بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه پیام نور

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوشیمی

دانشکده علوم پایه و کشاورزی

گروه علمی زیست شناسی

عنوان پایان نامه:

بررسی جهش های ژن LDLR در بیماران با کلسترول بالای فامیلی در استان چهار محال و بختیاری

استاد راهنما:

دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتری

استاد مشاور:

دکتر حبیب الله ناظم

نگارش:

سمیه اسدی مبارکه

اسفند ماه ۱۳۸۸

تقدیم به:

به اسوه ی صبر و ایثار مادر عزیزم

تقدیر و تشکر:

سپاس از ایزد منان

با تشکر فراوان از جناب آقای دکتر مرتضی هاشم زاده و سرکار خانم فرخی که با زحمات بی دریغشان من را در طی این مسیر علمی یاری نمودند.

تلاشها و زحمات بی دریغتان را اجر می نهم.

چکیده:

مقدمه: هایپرکلسترولمی فامیلی (FH) بیماری غالب اتوزومال است و با افزایش سطح لیپوپروتئین با دانسیته کم (در پلاسما) ، لیپید در تاندون و رگها تجمع می یابد. این بیماری با آترواسکلروز نابهنگام و افزایش خطر بیماری های قلبی عروقی (CHD) همراه می شود. هایپرکلسترولمیای فامیلی به همراه جهش در ژن گیرنده لیپوپروتئین با دانسیته کم (LDLR) ایجاد می شود. از اهداف این مطالعه بررسی تغییرات ژن LDLR در گروهی از بیماران استان چهارمحال و بختیاری بود.

مواد و روشها: در این مطالعه ۵۷ نمونه بیمار (میانگین سنی ۱۲/۸۶ ± ۵۳/۲۶) با استفاده از روش آسان و بر اساس معیار جهانی ثبت Simon Broome انتخاب گردیدند. DNA ژنومی این بیماران با روش استاندارد فنل-کلروفرم استخراج گردید. سپس بر روی نمونه های مورد مطالعه با استفاده از روش PCR-SSCP وجود تغییرات در پروموتر و اگزون های شماره ۱ ،۳، ۵ ،۱۱ ،۱۳ ، ۱۵ ،۱۶ ، ۱۷ و ۱۸ مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای اگزون های شماره ۳ ،۱۱و۱۵ شرایط Heteroduplex Analysis نیز اعمال شد. با انجام تکنیک های فوق موارد مشکوک شناسایی شد و سپس توالی یابی مستقیم DNA انجام گردید.

نتیجه گیری: در این مطالعه دو تغییر در ژن LDLR شناسایی شد، جهش هتروزیگوت ۲۸۳T>A و پلی مورفیسم ۱۹۵۹T>C که به ترتیب در ۱و ۹ فرد مبتلا به FH شناسایی گردید. در پروموتر و اگزون های ۱، ۵، ۱۱، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸ تغییرات بیماری زایی مشاهده نگردید. نتایج این تحقیق نشان داد نقش ژن LDLR در ایجاد FH در جمعیت مورد مطالعه ضعیف است و احتمالا ژن یا لوکوس های دیگری در ایجاد FH در این منطقه نقش دارند.

کلمات کلیدی: هایپرکلسترولمی فامیلی،ژن LDLR ، PCR-SSCP ، Heteroduplex Analysis

فصل اول:کلیات

۱-۱-مقدمه..... ۱۱

۱-۲-لیپید..... ۱٤

۱-۲-۱- فیزیولوژی لیپوپروتئین های پلاسما ۱٤

۱-۲-۲- لیپیدها و بیماریهای عروقی..... ۱٦

۱-۳-کلسترول..... ۱۷

۱-۳-۱-بیوسنتز کلسترول..... ۱۷

۱-۳-۲-تنظیم سنتز کلسترول..... ۱۷

۱-۳-۳-مسیر انتقال معکوس کلسترول..... ۱۸

۱-۳-٤- کاربردهای خاص کلسترول در بدن..... ۱۹

۱-٤-لیپوپروتئین..... ۱۹

۱-٤-۱- ساختمان و متابولیسم طبیعی لیپوپروتئین..... ۲۰

۱-٤-۲-لیپوپروتیئن ها، آپولیپوپروتیئن ها و پروتئین های مربوطه..... ۲۳

۱-٤-۲-۱-اگزوژن..... ۲۳

۱-٤-۲-۲-آندوژن..... ۲۳

۱-٤-۳-طبقه بندی..... ۲٤

۱-٤-۳-۱- لیپو پروتئین های طبیعی..... ۲٤

۱-٤-۳-۱-۱- شیلومیکرون ها..... ۲٤

۱-٤-۳-۱-۲- لیپوپروتئین های با چگالی بسیار کم..... ۲٤

۱-٤-۳-۱-۳-لیپو پروتئین های با چگالی کم..... ۲۵

۱-٤-۳-۱-٤-لیپوپروتئین با چگالی بالا..... ۲٦

۱-٤-۳-۲- لیپوپروتئین های غیر طبیعی..... ۲٦

۱-۵-لیپیدها، لیپوپروتئین ها و بیماری..... ۲۷

۱-۵-۱-هایپر کلسترولمی پلی ژنیک (غیر فامیلی)..... ۲۷

۱-۵-۲- هایپرکلسترولمی خانوادگی(FH)..... ۲۷

۱-٦-آترواسکلروز..... ۲۸

۱-٦-۱-روند تشکیل پلاک های آترواسکلروز..... ۲۸

۱-۷- LDLحامل اصلی کلسترول ۲۹
۱-۷-۱-آندوسیتوز LDL با واسطه پذیرنده ۲۹
۱-۷-۱-۱-مسیر آندوسیتوز کمپلکس LDLR/ LDL-C ۳۰
۱-۸-گیرنده لیپوپروتئین با چگالی کم(LDLR) ۳۲
۱-۸-۱-بررسی مولکولی ژن LDLR ۳۳
۱-۸-۱-۱- ضرورت شناسایی جهش در ژن LDLR ۳٤
۱-۸-۱-۲-جهش های ژن LDLR ۳۵
۱-۸-۱-۲-۱-جهش های رده اول ۳٦
۱-۸-۱-۲-۲-جهش های رده دوم ۳٦
۱-۸-۱-۲-۳-جهش های رده سوم ۳٦
۱-۸-۱-۲-٤-جهش های رده چهارم ۳٦
۱-۸-۱-۲-۵-جهش های رده پنجم ۳۷
۱-۸-۱-۳-روند بیان ژن ۳۷
۱-۸-۱-٤-ناحیه پروموتر ژن LDLR ۳۸
۱-۸-۲- پنج منطقه عملکردی مجزا در پروتئین LDLR ۳۹
۱-۸-۲-۱- ناحیه انتهای آمینی پذیرنده – اتصال ۳۹
۱-۸-۲-۲- قلمرو همتایی پیش ساز عامل رشد اپیدرمی(EGF) ٤۰
۱-۸-۲-۳- منطقه O-گلیکوزیدی ٤۱
۱-۸-۲-٤- منطقه بین غشایی ٤۱
۱-۸-۲-۵- منطقه دنباله سیتوپلاسمی ٤۱
۱-۸-۲-٦-تاخوردگی پروتئین LDLR... ..... ٤۲
۱-۸-۲-۷- نقش کلسیم در پروتئین LDLR ٤۲
۱-۹-نقش LDLR در ارتباط با هایپرکلسترولمیا خانوادگی ٤۳
۱-۱۰-شناسایی افراد مبتلا به FH ٤٤
۱-۱۰-۱-برنامه US MedPed ٤٤
۱-۱۰-۲-گروه ثبت Simon Broome در کانادا ٤٤
۱-۱۰-۳-شبکه Dutch Lipid Clinic ٤٤

۱-۱۱-بررسی تغییرات درسایر ژن های در گیر با FH ٤٥
۱-۱۱-۱-ژن ۱۰۰-APOB ٤٦
۱-۱۱-۲-ژنPCSK۹ ..... ٤٧
۱-۱۱-۳-ژن اتوزومال برگشتی هایپرکلسترولومیای شدید[ARH]..... ٤٨
۱-۱۱-٤-فنوتیپ سیتواسترولومیا..... ٤٩
۱-۱۲-مسیرهای درمان مبتلایان با FH هتروزیگوت و هموزیگوت..... ٤٩
۱-۱۳-بررسی متون..... ٥٠

فصل دوم: روشها ، مواد و وسایل

۲-۱- مراحل انجام تحقیق..... ٥٤
۲-۱-۱-پرسشنامه..... ٥٤
۲-۱-۲- نمونه گیری..... ٥٨
۲-۱-۳- استخراج DNA ٥٨
۲-۱-٤-ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده ٦٠
۲-۱-٤-۱-ارزیابی کیفی DNA ژنومی استخراج شده ٦٠
۲-۱-٤-۲- تعیین غلظت DNA با روش اسپکتروفتومتری..... ٦٠
۲-۱-٥- تکثیر DNA با استفاده ازتکنیک PCR..... ٦١
۲-۱-٥-۱-اصول انجام تکنیک PCR..... ٦٣
۲-۱-٥-۲-غلظت یون منیزیم ٦٣
۲-۱-٥-۳-داکسی نوکلئوتید تری فسفات ها(dNTP)..... ٦٣
۲-۱-٥-٤-آغازگرها..... ٦٣
۲-۱-٥-٥-دمای ذوب (Tm)..... ٦٤
۲-۱-٥-٦-بهینه سازی واکنش PCR برای دمای اتصال آغازگرها..... ٦٤
-۱-٥-۷-تعداد چرخه های تکثیر..... ٦٥
۲-۱-٦- الکتروفورز محصولات PCR ٧١

۲-۱-٦-۱- مواد مورد نیازتهیه ژل پلی اکریل آمید ۷۲
۲-۱-٦-۲- فرایند پلیمریزاسیون ۷۲
۲-۱-٦-۳-طرز ساخت ژل پلی اکریل آمید ۷۳
۲-۱-٦-٤- انتقال محصول PCR به ژل ۷۳
۲-۱-٦-٥- رنگ آمیزی ژل الکتروفورز ۷٤
۲-۱-٦-٦- الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۷٥
۲-۱-٦-۷- طرز تهیه ژل آگارز ۱/٥ درصد جهت الکتروفورز ۷٦
۲-۱-۷- تکنیک PCR-SSCP ۷۷
۲-۱-۷-۱- روش انجام PCR- SSCP ۷۹
۲-۱-۸- Heteroduplex Analysis ۸۰
۲-۱-۸-۱- روش انجام SSCP-Heteroduplex ۸۱

فصل سوم : نتایج

۳-۱-نتایج ۸۳

فصل چهارم: بحث

٤-۱-بحث ۹۰

فهرست شکلها

شکل۱-۱: لیپوپروتئین ۲۰
شکل۱-۲ : لیپوپروتئین کم چگال ۲٥
شکل۱-۳ : نمایی از مسیر آندوسیتوز در سطح غشاء سلول ۳۱
شکل۱-٤ : نواحی اگزونی و اینترونی ژن LDLR ، قسمت های مختلف پروتئینLDLR .. ۳٤
شکل۱-٥ : پنج منطقه عملکردی مجزا در پروتئین LDLR ۳۹
شکل۱-٦ : نقش ژن های درگیر در مسیر انتقال LDL-C ٤٦
شکل۲-۱: تکثیر DNA با استفاده از PCR ٦۲
شکل۲-۲ : نمونه شماتیک الکتروفورز پلی اکریل آمید ۷٤
شکل۲-۳ : دستگاه الکتروفورز ژل آگارز ۷٦
شکل۲- ٤ : نمایی شماتیک از فرایند PCR- SSCP ۷۸

شکل۲-۵ : نمایی شماتیک از فرایند هترودوپلکس..... ۸۰
شکل۳-۱ : ژل پلی اکریلامید SSCP پروموتر و اگزون ۱ ژن LDLR..... ۸۳
شکل۳-۲ : ژل پلی اکریل آمید SSCP اگزون۵ ژن LDLR..... ۸۳
شکل۳-۳ : ژل پلی اکریل آمید SSCP اگزون ۱۳ ژن LDLR..... ۸٤
شکل۳-٤ :ژل پلی اکریل آمیدSSCP اگزون ١٦ ژن LDLR..... ۸٤
شکل۳-۵ : ژل پلی اکریل آمیدSSCP اگزون ۱۷ژن LDLR..... ۸۵
شکل۳-٦ :ژل پلی اکریل آمید SSCP اگزون ۱۸ ژن LDLR..... ۸۵
شکل۳-۷ :ژل پلی اکریل آمید SSCP-Heteroduplex اگزون ۳ ژن LDLR..... ۸٦
شکل۳-۸ : ژل پلی اکریل آمیدSSCP- Heteroduplex اگزون ۱۱ ژن LDLR..... ۸٦
شکل ۳-۹ : ژل پلی اکریل آمید SSCP-Heteroduplex اگزون ۱۵ ژن LDLR..... ۸۷
شکل ۳-۱۰: نتایج آنالیز با استفاده از تکنیک توالی یابی DNA اگزون ۳..... ۸۷
شکل ۳-۱۱: نتایج آنالیز با استفاده از تکنیک توالی یابی DNA اگزون ۱۳..... ۸۸

فهرست جداول

جدول۱-۱: دسته بندی و عملکرد آپو پروتئین ها..... ۱۵
جدول۲-۱: توالی آغازگرهای ژن LDLR..... ٦۵
جدول۲-۲: برنامه حرارتی ترموسایکلر برای PCR پروموتر و اگزون۱..... ٦٦
جدول۲-۳: برنامه حرارتی ترموسایکلر برای PCR اگزون۳..... ٦٦
جدول۲-٤: برنامه حرارتی ترموسایکلر برای PCR اگزون ۵..... ٦۷
جدول۲-۵: برنامه حرارتی ترموسایکلر برای PCR اگزون۱۱..... ٦۷
جدول۲-٦: برنامه حرارتی ترموسایکلر برای PCR اگزون۱۳ ..... ٦۸
جدول۲-۷: برنامه حرارتی ترموسایکلر برای PCR اگزون۱۵..... ٦۸
جدول۲-۸: برنامه حرارتی ترموسایکلر برای PCR اگزون١٦ ٦۹
جدول۲-۹: برنامه حرارتی ترموسایکلر برای PCR اگزون۱۷..... ٦۹
جدول۲-۱۰: برنامه حرارتی ترموسایکلر برای PCR اگزون۱۸..... ۷۰
جدول۲-۱۱: مواد و مقادیر مورد نیاز واکنش PCR برای پروموتر و اگزون های۱، ۳، ۵، ۱۱ ۷۰

۲-۱۲: مواد و مقادیر مورد نیاز برای هرنمونه درواکنش PCR برای اگزون های ۱۳و ۱۵-۱۸ ۷۱

جدول ۲-۱۳: شرایط انجام SSCP برای اگزون های ژن LDLR..... ۸۰

جدول۲-۱٤ : برنامه حرارتی ترموسایکلر برای Heteroduplex..... ۸۱

فصل اول

کلیات

1-1-مقدمه

کلسترول بالای خانوادگی (FH)[1] بیماری شایعی است و به صورت غالب اتوزومال به ارث می رسد[Brown MS,۱۹۸٦,۳٤-٤۷]. بیش از ده میلیون نفر در سراسر جهان از این بیماری رنج می برند. FH هموزیگوت با فراوانی ۱ در میلیون نفر و FH هتروزیگوت حدود ۱ در ۵۰۰ نفر، در اغلب جمعیت ها گزارش شده است[Hobbs HH,۱۹۹۲,٤٤۵-٤٦٦]. FH همراه با سطوح بالای LDL حامل کلسترول(LDL-C)[2] ، گزانتومای تاندون، حلقه قرنیه و بیماری های قلبی عروقی (CHD)[3] مشخص می گردد[Brown MS,۱۹۸٦,۳٤-٤۷]. سه گروه (با یکدیگر اختلاف هایی جزئی دارند) معیارهایی را برای تشخیص FH ارائه داده اند.

این سه گروه شامل برنامه US Med-Ped[4] [Kane JP,۱۹۹۱,۱٦۸۸-۱٦۸۹] ، گروه ثبت Simon Broome [Yamamoto A,۱۹۸۹,۱٦٦-۱۷٤,]،[Williams RR,۱۹۸٦,۲۱۹-۲۲٤] و شبکه Dutch Lipid Clinic می باشند[No authors listed,۱۹۹۹,۱۰۵-۱۱۲].

در سه گروه فوق شاخص های اصلی به یکدیگر نزدیک است. از آن جمله می توان به تاریخچه فامیلی ، میزان کلسترول کلی ، سطوح LDL-C پلاسما، حضور تاندون گزانتوما ، حلقه قرنیه [2] و بیماری کرونر قلب نابهنگام (CHD) در بیمار و یا فامیل درجه اول بیمار اشاره کرد[Khachadurian AK,۱۹٦٤,٤۰۲-٤۰۷]. بیماری های قلبی عروقی عامل مرگ و میر در بسیاری از کشورهای جهان شناخته شده و می توان گفت مهمترین عامل ایجاد بیماری وجود FH در مبتلایان می باشد[Goldstein JL ,۱۹۹۲,٤٤۵-٤٦٦,]. FH خطر ابتلاء به بیماری های قلبی عروقی را تا ۵۰ درصد در مردان و ۳۰ درصد در زنان افزایش می دهد[Khachadurian AK,۱۹٦٤,٤۰۲-٤۰۷]. در جوامع اروپایی احتمال شیوع FH حدود ۲ درصد گزارش شده است. بدلیل نتایج حاصل از اثربنیانگذار[4] بر روی جمعیت های خاصی ، شیوع مبتلایان هتروزیگوت بالاتر از فراوانی فوق تخمین زده شده است[Civeira F,۲۰۰٤,۵۵-٦۸].

تاکنون تحقیقات کاملی بر روی FH در آسیا و به طور خاص منطقه خاورمیانه صورت نگرفته استKhoo KL[۱۰۵-۹۸,۲۰۰۰,]. این مطالعات اندک و پراکنده نشان می دهد بیماری های قلبی

---

[1] Familial Hypercholesterolemia
[2] Low density lipoprotein-cholesterol
[3] coronary heart disease
[4] Make early diagnosis – prevent early death

۲ Corneal arcus

[4] founder effect

عروقی تظاهرات بالینی کمتری نسبت به سایر نقاط جهان دارد [Pimstone SN,۱۹۹۸,۳۰۹-۳۱۵], [Sun XM۹٤-۹٥,۱۹۹٤,]. در ایران نیز حدود ٤٠ درصد از مرگ ومیرها به دلیل بیماری های قلبی عروقی است و شیوع این بیماری در افراد بالاتر از ٢٠ سال ، ٢٤ درصد گزارش شده است [مرکز آمار ایران،۱۳۷۱-۱۳۷۰]. اکثر داده ها نقش دو ژن LDLR و ژن ApoB۱۰۰ را نسبت به سایر ژنها در بروز FH موثرتر نشان می دهد. حتی در بیشتر موارد نقش ژن LDLR قویتر گزارش شده است[Austin MA,۲۰۰٤,٤۰۷-٤۲۰].

ژن LDLR با اندازه تقریبی ٤٥ kb بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۹ قرار گرفته و از ۱۸ ناحیه اگزونی و ۱۷ ناحیه اینترونی تشکیل شده است [افخمی اردکانی، محمد، ۱۳۸۱، ٢٤٧], [Lombardi MP۱۲٤-۱۲٦,۲۰۰۰,]. LDLR متعلق به یک خانواده سوپرژن بوده و یک پروتئین موزاییک را کد می کند Südhof TC,[۸۲۲-۸۲۲,۱۹۸٥]. ژن LDLR ، یک پروتئین ۸۳۹ اسید آمینه ای را کد می کند. گیرنده LDL یک گلیکوپروتئین سطحی سلول است و سطوح پلاسمایی کلسترول در خون را تنظیم می کند[Brown MS,۱۹۸٦,۳٤-٤۷],[Goldstein JL,۱۹۹٥,۱۹۸۱-۲۰۳۰].

پروتئین سنتز شده در ابتدا یک توالی ۲۱ اسیدآمینه ای داشته که مانند سیگنال عمل می کند و در طول جابجایی به ER شکسته می شود. نتایج نشان می دهد بین نواحی اگزونی و سازماندهی قسمت های پروتئینی ارتباط قابل توجهی وجو د دارد [Genet J.۲۰۰٤,۲٤٦۱-۲٤۷۰]. بیش از ۷۰۰ جهش مختلف در ژن LDLR شناسایی شده است و این تعداد در حال افزایش است [Wilson, DJ.۱۹۹۸,۱٥۰۹-۱٥۱۱]. انواع جهش ها مانند missense ، splice site و حذف های بزرگ در ژن LDLR شناسایی شده است. جهش های موجود در ژن LDLR براساس نوع فنوتیپ FH طبقه بندی می شوند. جهش های مرتبط با سنتز LDLR ، انتقال LDLR به سطح سلول ، تجمع LDLR در حفره هایی با پوشش کلاترینی ، داخل شدن گیرنده ، توانایی LDLR برای اتصال به لیگاند و ورود به چرخه مجدد در این طبقه بندی قرار می گیرد[Hobbs, HH۱۷۰-۱۳۳,۱۹۹۰.].

یک درصد کاهش کلسترول کلی سرم ، خطر بیماری های قلبی عروقی را تا ۲ درصد کاهش می دهد[مرکز آمار ایران،۱۳۷۱-۱۳۷۰]. بنابراین شناسایی به موقع افراد مبتلا به FH عامل موثری درکاهش ابتلا به بیماری های قلبی عروقی خواهد بودKL . Khoo[۱۰٥-۹۸,۲۰۰۰,]. تغییرات در ژن LDLR مهمترین علت بروز FH در افراد است. در مطالعات قبلی روشهایی مانند RFLP ، DGGE ، SSCP ، PCR-SSCP و توالی یابی مستقیم DNA[1] به منظور شناسایی تغییرات در ژن LDLR

[1] DNA sequence

استفاده شده است. با روش PCR-SSCP توالی های خاصی از ژن LDLR تکثیر شده و سپس تغییرات مشخص می شود. با روش توالی یابی مستقیم می توان نتایج نهایی را تائید کرد. اگزون های ۲، ٤، ٦، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۲، ١٤ ژن LDLR در مطالعه قبلی توسط شایسته و همکاران (نتایج این بررسی در دست چاپ است) بررسی گردید. ما در مطالعه حاضر وجود تغییرات سایر اگزون های ژن LDLR در ارتباط با بیماران FH را با استفاده ازآنالیز PCR-SSCP و توالی یابی مستقیم بررسی نموده ایم.

1-2-لـیـپـیـد

لیپید ها مواد آلی هستند و در حلالهای غیرقطبی قابل حل می شوند. لیپیدهای اصلی در سلولهای انسانی عبارتند از: اسیدهای چرب، گلیکلولیپیدها، اسفنگولیپیدها، فسفولیپیدها، ویتامین های محلول در چربی(A ,D ,E ,K)و استرول ها. لیپیدهایی که دارای نقش عملکردی در بدن انسان هستند به صورت آندوژن در بدن ساخته می شوند. انواع لیپیدها از طریق تغذیه وارد بدن شده و بیشتر آنها به اجزاء ساده شکسته می شوند. این لیپید ها به عنوان پیش ساز، سوخت و یا هر دو عمل می کنند . تری گلسیریدها (TGs) و کلسترول هم درون بدن ساخته شده و هم از طریق غذا دریافت می شوند و نقش پیش ساز و سوخت را بر عهده دارند. تری گلسیریدها از سه زنجیره اسیدچرب (FFA) متصل به گلسیرول (توسط پیونداستری) تشکیل شده اند. اسیدهای چرب همچنین می توانند استریفیه شده و به کلسترول تبدیل شوند(به صورت ذرات لیپوپروتئین با چگالی بسیارکم یاVLDL). کلسترول و تری گلیسرید هیدروفوبیک هستند و به همراه آپولیپوپروتئینها و فسفولیپیدها، در گردش خون جابجا شده و توسط سلولها جذب و ترشح می شوند. نام این ذرات براساس چگونگی جداسازی در سانتریفوژ بر حسب چگالی آنها انتخاب شده است.۱۰ آپولیپوپروتئین تا کنون شناخته شده و نامگذاری آنها بر اساس حروف الفبا صورت گرفته است (جدول۱-۱).

آپولیپوپروتئین ها که موجب ثبات میسل لیپوپروتئین می شوند توسط گیرنده های غشای سلولی شناسایی شده و به عنوان کوفاکتور آنزیم عمل می کنند [Kishor,S. ۲۰۰۷,٤٦٧٤-٤٦٩٩]. بخش عمده توجه به لیپوپرتئینها و تری گلیسرید ها ناشی از ارتباط آنها با آترواسکلروز از نظر اپیدمیولوژی می باشد. لیپیدهایی که غلظت پلاسمایی آنها با وقوع آترواسکلروز و عوارض آن مرتبط است شامل تری گلیسرید، لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL)، لیپوپروتئین با چگالی متوسط (IDL)، ذرات باقی مانده و لیپوپروتئین a می باشند[Bayness D, ۱۹۹۹,۲۰۱-۲۱٦] .

1-2-1- فـیـزیـولـوژی لـیـپـوپـروتـئـیـن هـای پـلاسـمـا

تری گلیسرید موجود در رژیم غذایی به وسیله ی لیپاز پانکراس هیدرولیز می گردد. توسط سلولهای مخاط روده جذب می شود و به صورت کیلومیکرون به درون رگهای لنفاوی مزانتریک ترشح می گردد. در صورت وجود کالری اضافی در رژیم غذایی، کبد اسیدهای چرب آزاد پلاسما را نیز به تری گلیسرید تبدیل می نماید و VLDL را به درون پلاسما ترشح می کند. کیلومیکرون ها و VLDL، آپولیپوپروتئین C-ll (apo C-ll) را از لیپوپروتئین های دارای چگالی زیاد موجود در پلاسما جذب می کنند. apo C-ll پس از هیدرولیز تری گلیسرید ، شیلومیکرون ها ، VLDL، فسفولیپید،

کلسترول وآپوپروتئین های اضافی، به HDL تبدیل می شوند و سبب افزایش میزان HDL می گردند. بقایای حاصل از هیدرولیز تری گلیسرید (کیلومیکرونها) سریعا توسط کبد پاک می شود و درحالت طبیعی در پلاسما انباشته نمی گردند.

جدول۱-۱: دسته بندی و عملکرد آپو پروتئین ها

آپوپروتئین	لیپوپروتئینها	شرح
apo A-I	Chylomicrons, HDL	فعال کننده لیستین کلسترول آسیل ترانسفراز
apo A-II	Chylomicrons, HDL	افزایش فعالیت لیپاز کبدی
apo A-IV	Chylomicrons and HDL	در لیپوپروتئین غنی از تری گلیسرید وجود دارد
apo B٤٨	Chylomicrons	در شیلومیکرون هایی که ازژن apo B١٠٠ بوسیله ویرایشRNA مشتق شده اند
apo B١٠٠	VLDL, IDL, and LDL	طولانی ترین پروتئینی که در انسان شناخته شده است
apo C-I	VLDL, Chylomicrons, IDL, and HDL	احتمالا فعال کننده لیستین کلسترول آسیل ترانسفراز
apo C-II	VLDL, Chylomicrons, IDL, and HDL	فعال کننده لیپوپروتئین لیپاز
apo C-III	VLDL, Chylomicrons, IDL, and HDL	مهارکننده لیپوپروتئین لیپاز
apo D	HDL	در ارتباط نزدیک با فعال کننده لیستین کلسترول آسیل ترانسفراز
apo E [E٢, E٣,E٤]	Chylomicron remnants, VLDL ,IDL and HDL	LDL اتصال به گیرنده
apo (a)	LDL	فاکتور خطر بیماریهای زودرس عروق کرونر و سکته

روند فوق توسط آپولیپوپروتئین E (apoE) برروی سطح شیلومیکرون انجام می گردد. بدین صورت که آپولیپوپروتئین E به پروتئوگلیکان هپاران سولفات کبدی اتصال می یابد و سبب پاکسازی سریع بقایای کیلوم یکرون از جریان خون می گردد ، سپس آپولیپوپروتئین E واقع بر سطح

شیلومیکرون، به طور اختصاصی به پروتئین وابسته به گیرنده(LRP) که در غشای سلول هپاتوسیت مستقر می باشد اتصال می یابد و وارد کبد می گردد[هاریسون، ۲۰۰۱، ۳۲۵-۳۳۱].

مقداری از بقایای VLDL نیز مستقیما به وسیله کبد پاکسازی می گردد. بقیه آن به لیپوپروتئین با چگالی متوسط تبدیل می شود. IDL به طور طبیعی عمر کوتاهی دارد و در اثر عمل لیپاز به LDL تبدیل می شود که فرآورده نهایی کاتابولیسم VLDL می باشد، بر خلاف VLDL که تقریبا ۲۰ دقیقه در پلاسما باقی می ماند LDL به مدت ۲ تا ٤ روز در گردش خون می ماند. LDL به طور طبیعی ۷۰٪ کلسترول پلاسما را تشکیل می دهد. بخش اعظم پاکسازی LDL از پلاسما هنگامی اتفاق می افتد که آپوپروتئین E (apoE) واقع بر روی سطح LDL به گیرنده LDL اتصال می یابد. گیرنده های مزبور بر روی بسیاری از بافتها، بخصوص کبد استقرار دارند. لیپوپروتئین a [LP(a)] توسط کبد ترشح شده و ۱۰٪ (یا کمتر) از کل میزان لیپوپروتئین پلاسما را تشکیل می دهد . این لیپوپروتئین دارای نواحی مشابه با پلاسمینوژن می باشد و با خطر بیماری عروقی مرتبط است.

HDL توسط روده و کبد به درون پلاسما ترشح می شود. HDL کلسترول و فسفولیپیدی را که از سلول به بیرون منتقل شده اند توسط یک نوار متصل به ATP(ABC) می پذیرد. روند فوق برای تولید HDL ضروری است. کلسترول ابتدا جذب سطح HDL می شود. کلسترول بر روی سطح مزبور، سوبسترای آنزیم لسیتین- کلسترول آسیل ترانسفراز(LCAT) موجود در پلاسما می باشد. LCAT سبب انتقال یک اسیدچرب از فسفاتیدیل کولین به گروه۳- هیدروکسیل کلسترول می شود. این عمل سبب تولید استرهای کلستول می شود. این استرها از سطح هیدروفیل HDL به هسته ی مرکزی هیدروفوب HDL منتقل می گردند. بدین ترتیب سطح HDL برای پذیرش کلسترول بیشتری از سلولها یا سایر لیپوپروتئین ها آماده می شود. استرهای کلسترول موجود در هسته ی مرکزی می توانند توسط یک پروتئین پلاسما جابجا و منتقل شوند. این استرها منبع اصلی استرهای کلسترول موجود در کیلومیکرون VLDL وLDL می باشند[Devlin M,۲۰۰۲,٦۹٤-۷۷۷].

1-2-2- لیپیدها و بیماریهای عروقی

در سال ۱۹٤۸ برای اولین بار رابطه بین سطوح کلسترول سرم و خطر بیماریهای قلبی مشخص شد. تحقیقات مداخله ای در دهه ۱۹۹۰ نشانگر این حقیقت بود که، کاهش کلسترول از طریق رژیم غذایی، دارو، یا جراحی سبب کاهش خطر ایجاد و پیشرفت CHD می گردد. به طورکلی کاهش LDL- کلسترول به میزان ۱٪ با کاهش تقریبا دو درصدی بیماریهای قلبی همراه می باشد. اما ۱٪ کاهش در HDL خطر این بیماریها را ۳-٤٪ افزایش می دهد. کاربرد مهارکننده های ردوکتاز

سبب کاهش میزان LDL و کاهش میزان مرگ و میر مبتلایان به بیماری قلبی کرونر تا ۳۰٪ شده است[Wesley G,۱۹۹۹,۲۷۷٦-۲۷۸۱].

1-3-کلسترول

کلسترول پیش ساز هورمونهای استروئیدی مثل کورتیکواستروئید ها، هورمونهای جنسی، اسیدهای صفراوی و ویتامین D می باشد. کلسترول از اجزای اصلی تشکیل دهنده غشاهای سلولی است و دارای دو منشا غذایی و سنتزی می باشد. نیمی از کلسترول بدن از راه سنتز بدست می آید و محل سنتز آن در پستانداران، کبد می باشد در حالی که تمام بافت های حاوی سلولهای هسته دار قادر به سنتز کلسترول می باشند.

ساختمان اصلی کلسترول را یک هسته استرول تشکیل می دهد. کل این هسته از چندین ملکول استیل کوآ ساخته می شود. هسته استرول را می توان با افزودن زنجیره های گوناگون جانبی به کلسترول، اسید کولیک که اساس اسیدهای صفراوی ساخته شده در کبد را تشکیل می دهد و چندین هورمون مهم استروییدی که از قشر فوق کلیه ها، تخمدانها و بیضه ها ترشح می شوند تغییر داد.

[هارپر،۱۳۸٦ ، ۲۲٦-۲۵۱] , [Roskoski R, ۱۹۹٦,۱۸۷-۲۰۰]

1-3-1-بیوسنتز کلسترول

منبع تمام کربن های کلسترول استیل کوا می باشد. مراحل بیوسنتز کلسترول که استیل کوا در آن دخالت مستقیم دارد شامل پنج مرحله است:

۱ -تشکیل موالونات (یک ترکیب شش کربنه) از استیل کوا

۲ -از دست دادن کربن دی اکسید توسط موالونات و تولید واحد های شبیه ایزوپرنوئید

۳ -ترکیب شش واحده ایزوپرنوئید و تشکیل اسکوالن

٤ -تولید لانوسترول از اسکوالن

۵ -تشکیل کلسترول از لانوسترول بعد از مراحلی مثل از دست دادن سه گروه متیل [Devlin M, ۲۰۰۲, ٦۹٤-۷۷۷].

2-3-1-تنظیم سنتز کلسترول

کلسترول به آرامی از لوله گوارش جذب عروق لنفاوی روده می شود. کلسترول لوله گوارش محلول در چربی بوده اما قابلیت انحلال آن بسیار مختصر است و می تواند با اسید های چرب استر تشکیل دهد. در واقع ۷۰٪ کلسترول در لیپو پروتئینهای پلاسما به شکل استر کلسترول

است. کلسترول تنها در حیوانات یافت می شود و بیشترین مقدار آن در زرده تخم مرغ و چربی حیوانی قرار دارد. کلسترول از روده جذب می گردد و به شکل شیلومیکرون(CM) از مخاط دستگاه گوارش وارد خون می شود. کلسترول در داخل سلول سنتز و بیشتر کلسترول داخل سلولی را با مهار آنزیم HMG-CoA reductase مهار می کند. استریفیکاسیون سنتز کلسترول را افزایش می دهد و سنتز گیرنده های LDL را کاهش می دهد. تمام این مراحل با مکانیسم کنترل فیدبکی، مقدار کلسترول داخل سلولی را تنظیم می کند [Grigore L, ۲۰۰۷, ۱۲۱–۱۲۸] , [هارپر،۱۳۸٦، ۲۲٦–۲۵۱]

.

1-3-3-مسیر انتقال معکوس کلسترول

کلسترولی که از سلول خارج می شود جذب HDL می شود. بعضی از انواع HDL ها حاوی آپوپروتئین های E هستند و همراه گیرنده های LDL به دیگر سلولها متصل می شوند، آنها کلسترول را از یک سلول به سلول دیگر منتقل می کنند. شیلومیکرونها در مخاط روده در طول جذب محصولات هضم شده چربی ها از طریق لنفوتیک وارد خون می شوند. شیلومیکرونها در مویرگ با عمل پروتئین لیپاز تجزیه می شوند و به چربی های آزاد و گلیسرول تبدیل می شوند و بعد از ورود به سلولهای چربی دوباره استریفیه می شوند. شیلومیکرونها حاوی آپو پروتئین های C هستند که بعد از تخلیه تری گلیسرید در گردش خون به عنوان لیپوپروتئین غنی تحت عنوان باقیمانده شیلومیکرون باقی می مانند، این بقایا به کبد حمل می شوند و به گیرنده های خود و LDL متصل شده و سریعا وارد سلول می شوند. VLDL نیز در کبد ساخته شده و تری گلیسریدهای تشکیل شده از چربی ها و کربوهیدرات موجود در کبد را به بافت های خارج کبدی انتقال می دهند. سپس تری گلیسرید از VLDL توسط آنزیم لیپوپروتئین لیپاز جدا شده و به IDL تبدیل می شوند. IDL از طریق آنزیم پلاسمایی لسیتین کلسترول استیل ترانسفراز(LCAT) فسفولیپیدهای خود را از دست می دهد و همچنین با از دست دادن پروتئین و کلسترول بیشتر به LDL تبدیل می شود. مکانیسم دیگری که منجر به خروج کلسترول توسط HDL می شود، باند شدن HDL به قسمتهای سطحی خاصی است که به عنوان گیرنده های LDL حمل می کند. این اتصال منجر به جابجایی کلسترول داخل سلولی به غشای پلاسمایی می شود. در سلولهای محیطی کلسترول آزاد شده از طریق سیستم لنفاوی به مجرای توراسیک و سپس به جریان خون سیستمیک انتقال می یابد. کلسترول پس از استر شدن به LDL تبدیل می شود[هارپر، ۱۳۸٦، ۲۲٦–۲۵۱] , [Turley SD, ۲۰۰۲ ,S۲۹-S۳۲] .