● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌وسوم، شمارهٔ ۴، ص ۴۴۵-۴۳۶، ۱۳۹۵

مقالهٔ پژوهشی

سنجش فراوانی واریانت (T→A 2451) H817Q بر روی ژن VWF در افراد فاقد علایم نقص انعقادی

منصوره بختیاری[1]، شیرین شهبازی[2*]، مهرداد هاشمی[3]

خلاصه

مقدمه: بیماری فون ویلبراند (VWD: Von Willebrand disease)، اختلال خونریزی دهنده ناشی از نقص کمی یا عملکردی فاکتور فون ویلبراند (VWF: Von Willebrand factor) است که خونریزی جلدی- مخاطی نشانه مشترک بیماری می‌باشد. به تازگی مشخص شده است که جهش H817Q ژن VWF که پیش‌تر در بعضی جوامع عامل بیماری گزارش شده بود، در افراد سالم قومیت‌های دیگر نیز مشاهده می‌شود. در مطالعه حاضر فراوانی این واریانت در جمعیت ایرانی ارزیابی گردید.

روش: ۲۰۰ نمونه DNA از قومیت‌های مختلف ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. سابقه خونریزی یا علایم مرتبط، توسط پرسش‌نامه استاندارد سازی شده ارزیابی شد و پس از کسب رضایت و خون‌گیری از نمونه‌ها، DNA ژنومی با روش Salting out استخراج گردید. با کمک پرایمرهای اختصاصی طراحی شده PCR (Polymerase chain reaction) و با استفاده از روش RFLP (Restriction fragment length polymorphism) و آنزیم Hin1II، ژنوتیپ نمونه‌ها مشخص گردید.

یافته‌ها: با انجام هضم آنزیمی، قطعات مورد نظر بر روی ژل آگارز آشکار سازی و ژنوتیپ نمونه‌ها ثبت شد. واریانت H817Q از کل ۲۰۰ مورد DNA، در یک فرد به صورت هتروزیگوت وجود داشت که فاقد سابقه خونریزی و علایم انعقادی بود. جهت تأیید، نمونه تعیین توالی شد و فراوانی آلل H817Q ۰/۲۵ درصد محاسبه گردید.

نتیجه‌گیری: فراوانی آللی به دست آمده کمتر از ۱ درصد بود که با توجه به تعریف، نمی‌توان آن را پلی‌مورفیسم جمعیت ایرانی نامید. این میزان از نظر جغرافیایی با شیوع H817Q در مطالعات قبلی تطابق داشت. با توجه به اهمیت افتراق جهش و پلی‌مورفیسم، نتایج حاصل شده باید در تشخیص مولکولی بیماران مد نظر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: فاکتور فون ویلبراند (VWF)، انعقاد، جهش، پلی‌مورفیسم

۱- کارشناس ارشد زیست‌شناسی، گرایش ژنتیک، دانشکده علوم نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران، تهران، ایران ۲- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران ۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران، تهران، ایران

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** sh.shahbazi@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۳/۱۲ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۴/۷/۱ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۴/۷/۲۲

مقدمه

فاکتور فون ویلبراند (Von Willebrand factor یا VWF) یک گلیکوپروتئین چند زیرواحدی (Multimeric) است که نقش مهمی در انعقاد خون ایفا می‌کند. این نقش با تقویت چسبندگی پلاکت‌ها به بافت زیرعروقی (Subendothelial tissue) در محل آسیب رگ و در شرایط سرعت بالای جریان خون اعمال می‌شود. همچنین، این فاکتور به عنوان حامل اختصاصی فاکتور ۸ انعقادی (FVIII) در جریان خون عمل می‌نماید. این برهمکنش باعث حفظ FVIII از پروتئولیز سریع می‌گردد؛ به صورتی که کمبود FVIII در شرایط فقدان VWF مشاهده شده است (۱) VWF در سلول‌های اندوتلیال و مگاکاریوسیت‌ها (Megakaryocyte) تولید می‌گردد و به صورت مستقیم به گردش خون ترشح می‌شود و یا در اجسام ویبل- پالاد (Weibel-Palade) داخل سلول‌های اندوتلیال ذخیره می‌گردد تا در مواقع لزوم، حجم بالای آن در دسترس باشد. پروتئین VWF بالغ از زیرواحدهای مرتبط با پیوند دی‌سولفیدی تشکیل شده است. هر زیرواحد نیز متشکل از ۲۰۵۰ آمینواسید با جرم مولکولی ۲۷۸ کیلو دالتون است که حدود ۱۹-۱۰ درصد آن کربوهیدرات می‌باشد. هر دو زیرواحد در انتهای C به وسیله پل دی‌سولفیدی، ساختار دو زیرواحدی را تشکیل می‌دهند. پل‌های دی‌سولفید بعدی بین دو زیرواحدها، منجر به تشکیل چند زیرواحد بزرگ از حدود ۵۰۰ کیلو دالتون تا ۱۰ هزار کیلو دالتون خواهد شد (۲).

نواقص VWF انواع مختلفی از تظاهرات بالینی را تحت عنوان بیماری فون ویلبراند (Von Willebrand disease یا VWD) ایجاد می‌کند. در VWD نوع ۱، مولکول‌های VWF کامل با عملکرد طبیعی در پلاسما وجود دارند، اما از نظر کمیتی مقدار آن‌ها اندک است (۳). در VWD نوع ۳، این نقصان کمیتی به درجه شدیدی می‌رسد؛ تا حدی که غیاب کامل پروتئین VWF در خون وجود دارد (۴)؛ در حالی که میزان بیان پروتئین در VWD نوع ۲ در سطوح طبیعی است، اما پروتئین ساخته شده بنا به دلایل مختلف فاقد عملکرد صحیح می‌باشد (۵).

ژن VWF بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۲ در گستره‌ای حدود ۱۷۸ kb قرار گرفته است. این ژن شامل ۵۲ اگزون می‌باشد که بزرگ‌ترین آن‌ها اگزون ۲۸ به طول kb ۴/۱ است (۶). تعداد جهش‌های مرتبط با ژن VWF بسیار زیاد و تأثیر هر کدام از آن‌ها بر فنوتیپ بیمار متفاوت می‌باشد. یکی از این تغییرات، H817Q است که حاصل جهش CAT-CAa در اگزون ۱۹ ژن مذکور می‌باشد و در اثر آن، اسید آمینه هیستیدین تبدیل به گلوتامین می‌شود. با توجه به مطالعات صورت گرفته در سال ۱۹۹۶، از این تغییر به عنوان جهش یاد شده و عاملی برای بیماری VWD نوع ۱ در نظر گرفته شده است (۷).

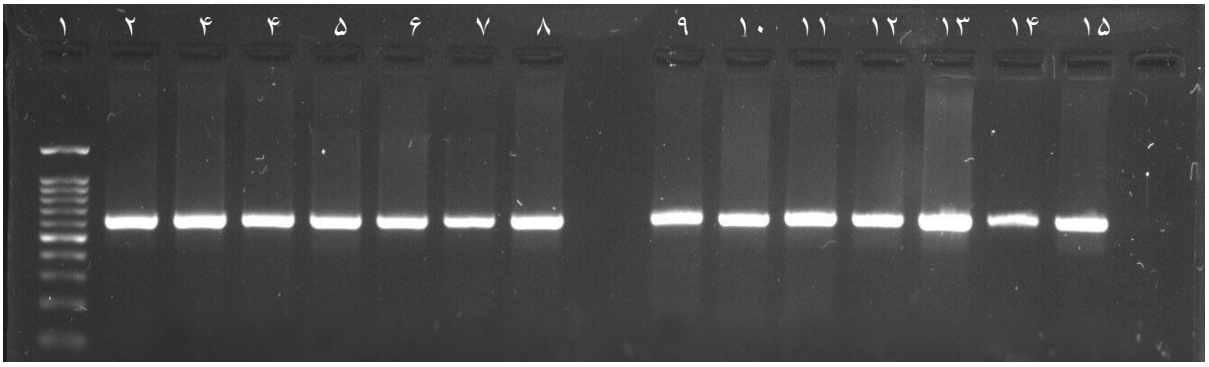
همچنین، در مطالعه دیگری بر روی یک بیمار مبتلا به نوع 2N نیز این جهش گزارش شد (۸). به‌تازگی با مطالعات بیشتری که بر روی افراد سالم انجام گرفته است، نشان داده شد که افراد غیر مبتلا به بیماری‌های انعقادی هم حامل این تغییر یا جهش هستند (۹). نتایج تحقیق Wang و همکاران با تأکید بر پلی‌مورفیسم بودن H817Q ژن VWF (۱۰)، تأیید بیشتری بر مطالعه پیشین (۹) بود. در دو مطالعه انجام گرفته (۱۰، ۹)، این تغییرات در جمعیت‌های اروپایی، آمریکایی، آسیای شرقی و آفریقایی بررسی شده است که بیشترین تفاوت در جمعیت آفریقایی مشاهده گردید. هیچ کشوری در خاورمیانه مورد مطالعه قرار نگرفته است. به دلیل اهمیت افتراق جهش و پلی‌مورفیسم در تشخیص مولکولی، مطالعه حاضر راهگشایی برای شناخت توزیع واریانت‌های ژن VWF در افراد ایرانی بود.

روش بررسی

۲۰۰ نمونه DNA از قومیت‌های مختلف ایرانی در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. محاسبه حجم نمونه با توجه به نادر بودن واریانت، بر اساس مطالعات گذشته که در ۱۴ قومیت انجام گرفته بود (۱۰)، تخمین زده شد. بر اساس پرسش‌نامه، نمونه‌گیری از افراد سالم داوطلب که فاقد سابقه خونریزی غیر عادی و کبودی مکرر یا دیگر علایم نقص انعقادی بودند، انجام شد. با رضایت کامل افراد، حدود ۵ سی‌سی خون در لوله‌های حاوی EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) جمع‌آوری و DNA با روش Salting out استخراج گردید. خلوص و غلظت DNAهای استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری مورد سنجش قرار گرفت و نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش زنجیره پلیمراز PCR (Polymerase chain reaction): پرایمرهای مستقیم و معکوس با استفاده از نرم‌افزارهای Gene runner و Primer express طراحی گردید و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی (پیشگام بیوتک، ایران) سنتز شد. توالی پرایمر مستقیم به صورت 5'-CTTTAGTTGACAGGGAGGAGC و پرایمر معکوس به صورت 5'-CCAAGCATTTCGGATAAGGGC انتخاب گردید. برای انجام واکنش، 2X PCR master mix (GenetBio) حاوی کلرید منیزیم با غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مولار در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای مستقیم و معکوس هر کدام با غلظت نهایی ۰/۴ میلی مولار و همچنین، ۴۰ نانوگرم DNA الگو برای تکمیل مخلوط واکنش اضافه گردید.

برنامه PCR شامل واسرشته سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ سیکل با برنامه ۱ دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. محصولات حاصل از PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار نشانگر ۱۰۰ جفت بازی الکتروفورز گردید. ژل به دست آمده با رنگ Simplisafe رنگ‌آمیزی شد تا باند ۶۰۲ جفت بازی مشخص شود (شکل ۱).



شکل ۱. *ژل الکتروفورز قبل از هضم آنزیمی برای بررسی کیفیت محصول PCR (Polymerase chain reaction) (نشان دهنده تکثیر قطعه ۶۰۲ جفت بازی)*

چاهک شماره ۱، ۱۰۰ جفت بازی و ستون‌های شماره ۲ تا ۱۵ محصول تک باند و چاهک شماره ۱۶ شاهد منفی را نشان می‌دهد.

RFLP (Restriction fragment length polymorphism): برای آگاهی از وجود و یا عدم وجود جایگاه برش در قطعه PCR شده، از آنزیم برش دهنده Thermo Scientific Hin1II با غلظت ۵ واحد در هر میکرولیتر استفاده شد. جهت آماده‌سازی مخلوط واکنش RFLP، ۵ میکرولیتر محصول PCR به همراه ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم، ۱ میکرولیتر بافر آنزیم و آب دیونیزه در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر آماده شد و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار و سپس بر روی ژل ۲ درصد بارگذاری گردید. نتایج به دست آمده بر اساس اندازه نشانگر تفسیر و در هر بار الکتروفورز، یک نمونه هضم نشده برای مقایسه بارگذاری شد. به منظور تأیید تشخیص، تعدادی از نمونه‌ها به صورت تصادفی انتخاب و تعیین توالی گردید. لازم به ذکر است، با توجه به این که این جهش تاکنون در ایران شناسایی و گزارش نشده بود و امکان دسترسی به نمونه‌های خارج از کشور نیز فراهم نبود، در تحلیل‌ها شاهد مثبت لحاظ نشد.

نتایج

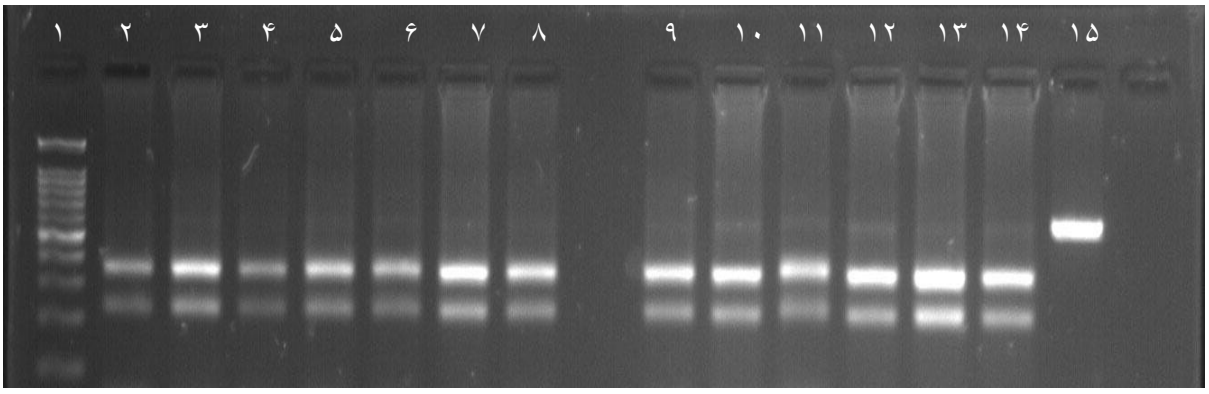
بررسی ژنوتیپی واریانت H817Q ژن VWF

پس از استخراج DNA، با استفاده از پرایمرهای مستقیم و معکوس، ناحیه ژنی مربوط به واریانت H817Q ژن VWF توسط PCR تکثیر و سپس تحت هضم آنزیمی قرار گرفت. پس از رنگ‌آمیزی، نوع واریانت و ژنوتیپ هر فرد از طریق باندهای مشاهده شده تعیین گردید. جدول ۱ تفکیک اندازه باندها پس از هضم آنزیمی جهت تعیین ژنوتیپ را نشان می‌دهد.

لازم به ذکر است که یک قطعه ۴۱ جفت بازی در هر سه نوع ژنوتیپ تحت تأثیر آنزیم برش خورد و جدا شد که بر روی ژل آگارز از دایمر پرایمر قابل تفکیک نبود. شکل ۲ نمای مربوط به ژل الکتروفورز بعد از هضم آنزیمی را نشان می‌دهد.

جدول ۱. *تفکیک اندازه باندها بعد از هضم آنزیمی جهت تعیین ژنوتیپ افراد*

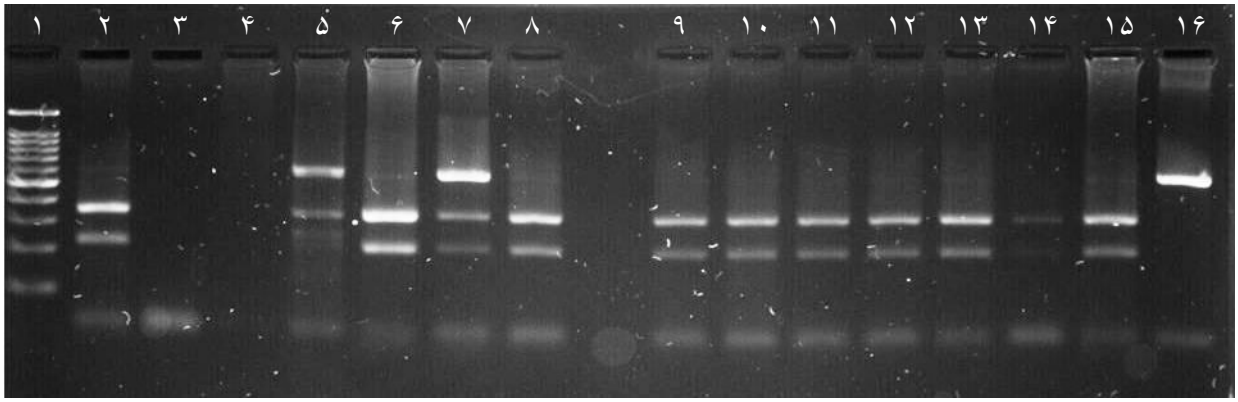
واریانت H817Q	تعداد باندها	اندازه باندها
هموزیگوت TT	۲ باند	۳۳۹ و ۲۲۲ جفت باز
هتروزیگوت TA	۳ باند	۳۳۹، ۲۲۲ و ۵۶۱ جفت باز
هموزیگوت AA	۱ باند	۵۶۱ جفت باز



شکل ۲. *ژل الکتروفورز بعد از هضم آنزیمی*

چاهک شماره ۱، نشانگر ۱۰۰ جفت بازی و چاهک‌های شماره ۲ تا ۱۴ مربوط به نمونه‌های برش خورده با آنزیم است که تمام نمونه‌ها نشان دهنده ژنوتیپ TT می‌باشد. چاهک ۱۵ مربوط به نمونه هضم نشده است که جهت بررسی و مقایسه با سایر جایگاه‌ها بارگذاری شده است.

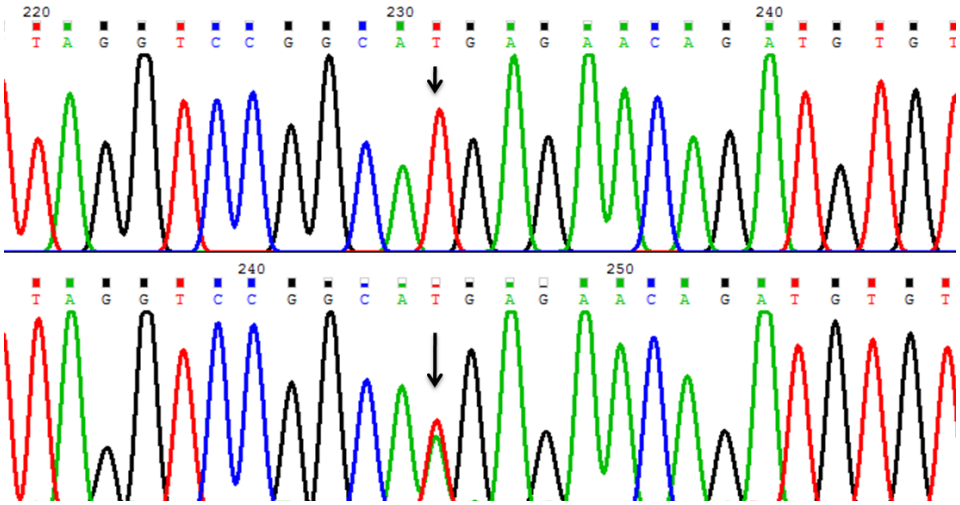
در صورتی که نمونه‌هایی با ژنوتیپ هتروزیگوت AT وجود داشته باشد، علاوه بر باندهای ۳۳۹ و ۲۲۲ جفت بازی، باند ۵۶۱ جفت بازی که ویژگی آلل A می‌باشد نیز مشاهده گردید. شکل ۳ تنها موردی را که با ژنوتیپ هتروزیگوت AT یافت شده است، در مقایسه با ژنوتیپ TT نشان می‌دهد.



شکل ۳. *ژل الکتروفورز بعد از هضم آنزیمی*

چاهک شماره ۱، ۱۰۰ جفت بازی و چاهک‌های شماره ۲، ۶، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۵ ژنوتیپ TT، چاهک شماره ۷ ژنوتیپ TA و چاهک شماره ۱۶ نمونه هضم نشده را نشان می‌دهد. نمونه‌های چاهک‌های ۳، ۴، ۵ و ۱۴ فاقد نتایج مناسب در این بارگذاری بوده و در بارگذاری‌های بعدی تکرار شده‌اند.

جهت تأیید نتایج PCR-RFLP، نمونه‌ها برای انجام تعیین توالی آماده‌سازی شدند. برای هر واکنش، PCR جدیدی به حجم ۵۰ میکرولیتر انجام و بدون تیمار با آنزیم جهت تعیین توالی ارسال گردید. تغییر مورد انتظار 2451T → A بود که در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ٤. *نتایج تعیین توالی برای ژنوتیپ هتروزیگوت* $T \rightarrow A$ *٢٤٥١*

فراوانی واریانت H817Q ژن VWF

از کل ۲۰۰ مورد DNA مورد بررسی، واریانت H817Q در یک مورد به صورت هتروزیگوت مشاهده شد. نمونه‌های مشکوک دوباره آنالیز گردید و نتایج مورد تأیید قرار گرفت. با وجود پرسش‌نامه قبلی که از این فرد تهیه شده بود، با وی تماس گرفته شد و در خصوص علایم احتمالی، مصاحبه صورت گرفت. تکمیل پرسش‌نامه جدید نیز نشان داد که این فرد سابقه خونریزی و علایم انعقادی نداشته است. بیمار مورد نظر خانمی ۴۸ ساله می‌باشد که برای بررسی قند خون به آزمایشگاه مراجعه کرده بود (به دلیل ابتلا به دیابت نوع ۲ خفیف). قند وی کنترل شده و میزان آن مناسب بود. همچنین، بیمار هیچ گونه سابقه سرطان و بیماری خونریزی دهنده در خانواده نداشت و سیگاری هم مصرف نمی‌کرد. فراوانی محاسبه شده آلل H817Q در مطالعه حاضر ۰/۲۵ درصد به دست آمد. این میزان از ۱ درصد کمتر است و با توجه به تعریف، نمی‌توان آن را پلی‌مورفیسم جمعیت ایرانی نامید.

بحث

VWD شایع‌ترین اختلال خونریزی دهنده ارثی می‌باشد که در جمعیت‌های چند اقلیتی با سابقه ازدواج فامیلی بیشتر گزارش شده است (۱۱). این بیماری ناشی از نواقص VWF، گلیکوپروتئین بزرگ و چند زیرواحدی است که در پلاسما به دیواره‌های آسیب دیده رگ می‌چسبد و نقش واسطه را برای چسبیدن پلاکت به لایه درون رگی در محل جراحت ایفا می‌کند. تغییرات ژنی VWF می‌تواند منجر به اختلال در بیوسنتز، ترشح، پاکسازی و فعالیت چسبندگی VWF شود (۱۲). پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphism یا SNP) نیز جزء عوامل تأثیرگذار بر سطح آنتی‌ژن VWF و فعالیت FVIII در افراد سالم می‌باشد. بعضی از این SNPهای قرار گرفته بر روی ژن VWF، حتی با عملکرد معکوس، موجب افزایش خطر ترومبوز می‌شود (۱۳).

در یک مطالعه، بیمار مبتلا به فون ویلبراند 2N مورد بررسی قرار گرفت. در این بیمار، VWF در حدود آستانه طبیعی قرار داشت؛ در حالی که FVIII به طور قابل توجهی کاهش یافت. بررسی‌های بیشتر مشخص کرد که توانایی VWF در تشکیل کمپلکس با فاکتور FVIII در شرایط آزمایشگاهی کاهش محسوسی داشته است. تعیین توالی نوکلئوتیدی نیز تأیید کننده انتقال T به A در نوکلئوتید ۲۴۵۱ در هر دو آلل بود. این تغییر باعث تعویض گلوتامین با هیستیدین در اسید آمینه ۸۱۷ در زیرواحد بالغ VWF می‌شود (۸).

در تحقیق دیگری، خانم بیمار ۳۶ ساله‌ای با اختلال خونریزی دهنده ملایم معرفی گردید. تشخیص این فرد VWD نوع ۱ بود. البته ارثی بودن بیماری در این بیمار قابل تشخیص نبود؛ چرا که به فرزند خواندگی پذیرفته شده بود. زمان فعالیت نسبی ترومبوپلاستین (Activated partial thromboplastin time یا APTT) در محدوده طبیعی قرار داشت و VWF حدود ۲۰ u/dl اندازه‌گیری شد. توزیع چند زیرواحدی نیز الگوی طبیعی را نشان می‌داد. بررسی‌های تکمیلی ژنتیکی مشخص کرد که بیمار به صورت هتروزیگوت واجد جهش T→A ۲۴۵۱ می‌باشد (۷).

مطالعه Bellissimo و همکاران نشان داد، جهش‌هایی که پیش‌تر عامل مؤثری در پیدایش VWD در اروپاییان شناخته می‌شدند، در بین سرخپوستان آمریکای شمالی ۲۰ درصد فراوانی داشتند. این تحقیق بر روی ۱۸۴ فرد سالم، شامل ۱۱۸ سفیدپوست و ۶۶ سیاه‌پوست آمریکایی صورت گرفت. نتایج حاکی از آن بود که فراوانی سه جهش R2185Q، H817Q و M740I در جمعیت سالم ۱۵ تا ۱۸ درصد بود. بدین ترتیب جهش‌هایی که قبل از آن بیماری‌زا اعلام شده بود، به عنوان پلی‌مورفیسم‌هایی در

سیاه‌پوستان آمریکایی معرفی گردید. آنان پیشنهاد کردند که بعضی واریانت‌های ژن VWF ممکن است در اروپاییان به صورت بیماری‌زا و در دیگر قومیت‌ها فاقد اثر ایجاد بیماری باشد (۹).

مطالعات دیگری جهت تأیید این نظر، به بررسی توزیع فراوانی جهش‌های گزارش شده قبلی در جمعیت‌های سالم مختلف دنیا پرداختند؛ به طوری که در تحقیق جدیدی، تنوع آللی ژن VWF در نمونه‌ها و داده‌های مختلف پروژه 1000G بر روی ۱۰۹۲ فرد از ۱۴ وراثت و قومیت متفاوت و از چهار قاره بررسی گردید. با بررسی حدود ۲۰۰ نفر از هر قومیت مشاهده شد که شیوع جهش H817Q در نژاد آفریقایی ۱۳/۸۲ درصد و در نژاد آمریکایی ۰/۲۸ درصد بود. در اروپایی‌ها و آسیایی‌ها که به طور عمده از شرق دور بودند، هیچ موردی از این جهش مشاهده نشد (۱۰).

در مجموع، نتایج بررسی‌ها نشان داد که ژن VWF واجد تنوع ژنتیکی است؛ به صورتی که این پیچیدگی وراثتی و سهم آن در بیماری‌ها نیازمند مطالعات بیشتر در گروه‌های مختلف جمعیتی می‌باشد. این تحقیقات می‌تواند پنل‌های تشخیص مولکولی VWD را با در نظر گرفتن تنوع وراثتی آن تکمیل کند تا در پیش‌بینی فنوتیپ خونریزی و نقص انعقاد مؤثرتر عمل نماید.

در مطالعه حاضر که بر اساس مطالعه Wang و همکاران (۱۰) انجام شد، ابتدا پرسش‌نامه‌ای بر اساس همان پرسش‌هایی که در مطالعه آنان استفاده شده بود، طراحی گردید. هر دو پرسش‌نامه بر مبنای «نشانگرهای بالینی و مولکولی اروپایی» برای مطالعه تشخیص و مدیریت VWD نوع ۱ (MCMDM-1VWD) و نیز چند پرسش اضافی منحصر به ZPMCB-VWD طراحی شدند (۱۴).

بر همین اساس، حجم نمونه ۲۰۰ نفر طراحی گردید. نتایج گزارش کرد که واریانت H817Q از کل ۲۰۰ مورد DNA مورد بررسی، در یک مورد به صورت هتروزیگوت وجود دارد. از آن‌جا که ژن VWF اتوزومال می‌باشد، پس هر فرد واجد دو آلل است که در نهایت ۴۰۰ آلل بررسی گردید که از میان آن‌ها تنها یک آلل واجد جهش بود. فراوانی آلل H817Q در مطالعه حاضر ۰/۲۵ درصد به دست آمد. این میزان از ۱ درصد کمتر است و با توجه به تعریف پلی‌مورفیسم، نمی‌توان آن را پلی‌مورفیسم جمعیت ایرانی نامید. این میزان از نظر جغرافیایی با میزان شیوع H817Q در مطالعه Wang و همکاران (۱۰) قابل پیش‌بینی بود.

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که یک جهش واحد می‌تواند در جمعیت‌های مختلف فنوتیپ‌هایی با وخامت غیر همسان ایجاد کند. این تفاوت می‌تواند ناشی از عوامل محیطی و یا ژن‌های متعادل کننده (Modifier genes) باشد (۱۵). در خصوص VWF، اثر سیستم گروه خونی ABO در این ناهمگونی مورد تأیید قرار گرفته است (۱۶). مطالعات بیشتر برای تأیید نوع عملکرد جهش، تکمیل کننده تحقیق حاضر خواهد بود.

از آن‌جا که از خاورمیانه هیچ کشوری مورد مطالعه قرار نگرفته بود، تحقیق حاضر در نوع خود حایز اهمیت می‌باشد. به دلیل شیوع بالای این بیماری در جمعیت‌های با ازدواج فامیلی و اهمیت افتراق جهش و پلی‌مورفیسم در تشخیص مولکولی، امید است که این مطالعه راهگشایی برای شناخت توزیع واریانت‌های این ژن در بیماران ایرانی باشد.

References

1. Yee A, Kretz CA. Von Willebrand factor: form for function. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40(1): 17-27.
2. Springer TA. Von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood* 2014; 124(9): 1412-25.
3. Sadler JE. Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood* 2003; 101(6): 2089-93.
4. Shahbazi S, Mahdian R, Ala FA, Lavergne JM, Denis CV, Christophe OD. Molecular characterization of Iranian patients with type 3 von Willebrand disease. *Haemophilia* 2009; 15(5): 1058-64.
5. James PD, Lillicrap D. von Willebrand disease: clinical and laboratory lessons learned from the large von Willebrand disease studies. *Am J Hematol* 2012; 87(Suppl 1): S4-11.
6. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Lester-Mancuso TL, Le Beau MM, Sorace JM, et al. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* 1991; 30(1): 253-69.
7. Kroner PA, Foster PA, Fahs SA, Montgomery RR. The defective interaction between von Willebrand factor and factor VIII in a patient with type 1 von Willebrand disease is caused by substitution of Arg19 and His54 in mature von Willebrand factor. *Blood* 1996; 87(3): 1013-21.
8. Rick ME, Krizek DM. Identification of a His54Gln substitution in von Willebrand factor from a patient with defective binding of factor VIII. *Am J Hematol* 1996; 51(4): 302-6.
9. Bellissimo DB, Christopherson PA, Flood VH, Gill JC, Friedman KD, Haberichter SL, et al. VWF mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the African-American population. *Blood* 2012; 119(9): 2135-40.
10. Wang QY, Song J, Gibbs RA, Boerwinkle E, Dong JF, Yu FL. Characterizing polymorphisms and allelic diversity of von Willebrand factor gene in the 1000 Genomes. *J Thromb Haemost* 2013; 11(2): 261-9.
11. Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, Will A, Tait RC, Goodeve A, et al. The diagnosis and management of von Willebrand disease: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014; 167(4): 453-65.
12. Shahbazi S, Baniahmad F, Zakiani-Roudsari M, Raigani M, Mahdian R. Nonsense mediated decay of VWF mRNA subsequent to c.7674-7675insC mutation in type3 VWD patients. *Blood Cells Mol Dis* 2012; 49(1): 48-52.
13. Shahbazi S, Alavi S, Mahdian R. Classification of exon 18 linked variants of VWF gene in von Willebrand disease. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2012; 3(1): 77-83.
14. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, Goodeve A, Federici AB, Batlle J, et al. A

quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost* 2006; 4(4): 766-73.

15. Genin E, Feingold J, Clerget-Darpoux F. Identifying modifier genes of monogenic disease: strategies and difficulties. *Hum Genet* 2008; 124(4): 357-68.
16. Franchini M, Crestani S, Frattini F, Sissa C, Bonfanti C. ABO blood group and von Willebrand factor: biological implications. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52(9): 1273-6.

Frequency Assessment of the H817Q (2451T→A) Variant of von Willebrand Gene in Individuals without Hemorrhagic Signs

Mansoureh Bakhtiari, M.Sc.[1], Shirin Shahbazi, Ph.D.[2*], Mehrdad Hashemi, Ph.D.[3]

1. Department of Molecular Genetics, Tehran Medical Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3. Associate Professor, Department of Molecular Genetics, Tehran Medical Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: sh.shahbazi@modares.ac.ir

(Received: 1 June 2015 Accepted: 13 Oct. 2015)

Abstract

Background and Aims: Von Willebrand disease is a bleeding disorder caused by quantitative or functional defects in von Willebrand factor. The disease is found in up to 1 percent of the population. The most common symptom is mucocutaneous bleeding. Recently, studies conducted on healthy people showed that the H817Q mutation that previously known to cause von Willebrand disease was seen in the normal individuals. This study aimed to evaluate the frequency of H817Q variant of von Willebrand gene in Iranian healthy individuals.

Methods: 200 DNA samples from different Iranian ethnicities were tested. The subjects were interviewed for bleeding history and other relative symptoms. DNA was extracted from 5 ml blood samples using salting out method, following written informed consent. Using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method, the samples were genotyped by Hin1II enzyme and the results were confirmed via sequencing.

Results: The desired fragments were obtained using PCR-RFLP. One individual without any bleeding history was found to carry this allele in a heterozygote manner. The allele frequency was calculated as 0.25%.

Conclusion: The calculated allele frequency was below 1% and thereby could not be considered as a polymorphism. Von Willebrand gene contains various mutation and polymorphisms which are population specific. To understand the Iranian pattern, more studies should be done to reveal this characteristic.

Keywords: Von Willebrand factor, Coagulation, Mutation, Polymorphism

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23(4): 436-445