمه ولی محمدی رحمانی*[۱]، دکتر حسین راثی[۲]، دکتر وجیهه زرین پور[۳]

[۱] کارشناس ارشد زیست شناسی – ژنتیک، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. [۲] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران. [۳] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: *هایپرکلسترولمی خانوادگی (Familial hypercholesterolemia: FH) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های ارثی است که با افزایش سطح لیپوپروتئین با دانسیته کم (Low Density Lipoprotein: LDL) پلاسما، باعث تجمع لیپید در تاندون‌ها و رگ‌ها می‌شود. اصلی‌ترین علت ابتلا به این بیماری، جهش در ژن گیرنده لیپوپروتئین با دانسیته کم (Low Density Lipoprotein Receptor: LDLR) است. این مطالعه به منظور ارزیابی مولکولی جهش‌های شایع در ژن گیرنده LDL در مبتلایان به هایپرکلسترولمی فامیلی انجام شد.*

روش بررسی: *این مطالعه توصیفی روی ۱۰۰ بیمار مشکوک به هایپرکلسترولمی خانوادگی مراجعه کننده به آزمایشگاه سپهر شهرستان کرج طی سال ۱۳۹٤ بر اساس معیار جهانی Simon Broom انجام شد. پس از پرکردن پرسشنامه و رسم شجره نامه مشخص گردید در ۱۷ نفر سابقه بیماری حداقل در یکی از بستگان درجه یک وجود داشت. با استفاده از روش PCR-SSCP وجود تغییرات مورد بررسی قرار گرفت و پس از شناسایی موارد مشکوک توالی یابی مستقیم DNA انجام گردید.*

یافته‌ها: *از ۱۷ بیمار دارای سابقه بیماری هایپرکلسترولمی، در ۱۳ بیمار جهش در ژن LDLR به صورت هتروزیگوت مشاهده شد. جهش‌ها شامل c.97C>T، c.445G>T، c.651-653(DEL3)، c.652-654(DEL3)، c.682G>T، c.925-931(DEL7)، c.936-940(DEL5)، c.986G>T، c.2054C>T,c.2177C>T و c.313+1 G>A بودند. ٤ بیمار فاقد جهش در ژن LDLR خود بودند. در ۲ بیمار پلی مورفیسم شایع c.1959T>C شناسایی گردید.*

نتیجه‌گیری: *ژن LDLR در ایجاد FH در جمعیت مورد مطالعه نقش داشت. با این حال احتمالاً ژن یا لوکوس دیگری در شیوع این بیماری در جمعیت مورد مطالعه دخیل است.*

واژه‌های کلیدی: *هایپرکلسترولمی فامیلی ، LDL ، جهش ، LDLR*

* نویسنده مسؤول: فاطمه ولی محمدی رحمانی ، پست الکترونیکی farnazrahmani33@yahoo.com

نشانی: دامغان، میدان سعدی، بلوار چشمه علی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، تلفن ۰۲۳-۳۵۲۲۵۰۴۵، نمابر ۳۵۲۲۵۰۲۴

وصول ۱۳۹۹/۱۲/۲۵ اصلاح نهایی ۱۴۰۰/۶/۱۵ پذیرش ۱۴۰۰/۶/۲۰ انتشار ۱۴۰۰/۱۲/۲۱

مقدمه

هایپرکلسترولمی خانوادگی (Familial hypercholesterolemia: FH) یک بیماری ژنتیکی است که دارای الگوی توارث اتوزومال غالب است. این بیماری به دو شکل FH هتروزیگوت و FH هموزیگوت نمایان می‌شود که شیوع هتروزیگوتی آن یک نفر در هر ۵۰۰ نفر و شیوع هموزیگوتی آن یک نفر در هر یک میلیون نفر در اکثر جمعیت‌ها است. هایپرکلسترولمی خانوادگی هتروزیگوت یک بیماری شایع ژنتیکی است.[۱-۴] بیماری FH به طور قابل ملاحظه‌ای با افزایش کلسترول سرم در ارتباط است.[۵] در جوامع اروپایی احتمال شیوع FH ۲درصد گزارش شده است. به دلیل نتایج حاصل از اثر موثر بر روی جمعیت‌های خاص، شیوع مبتلایان به FH هتروزیگوت، دارای درصد شیوع بالاتری هستند.[۶و۷] از جمله تظاهرات بالینی بیماری FH می‌توان به افزایش سطح LDL-C پلاسما، تاندون گزانتوما، حلقه قرنیه و ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی (CHD) اشاره کرد.[۱] ژن‌های *LDLR*، APOB-100 و PCSK9 در بروز FH موثر هستند که در بین آنها بیشترین نقش را *LDLR* (۱/۵۰۰ بسته به جهش) پس از آن APOB-100 (۵ تا ۷ درصد) و در نهایت PCSK9 (۲درصد) ایفا می‌کنند.[۸و۹] فرم ارثی افزایش LDL، بیماری هایپرکلسترولمی است. سطح لیپوپروتئین با دانسیته کم

(Low Density Lipoprotein: LDL) بیانگر خطر بیماری‌های قلبی عروقی است و افزایش غلظت آن با افزایش مقدار تجمع آترواسکلروزیس در دیواره سرخرگ‌ها در کوتاه مدت ارتباط زیادی دارد. در نتیجه باعث جدا شدن ناگهانی پلاک‌ها و بروز لخته در طول سرخرگ‌ها و در نهایت منجر به سکته و سایر بیماری‌های وابسته به رگ‌ها می‌شود.[۱۰و۱۱] LDL آخرین باقیمانده VLDL بوده که دارای بیشترین مقدار کلسترول است و تنها آپولیپوپروتئین مرتبط با آن Apo-B100 است.[۱۲و۱۳] لیپوپروتئین با دانسیته کم (Low Density Lipoprotein Receptor: *LDLR*) یک پروتئین موزاییک ۸۳۹ اسید آمینه‌ای است که اندوسیتوز LDL های غنی از کلسترول را میانجیگری می‌کند. *LDLR* یک گیرنده گلیکوپروتئین سطحی سلولی است که Apo B-100، پروتئینی که در لایه‌های بیرونی فسفولیپید LDL جداسازی می‌شود را دریافت نموده و سطح پلاسمای کلسترول خون را تنظیم می‌کند.[۱۴-۱۶] mRNA *LDLR* یک پروتئین ۱۶۰ کیلودالتونی که متشکل از ۸۶۰ اسیدآمینه است را کد می‌کند. پروتئین *LDLR* از پنج دومین عملکردی از جمله دومین اتصال لیگاند، پیش ساز شبه فاکتورهای رشد اپیدرمال (EGF)، جایگاه اتصال کربوهیدرات (o-لینک)، ناحیه داخل غشایی، دم سیتوپلاسمی تشکیل شده است.[۱۷] در انسان پروتئین *LDLR* به وسیله ژن *LDLR* کد می‌شود. ژن *LDLR* متعلق به یک خانواده سوپر ژن، روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۹ قرار دارد که به طول تقریبی ۴۵ کیلو باز است. این ژن از ۱۸ ناحیه اگزونی و ۱۷ ناحیه اینترونی تشکیل شده است. بیش از ۲۰۰۰ جهش مختلف در ژن *LDLR* از جمله missens، splice site و حذف‌های بزرگ شناسایی شده که این تعداد در حال افزایش است. جهش‌های موجود براساس نوع فنوتیپ FH به ۵ دسته تقسیم می‌شوند که شامل سنتز *LDLR*، اتصال *LDLR* به سطح سلول، تجمع *LDLR* در حفره‌هایی با پوشش کلاترین، درونی شدن گیرنده، توانایی LDL برای اتصال به لیگاند هستند.[۱۸و۱۹] عملکرد طبیعی گیرنده کبدی LDL برای نگه‌داشتن غلظت پلاسمایی LDL-C ضروری است. جهش‌های پدید آمده در ژن کد کننده پروتئین گیرنده LDL-C منجر به بروز این اختلال شایع وراثتی کلاسیک به صورت هتروزیگوت و هموزیگوت در انسان می‌شود.[۲۰-۲۲] تاکنون روش‌های زیادی از جمله هترو دوپلکس آنالیز، ساترن بلات، RFLP ، DGGE ، SSCP و PCR-SSCP و توالی‌یابی مستقیم DNA برای آنالیز جهش‌های مرتبط با FH مورد استفاده قرار گرفته است. با روش PCR-SSCP توالی‌های خاصی در ژن *LDLR* تکثیر شده و سپس تغییرات مشخص می‌شوند. همچنین این روش قادر به شناسایی جهش‌های ناشناخته و جدید نیز هست و با روش توالی‌یابی مستقیم می‌توان نتایج را تایید نهایی کرد. این مطالعه به منظور ارزیابی تغییرات در اگزون‌های ۲، ۴، ۶، ۷، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و اینترون ۳ ژن *LDLR* در ارتباط با بیماری هایپرکلسترولمی خانوادگی در جمعیت کرج و با استفاده از آنالیز PCR-SSCP و توالی‌یابی مستقیم DNA انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی روی ۱۰۰ بیمار مشکوک به هایپرکلسترولمی خانوادگی مراجعه کننده به آزمایشگاه خصوصی سپهر شهرستان کرج طی سال ۱۳۹۴ انجام شد.

مطالعه مورد تایید (شماره ۱۱۹۶۲) حوزه معاونت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان قرار گرفت. از بیماران رضایت نامه کتبی آگاهانه شرکت در مطالعه اخذ شد.

از تعداد ۱۳۴۸ بیمار مراجعه کننده به آزمایشگاه تشخیص طبی سپهر کرج، تعداد ۵۲ مرد و ۴۸ زن مشکوک به FH با میانگین سنی ۴۷/۴ بر اساس مقدار کلسترول کلی بیش از ۲۰۰ mg/dl و LDL بیش از ۱۵۰ mg/dl با نمونه‌گیری وریدی، وارد مطالعه شدند.

معیارهای عدم ورود به مطالعه شامل ابتلا به هایپرتیروئیدیسم، دیابت، بیماری کبدی و کلیوی بودند.

اطلاعات دموگرافیکی و بالینی بیماران پس از اخذ رضایت‌نامه از آنها از طریق پرسشنامه جمع‌آوری گردید. سپس میزان ۵ میلی‌لیتر خون ناشتا برای آزمایشات بیوشیمیایی شامل کلسترول، TG، LDL و HDLگرفته شد و با روش‌های بیوشیمیایی و با استفاده دستگاه HITACHI اندازه‌گیری گردید. همچنین مقدار ۲ میلی‌لیتر خون در لوله آزمایش محتوی EDTA ۰/۵ مولار برای آزمایشات مولکولی گرفته شد. DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت سینا ژن استخراج گردید و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر (Cary 60 USA) مقدار و کیفیت DNA استخراج شده مشخص شد. پرایمرهای F و R برای پرموتر و اگزون‌های ۱۵،۱۴،۱۳،۷،۶،۴،۲ و اینترون ۳ ژن *LDLR* توسط پایگاه اینترنتی NCBI، BLAST شد و مورد تایید قرار گرفت و با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7 طراحی گردید (جدول یک).

مواد و مقدار مورد نیاز برای واکنش PCR شامل ۱۲/۵ میکروگرم Master Mix، Forward Primer (10 PMol) 1 µl، Riverse Primer (10 PMol) 1 µl و Water (D.D.W) 7.5 µl و DNA 3 µl بودند. انجام واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Germany) با شرایط دمایی ۳۶ سیکل مشتمل بر دمای واسرشت شدن ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال و دمای ساخت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه صورت گرفت. برای بررسی کیفیت تکثیر قطعات مورد نظر، محصولات PCR با نسبت ۱:۴ با برموفنول بلو مخلوط شدند و سپس بر روی ژل آگارز ۲درصد بارگذاری گردید. سپس برای انجام SSCP، ۳ µl از محصولات PCR را با ۳ µl از SSCP-day (فرمامید ۹۵ درصد، هیدروکسید سدیم ۱۰ mM، برومونفل بلو ۰/۰۵ درصد و گزیلین

جدول ۱ : توالی پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش PCR

شماره اگزون	توالی	اندازه (bp)	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)
2	F: 5' AGA CAC AGG AAA CGT GGT CA3' R: 5' ATG CAT ATC ATG CCC AAA GG 3'	۲۲۱	۶۰
3	F: 5´-CTCCCAAAGTGCTGGGATTA-3´ R: 5´-AAGGCAGGGCCACACTTAC-3´	۲۳۶	۶۲
4A	F: 5' GTG GTC TCG GCC ATC CAT CC 3' R: 5' AGC CAT CTT CGC AGT CGG GG 3'	۲۴۳	۶۷
4B	F: 5' CCC CCA GCT GTG GGC CTG CG 3' R: 5' CGC CCC CAC CCT GCC CCG CC 3'	۲۳۸	۶۷
6	F: 5' TGA ATG AGT GCC AAG CAA AC 3' R: 5' CTC CCC ACA AAC TCT GCC A 3'	۲۳۴	۶۰
7	R: 5' GGG AGG TGG AGG TTG TAA TG 3' F:5'AGT CCC ACC CGG AAA TCA C 3 '	۲۳۱	۶۰
13	F: 5´-TCCCAGTGTTTAACGGGATT-3´ R:5´-TCCACAAGGAGGTTTCAAGG-3	۲۳۷	۶۱
14	F: 5' TGG AAA TTT CTG GAA TCT TCT G 3' R: 5' CAG AAA CAA GGC GTG TGC 3'	۲۴۸	۶۰
15	F: 5´-ACGTGGCACTCAGAAGACG-3´ R: 5´-TAGGGAGGGCCCAGTCTTTA-3	۲۲۸	۵۲

جدول ۲ : شرایط PCR-SSCP برای اگزون ها و اینترون ۳

نوع محصول	اگزون ۲	اگزون ۴	اگزون ۶	اگزون ۷	اگزون ۱۳	اگزون ۱۴	اگزون ۱۵	اینترون ۳
دما (درجه سانتی گراد)	دمای اتاق	دمای اتاق	دمای اتاق	دمای اتاق	۸	دمای اتاق	دمای اتاق	دمای اتاق
ولتاژ (V)	۱۳۰	۱۳۰	۱۳۰	۱۳۰	۱۵۰	۱۳۰	۲۸۰	۱۳۰
آمپر (mA)	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸
زمان (ساعت)	۶	۶	۶	۶	۱۴	۶	۸	۶

۰/۰۵ درصد) مخلوط کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم و برای جلوگیری از اتصال مجدد رشته‌های DNA، نمونه‌ها بلافاصله به مدت ۵ دقیقه داخل یخ قرار گرفتند. حال برای تعیین ژنوتیپ از الکتروفورز با ژل آکریل آمید ۸درصد غیردناتوره استفاده شد (جدول ۲). با بررسی مقالات مختلف و انجام چندین بار تکرار آزمایش، روش SSCP بهینه سازی گردید.

پس از انجام الکتروفورز رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام شد. پس از تجزیه و تحلیل الگوهای باندهای پدید آمده محصولات PCR-SSCP بر روی ژل، نمونه‌هایی که دارای الگوی غیرنرمال بودند؛ توالی یابی مستقیم شدند. تعیین توالی با روش سنگر و تفسیر نتایج آن توسط برنامه CodonCode Aligner در مرکز ژن فن‌آوران انجام شد. در نهایت آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار Epi-Info انجام گردید.

یافته‌ها

از تعداد ۱۰۰ نمونه‌ای که برای آنها تست‌های بیوشیمیایی انجام گردید؛ تعداد ۱۷ نمونه به FH مبتلا بودند. با انجام PCR-SSCP تعداد ۱۱ نوع جهش در توالی *LDLR* شناسایی شد. همچنین دو مورد دارای پلی مورفیسم c.1959T>C در توالی *LDLR* بودند که یک مورد مبتلا به هایپرکلسترولمی با سابقه خانوادگی و دیگری بدون سابقه خانوادگی بود (شکل یک).

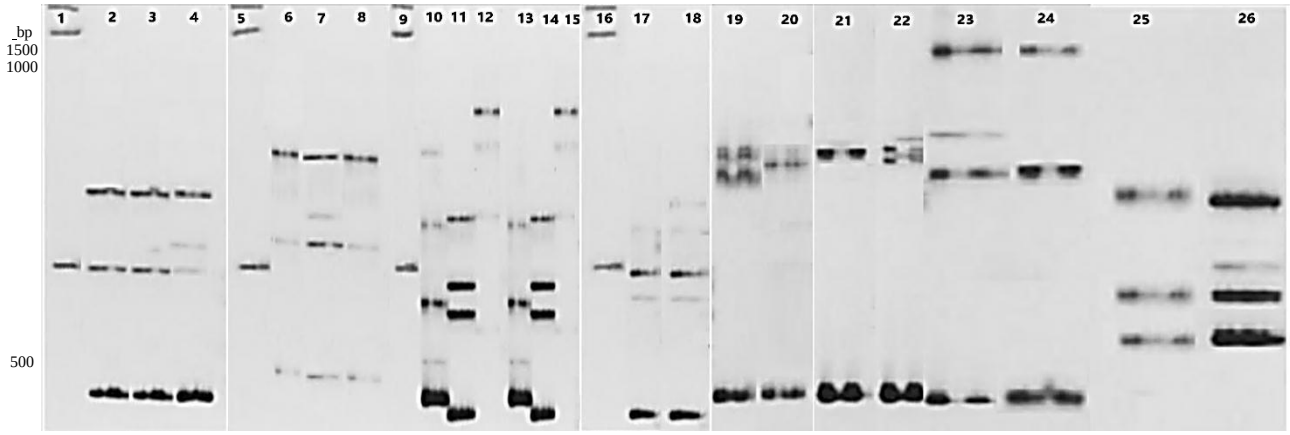
پس از انجام PCR-SSCP نمونه‌هایی که دارای الگوی غیرنرمال بودند، برای شناسایی جهش‌ها، تعیین توالی شدند و با استفاده از تکنیک توالی یابی DNA تایید شدند (جدول ۳).

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، از بین ۱۰۰ نمونه مشکوک به FH (۱۷ نمونه با سابقه خانوادگی و ۸۳ نمونه بدون سابقه خانوادگی) در مجموع تعداد ۱۳ مورد تغییر ژنی شناسایی شد. یک مورد جهش هتروزیگوت C.97 C>T بود که این جهش جابجایی از نوع Nonesense بود و باعث تبدیل اسید امینه گلوتامین (Gln) در موقعیت ۳۳ به کدون (Q33X) خاتمه می‌شود. این جهش در تکرار اول اگزون ۲ قرار دارد و فعالیت *LDLR* در بیماران دارای این جهش کمتر از ۲درصد است. در مطالعه انجام شده در شهر سنپترزبورگ روسیه، Zakharova و همکاران با استفاده از روش PCR-SSCP جهش‌های موجود در ژن *LDLR* را مورد بررسی قرار دادند.[۲۳] نتایج نشان داد که از بین ۴۵ نمونه انتخابی، ۲ بیمار (هر دو از یک خانواده) دارای جهش c.97 C>T بودند. یکی دیگر از جهش‌ها، جهش هتروزیگوت c.445 G>T بود. این جهش از نوع جابجایی بود و باعث تبدیل گلایسین (Gly) ۱۴۹ به سیستئین (Cys) می‌شود. این جهش در تکرار سوم دومین اتصال لیگاند اگزون ۴ قرار دارد. مطالعه Tichý و همکاران در جمهوری چک بر روی ۲۲۳۹ بیمار مبتلا به FH انجام شد. نتایج نشان داد ۰/۱۹درصد جمعیت مورد مطالعه دارای جهش c.445 G>T در ژن *LDLR* خود هستند.[۲۴] جهش هتروزیگوت c.986 G>T یک جهش c.986 G>T یک جهش جابجایی بوده و در اگزون شماره ۷ قرار دارد. جهش فوق باعث تبدیل سیستئین (Cys) ۳۰۸ به اسید آمینه فنیل آلانین (Phe) می‌شود. در مطالعه Waluś-Miarka و همکاران در جنوب شرق آسیا برای

جدول ۳ : نتایج تست های بیوشیمیایی و جهش های شناسایی شده بیماران

ردیف	سن (سال)	جنس	کلسترول	تری گلیسیرید	HDL-C	LDL-C	سابقه خانوادگی	شماره اگزون	نام جهش	نوع جهش
۱	۳۳	مرد	۲۷۰	۶۲	۴۲	۱۹۶	3-1-R	۶	C.936-940 (DEL 5)	حذفGTGCG
۲	۲۸	زن	۳۱۶	۸۸	۳۰	۲۶۶	4-1-R	۱۴	C.2054C>T	جابجایی
۳	۲۴	مرد	۳۸۹	۱۶۸	۴۲	۳۲۰	2-1-R	۴	C.651-653 (DEL3)	حذف GGT
۴	۳۹	مرد	۴۶۳	۲۶۵	۳۴	۳۱۶	3-1-R	اینترون۳	C.313+1G>A	Splicing
۵	۴۱	مرد	۲۳۱	۶۲	۶۱	۱۵۴	4-1-R	۲	C.97C>T	جابجایی
۶	۵۳	مرد	۲۳۵	۱۸۵	۲۳	۱۷۷	3-1-R	۴	C.682G>T	جابجایی
۷	۷۲	زن	۲۹۳	۹۷	۲۳	۲۵۰	3-1-R	۶	C.925-931(DEL7)	حذف CCCATCA
۸	۳۹	مرد	۲۵۰	۶۱	۶۱	۱۷۷	2-1-R	۱۵	C.2177C>T	جابجایی
۹	۴۱	مرد	۴۴۰	۱۶۸	۱۶۸	۳۵۵	1-1-R	۱۳	C.1959 T>C	جابجایی
۱۰	۲۷	زن	۳۲۴	۵۳	۵۳	۲۷۰	4-1-R	۶	C.936-940(DEL 5)	حذف GTGCG
۱۱	۳۶	زن	۲۳۱	۸۸	۸۸	۱۵۰	2-1-R	۴	C.652-654 (DEL 3)	حذف GGT
۱۲	۴۵	مرد	۱۹۳	۴۴	۴۴	۱۵۴	3-1-R	۷	C.985 G>T	جابجایی
۱۳	۳۲	مرد	۴۸۶	۱۰۶	۱۰۶	۴۲۴	2-1-R	۴	C.445 G>T	جابجایی
۱۴	۶۶	زن	۳۲۴	۲۹۲	۲۹۲	۲۳۵	-	۱۳	C.1959T>C	جابجایی



شکل ۱ : ژل پلی آکریل آمید SSCP. لاین ۱، ۵، ۹ و ۱۶: مارکر (DNA-Marker short-run 1) ؛ لاین ۲ و ۳: بدون تغییر؛ لاین ۴: جهش C.97C>T (بیمار ۵)؛ لاین ۶ و ۷: بدون تغییر؛ لاین ۸: جهش C.313+1G>A (بیمار۴) ؛ لاین ۱۰، ۱۱ و ۱۲: جهش C.445 G>T (بیمار ۱۳) ؛ لاین ۱۳، ۱۴ و ۱۵: بدون تغییر؛ لاین ۱۷: بدون تغییر؛ لاین ۱۸: جهش C.925-931(DEL7) (بیمار ۷) ؛ لاین ۱۹: بدون تغییر
لاین ۲۰: جهش C.985 G>T (بیمار ۱۲)؛ لاین ۲۱: بدون تغییر؛ لاین ۲۲: پلی مورفیسم C.1959 T>C (بیمار۹)؛ لاین ۲۳: جهش C.2054C>T (بیمار۲)؛ لاین ۲۴: بدون تغییر؛ لاین ۲۵: بدون تغییر
لاین ۲۶: جهش C.2177C>T (بیمار۸)؛ لاین ۲-۴: اگزون۲؛ لاین ۶-۸: اینترون۳؛ لاین ۱۰-۱۵: اگزون۴؛ لاین ۱۷-۱۸: اگزون۶؛ لاین ۱۹-۲۰: اگزون۷؛ لاین ۲۱-۲۲: اگزون۱۳؛ لاین ۲۳-۲۴: اگزون۱۴
لاین ۲۵-۲۶: اگزون۱۵

اولین بار جهش c.986 G>T در ۳ بیمار غیرخویشاوند مشاهده گردید.[۲۵] دو جهش پلی مورفیسم c.1959 T>C نیز در این مطالعه مشاهده شد. این پلی‌مورفیسم در اگزون ۱۳ ژن *LDLR* قرار دارد. در مطالعه Komarova و همکاران که در شهر پتروزاودسک روسیه انجام شد؛ نتایج نشان داد که از ۸۰ نمونه مورد مطالعه ۴۹درصد از بیماران دارای پلی مورفیسم c.1959 T>C هستند و برای شناسایی جهش‌ها از روش PCR-SSCP استفاده شد.[۲۶]

در تمام جمعیت دنیا بیش از ۷۰۰ جهش برای ژن *LDLR* شناخته شده است. در تمام جهش‌های اتوزومال غالبی که از ژن *LDLR* 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. طبق مطالعات انجام شده، جهش‌های انوع نوترکیبی، تغییرقالب و بی‌معنی بیماری‌زا بوده؛ ولی بیماری‌زایی کامل در جهش‌های با معنی اشتباه و جهش‌های کوچک بدون تغییر قالب دیده نمی‌شود.[۱۹] بنابراین بررسی‌های ژنتیکی می‌تواند در بهبود تشخیص بالینی افراد مشکوک به FH بسیار مفید واقع شده و تشخیص پزشک برای درمان مناسب را تقویت نماید. اگر در آزمایشات ژنتیکی نشان دادن وجود جهش در ژن *LDLR* موفقیت‌آمیز نباشد؛ سپس بایستی سایر جهش‌های اتوزومال غالب که باعث هایپرکلسترولمی می‌شوند را مدنظر قرار داد. از جمله می‌توان به جهش در ژن‌های Apo B و PCSK9 اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که جهش در ژن *LDLR* در بروز بیماری هایپرکلسترولمی خانوادگی در جمعیت مورد مطالعه نقش دارد. میزان کلسترول و LDL سرم دو گروه با و بدون سابقه خانوادگی تفاوت آماری معنی‌داری ندارد. در حالی که از لحاظ سن و جهش‌های موجود در ژن *LDLR* اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده گردید.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۱۴۲۳۰۵۰۳۹۴۲۰۰۴) خانم فاطمه ولی محمدی رحمانی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی – ژنتیک از دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان بود. بدین‌وسیله از شرکت کنندگان در مطالعه صمیمانه تشکر می‌نماییم. همچنین برای مرحوم دکتر حسین راثی رحمت و مغفرت الهی خواستاریم.

References

1. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science. 1986 Apr; 232(4746): 34-47. DOI: 10.1126/science.3513311

2. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. Hum Mutat. 1992; 1(6): 445-66. DOI: 10.1002/humu.1380010602

3. Vrablik M, Tichý L, Freiberger T, Blaha V, Satny M, Hubacek JA. Genetics of Familial Hypercholesterolemia: New Insights. Front Genet. 2020 Oct; 11: 574474. DOI: 10.3389/fgene.2020.574474

4. Seftel HC, Baker SG, Sandler MP, Forman MB, Joffe BI, Mendelsohn D, et al. A host of hypercholesterolaemic homozygotes in South Africa. Br Med J. 1980 Sep; 281(6241): 633-36. DOI: 10.1136/bmj.281.6241.633

5. Hoyert DL, Xu J. Deaths: preliminary data for 2011. Natl Vital Stat Rep. 2012 Oct; 61(6): 1-51.

6. Pimstone SN, Sun XM, du Souich C, Frohlich JJ, Hayden MR, Soutar AK. Phenotypic variation in heterozygous familial hypercholesterolemia: a comparison of Chinese patients with the same or similar mutations in the LDL receptor gene in China or Canada. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998 Feb; 18(2): 309-15. DOI: 10.1161/01.atv.18.2.309

7. Beheshti SO, Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects. J Am Coll Cardiol. 2020 May; 75(20): 2553-66. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.03.057

8. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. Am J Epidemiol. 2004 Sep; 160(5): 407-20. DOI: 10.1093/aje/kwh236

9. Sun XM, Patel DD, Webb JC, Knight BL, Fan LM, Cai HJ, et al. Familial hypercholesterolemia in China. Identification of mutations in the LDL-receptor gene that result in a receptor-negative phenotype. Arterioscler Thromb. 1994 Jan; 14(1): 85-94. DOI: 10.1161/01.atv.14.1.85

10. Dashty M, Motazacker MM, Levels J, de Vries M, Mahmoudi M, Peppelenbosch MP, et al. Proteome of human plasma very low-density lipoprotein and low-density lipoprotein exhibits a link with coagulation and lipid metabolism. Thromb Haemost. 2014 Mar; 111(3): 518-30. DOI: 10.1160/TH13-02-0178

11. Cho KI, Yu J, Hayashi T, Han SH, Koh KK. Strategies to Overcome Residual Risk During Statins Era. Circ J. 2019 Sep; 83(10): 1973-79. DOI: 10.1253/circj.CJ-19-0624

12. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. Nat Rev Genet. 2009 Feb; 10(2): 109-21. DOI: 10.1038/nrg2481

13. Lemesle G, Chouraki V, de Groote P, Turkieh A, Beseme O, Drobecq H, et al. Apolipoprotein Proteomic Profiling for the Prediction of Cardiovascular Death in Patients with Heart Failure. Proteomics Clin Appl. 2020 Nov; 14(6): e2000035. DOI: 10.1002/prca.202000035

14. Nykjaer A, Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife? Trends Cell Biol. 2002 Jun; 12(6): 273-80. DOI: 10.1016/s0962-8924(02)02282-1

15. Rahmati-Ahmadabad S, Broom DR, Ghanbari-Niaki A, Shirvani H. Effects of exercise on reverse cholesterol transport: A systemized narrative review of animal studies. Life Sci. 2019 May; 224: 139-48. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.03.058

16. Lombardi MP, Redeker EJ, Defesche JC, Kamerling SW, Trip MD, Mannens MM, et al. Molecular genetic testing for familial hypercholesterolemia: spectrum of LDL receptor gene mutations in The Netherlands. Clin Genet. 2000 Feb; 57(2): 116-24. DOI: 10.1034/j.1399-0004.2000.570205.x

17. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest. 2002 May; 109(9): 1125-31. DOI: 10.1172/JCI15593

18. Gent J, Braakman I. Low-density lipoprotein receptor structure and folding. Cell Mol Life Sci. 2004 Oct; 61(19-20): 2461-70. DOI: 10.1007/s00018-004-4090-3

19. Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. Annu Rev Genet. 1990; 24: 133-70. DOI: 10.1146/annurev.ge.24.120190.001025

20. Darbin A, Pezeshkiyan M, Afrasiyabi A, Dolatkhah H, Vatankhah AM, Javadi L, et al. [Effect of a High-Cholesterol Diet on Antioxidative/Prooxidative Balance in Rabbits]. Med J Tabriz Univ Med Sci. 2011; 33: 37-42. [Article in Persian]

21. Kwiterovich PO Jr. Clinical implications of the molecular basis of familial hypercholesterolemia and other inherited dyslipidemias. Circulation. 2011 Mar; 123(11): 1153-55. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.021857

22. Juhász L, Balogh I, Madar L, Kovács B, Harangi M. A Rare Double Heterozygous Mutation in Low-Density Lipoprotein Receptor and Apolipoprotein B-100 Genes in a Severely Affected Familial Hypercholesterolaemia Patient. Cureus. 2020 Dec; 12(12): e12184. DOI: 10.7759/cureus.12184

23. Zakharova FM, Damgaard D, Mandelshtam MY, Golubkov VI, Nissen PH, Nilsen GG, et al. Familial hypercholesterolemia in St-Petersburg: the known and novel mutations found in the low density lipoprotein receptor gene in Russia. BMC Med Genet. 2005 Feb; 6: 6. DOI: 10.1186/1471-2350-6-6

24. Tichý L, Freiberger T, Zapletalová P, Soška V, Ravčuková B, Fajkusová L. The molecular basis of familial hypercholesterolemia in the Czech Republic: spectrum of LDLR mutations and genotype-phenotype correlations. Atherosclerosis. 2012 Aug; 223(2): 401-408. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.05.014

25. Waluś-Miarka M, Sanak M, Idzior-Waluś B, Miarka P, Witek P, Małecki MT, et al. A novel mutation (Cys308Phe) of the LDL receptor gene in families from the South-Eastern part of Poland. Mol Biol Rep. 2012 May; 39(5): 5181-86. DOI: 10.1007/s11033-011-1314-0

26. Komarova TY, Korneva VA, Kuznetsova TY, Golovina AS, Vasilyev VB, Mandelshtam MY. Familial hypercholesterolemia mutations in Petrozavodsk: no similarity to St. Petersburg mutation spectrum. BMC Med Genet. 2013 Dec; 14: 128. DOI: 10.1186/1471-2350-14-128