●مجلة دانشگاه علوم پزشكي بابل، دوره هشتم، شمارة ۴، مرداد - شهريور ۱۳۸۵، صفحه ۸۹-۸۱
دريافت: ۸۴/۸/۲۴، ارسال جهت اصلاح: ۸۴/۱۰/۷، پذيرش: ۸۵/۱/۳۰

بررسی فنوتیپی و آنالیز مولکولی بیماران مبتلا به فون ویلیبرانت تیپ یک

سیدمحمدباقر هاشمی سوته[1*]، نوراله رضائی[2]، آن گودیو[3]

۱- استادیار گروه ژنتیک دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران ۲- دانشیار گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی مازندران ۳- استاد گروه هماتولوژی مولکولی دانشگاه شفیلد انگلستان

سابقه و هدف: بیماری فون ویلیبرانت از شایع ترین بیماری ارثی خونریزی دهنده ناشی از کمبود فاکتور فون ویلیبرانت با توارث اتوزومی غالب می باشد. این بیماری به سه دسته تیپ ۱ و تیپ ۳ (نقص کمی) و تیپ ۲ (نقص کیفی) تقسیم بندی می گردد. تیپ یک دارای علائم خفیف تری نسبت به تیپ ۳ می باشد. هدف این مطالعه تعیین
جهش های عامل تیپ یک این بیماری می باشد.

مواد و روشها: از خانواده های بیماران مبتلا به فون ویلیبرانت (VWD)، DNA استخراج و بکمک۶۳ PCR ژن فون ویلیبرانت تکثیر گردید. سپس قطعات PCR به کمک غربالگری CSGE، آنالیز و نهایتا قطعات PCR دارای باند های اضافه با روش DNA Sequencing تعیین توالی گردیدند.

یافته ها: در ۲۳ فرد مبتلا در شش خانواده، میانگین آنتی ژن فون ویلیبرانت برابر با ۳۵/۱۸ و میانگین فعالیت فون ویلیبرانت برابر با ۳۱/۴ واحد/ دسی لیتر بدست آمده است. موتاسیون در ۴ خانواده از شش خانواده مورد شناسائی قرار گرفت. جهش آرژنین ۱۲۰۵ به هیستیدین در دو خانواده و دو جهش جدید که قبلا گزارش نشده بود شامل اسید آمینه گلایسین شماره ۱۹ به آرژنین (G۱۹ R) در اگزون شماره ۲ و موتاسیون نوکلئوتید شماره۲۸۲۱ گوانین به آدنین (G>A) در محل برش اگزون- اینترون ۲۱ به ترتیب در دو خانواده دیگر در این مطالعه یافته شده و در دو خانواده دیگر هیچگونه جهشی بافت نشد.

نتیجه گیری: یافته های این *تحقیق نشان داد که* جهش های متفاوتی در خانواده های مختلف، عامل ایجاد این بیماری می باشند.

واژه های کلیدی: ***بیماری فون ویلیبرانت، تعیین جهش، بررسی مولکولی.***

مجلة دانشگاه علوم پزشكي بابل، دوره هشتم، شمارة ۴، مرداد - شهريور ۱۳۸۵، صفحه ۸۹-۸۱

مقدمه

بیماری فون ویلیبرانت از شایع ترین بیماری ارثی خونریزی دهنده و ناشی از کمبود فاکتور فون ویلیبرانت است. این بیماری در سال ۱۹۲۴ توسط یک پزشک فنلاندی به نام اریک فون ویلیبرانت در یک خانواده واقع در خلیج بوتنیای کشور فنلاند گزارش گردید. شرایط به ارث رسیدن این بیماری یک نوع توارث ارثی اتوزومی غالب را به جای وابسته بهX پیشنهاد می کرد و خونریزی بیشتر در سطح زیر جلدی نسبت به خونریزی

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.14.4]

مفاصل و بافت های عمیق (در مقایسه با فرم های کلاسیک هموفیلی) بود آنرا متمایز می نمود (۲و۱). فاکتور فون ویلیبرانت یکی از فاکتورهای مهم انعقادی در گردش خون است و دارای دو نقش عمده می باشد. ۱) اتصال پلاکتها به جدار رگ در محل بریدگی و خونریزی ۲) اتصال به فاکتور هشت انعقادی (فاکتور ضد هموفیلی) و ثبات آن در گردش خون. نقص یا کمبود فاکتور فون ویلیبرانت سبب ایجاد بیماری فون ویلیبرانت می گردد. فراوانی بیماران از ۳ تا ۴ در ۱۰۰۰۰۰ تا ۱/۳% در جمعیت های مختلف گزارش شده است(۵-۳). این بیماری بسته به ماهیت آن به سه دسته کلی: تیپ ۱ و تیپ ۳ (نقص کمی) و تیپ ۲ (نقص کیفی) تقسیم بندی می گردد(۷و۶). در تیپ ۳ که شدید ترین حالت این بیماری است و در مواردی منجر به مرگ بیماران در اثر خونریزی می گردد فاکتور فون ویلیبرانت وجود نداشته یا به میزان خیلی ناچیز موجود است(صفر تا ۵%). در تیپ ۱ بیماری که تا حدود ۷۰ درصد از این بیماران را شامل می شود, میزان فاکتور بین ۱۵ تا ۵۰ درصد تولید شده و بیماران دارای علائم خفیف تری نسبت به تیپ ۳ می باشند(۸و۶).

ژن فون ویلیبرانت با طول ۱۷۸ کیلو باز, از جمله ژنهای خیلی بزرگ انسان و دارای ۵۲ اگزون است که بر روی کروموزوم ۱۲ (۱۲P۱۳,۳) واقع شده است. حاصل فعالیت این ژن یک mRNA به طول ۸,۸ کیلو باز است که الگوی سنتز پروتئین فون ویلیبرانت (VWF) با طول ۲۸۱۳ اسید آمینه می باشد. اگزون ۲ کد کننده peptide signal و اگزون ۳ تا ۱۷ سازنده پروپپتید و نهایتا اگزون ۱۸ تا ۵۲ سازنده زیر واحد بالغ پروتئین هستند. همچنین یک "ژن کاذب" ناکامل فون ویلیبرانت با طول ۲۱ هزار باز از اگزون ۲۳ تا ۳۴ با شباهت ۹۷% با ژن VWF بر روی کروموزوم ۲۲ (22p12-pter) واقع شده است.

مطالعات زیادی تا بحال جهت تعیین موتاسیون های مربوط به ژن فون ویلیبرانت انجام شده است که اکثر آنها مربوط به تعیین موتاسیون در تیپ های دوم و سوم این بیماری بوده است(۱۳-۱۱). در مجموع ۲۰۹ موتاسیون مختلف در ژن فون ویلیبرانت به کمک مطالعات متعدد و مجزا تابحال معین و گزارش شده است که لیست کامل آنها در سایت انگلیسی مربوط به ژن فون

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.14.4]

ویلیبرانت به آدرس http://www.shef.ac.uk/vwf/ موجود می باشد (۱۴).

ماهیت این جهش ها در تیپ یک ناشناخته مانده است. به همین دلیل در سالهای اخیر این بیماری به طور گسترده ای مورد توجه محققین قرار گرفته است. این مطالعه بخشی از پروژه اروپائی بر روی بیماران تیپ یک فون ویلیبرانت به منظور بررسی های بالینی و مولکولی می باشد که نتایج آن در اینجا ارائه گردیده است.

مواد و روشها

بیماران در این مطالعه تماما دارای سوابق شخصی و خانوادگی بیماری فون ویلیبرانت تیپ یک بوده اند و حداقل دو نفر در هر خانواده به عنوان مبتلا گزارش شده اند. ۴ خانواده اروپائی و ۲ خانواده غیر عرب تبار فلسطین اشغالی در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته اند. ۴ خانواده اروپائی شامل یک خانواده هلندی، یک خانواده فرانسوی و دو خانواده انگلیسی بوده است. همچنین یک فرد نرمال اروپائی به عنوان کنترل انتخاب گردید. اطلاعات و نمونه های خون افراد هر خانواده از طریق یک مطالعه چند مرکزی جمع آوری شد و نمونه آنها مورد استفاده قرار گرفت.

DNA ژنومي از خون محيطي از هر فرد به کمک کیت Nucleon BACC II استخراج گردید (Nucleon Bioscience , UK). PCR با کمك DNA ژنومي به کمك دستگاه ترموسیکلر (Perkin-Elmer 480) در حجم هاي ۵۰ میکرولیتر صورت گرفت. تمامي ناحیه کد کننده ۵۲ اگزون و نواحي حد فاصل اگزون- اینترون به اضافه ناحیه ´3 ژن VWF با استفاده از ترکیب زیر تکثیر گردید: ترکیب پیش آماده برای PCR با غلظت هاي ۱/۵، ۲/۵ و ۴/۵ mMol از Mgcl2 (AB gene, UK) بهمراه ۵۰ نانومولار از پرایمر مربوطه مورد استفاده قرار گرفت(۱۶و۱۵).

نمونه ابتدا در حرارت ۹۷ درجه براي ۵ دقیقه دناتوره شد، سپس مراحل تکثیر به صورت ۹۵ درجه، ۶۰ ثانیه و مرحله اتصال پرایمر (annealing) به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله تکثیر در ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. پرایمرها به گونه اي طراحي گردیدند که قطعات PCR با اندازه ۲۰۰ تا ۵۱۵ باز نوکلئوتید را ایجاد کرد (۱۸و۱۷).

برای بررسی ژن فون ویلیبرانت و تعیین موتاسیون این ژن در بیماران، روش غربالگری CSGE (Conformation Sensitive Gel) Electrophoresis

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.14.4]

مورد استفاده قرار گرفت و سپس PCR های با باند اضافه بوسیله روش DNA Sequencing بررسی شد. همچنین روش دستی CSGE(M-CSGE; CSGE Manual) در این مطالعه برای اولین بار برای ژن VWF در دنیا به صورت روش ماشینی به نام فلوئورسانت CSGE (F- CSGE; CSGE Fluerscent) پایه گذاری شد(۱۶و۱۵).

در روش دستی CSGE روش ویلیامز و همکاران مورد استفاده قرار گرفت(۱۹). به طور خلاصه ۵ میکرو لیتر از محصول PCR از هر بیمار با میزان مشابه آن از کنترل نرمال ترکیب گردید. سپس نمونه در دماي ۹۸ درجه براي ۵ دقیقه و سپس در دماي ۶۵ درجه براي ۳۰ دقیقه انکوبه شد تا هترودوپلکس تشکیل گردد ۵ تا ۲۰ میکرو لیتر از نمونه هترودوپلکس شده سپس در ژل۱۰%CSGE مورد استفاده قرار گرفت. الکتروفورز به صورت ۱۰ ولت بر سانتیمتر براي ۱۷ ساعت انجام گردید و نهایتا باندهاي DNA با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزي و مشاهده شد.

در روش (F- CSGE) به کمک دستگاه DNA Sequencer مدل"ABI ۳۷۷" با نشاندار کردن پرایمرها توسط رنگ های فلوئورسانت انجام گردید. نتایج حاصل از هر دو روش (M-CSGE و F- CSGE) جهت بررسی قطعات ژن در افراد شاخص خانواده های مورد مطالعه مورد استفاده قرار گرفت(۲۰).

محصول PCR با باندهای اضافه و غیر نرمال در طی آزمایش CSGE مجدداً با استفاده از پرایمرهاي معمولي فاقد فلوئورسانت نشان دار تکثیر شد(۱۶و۱۴). سپس توسط دستگاه DNA Sequencer مدل ABI 377 به کمك ماده Big Dye Terminator (Version 3.0) از شرکت Applied Biosystems بر اساس دستورالعمل کمپاني تعیین توالي گردیدند. هر قطعه ازPCR به کمک پرایمر های مستقیم و معکوس (Forward & Reverse) در دو جهت تعیین توالي گردید و توالی بدست آمده با کمك نرم افزار Blast 2 بررسی شد.

یافته ها

افراد شاخص از ۴ خانواده اروپائی و ۲ خانواده فلسطین اشغالی در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. شجره نامه های این خانواده ها در شکل ۱ دیده می شود. در هر خانواده حداقل ۲ نفر یا بیشتر از اعضای خانواده مبتلا می باشند. علائم بالینی (وضعیت فنوتیپی) خانواده ها، میزان فاکتورهای فون ویلیبرانت و فاکتور هشت و همچنین بررسی

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.14.4]

ژنتیکی وضعیت ژن فون ویلیبرانت در اعضای این خانواده ها در جدول های جداگانه (جدول ۱ تا ۳) در این بخش آمده است.

بررسی ژنتیکی خانواده های مورد مطالعه:

افراد شاخص یا پروباند از ۴ خانواده اروپائی و ۲ خانواده فلسطین اشغالی بهمراه یک فرد نرمال به عنوان کنترل انتخاب و نمونه DNA آن مورد استفاده قرار گرفت. ناحیه کد کننده ژن فون ویلیبرانت(VWF) به همراه منطقه ٔ۵ و ٔ۳ژن و همچنین مناطق حد فاصل اینترون- اگزون در هر فرد به کمک ۶۳ PCR مختلف تکثیر شد(۲۰) و به کمک روشهای ذکر شده در بخش مواد و رشها مورد بررسی مولکولی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی(جدول ۳) وجود موتاسیون در ژن فون ویلیبرانت در چهار خانواده را نشان داده است. در دو خانواده دیگر هیچ جهشي در ژن مذکور دیده نشده است.

جدول ۱. علائم بالینی (وضعیت فنوتیپی) خانواده های مورد مطالعه

علائم خونریزی	خانواده اول	خانواده دوم	خانواده سوم	خانواده چهارم	خانواده پنجم	خانواده ششم
خونریزی از بینی	x				x	x
خونریزی سطحی و زیر جلدی					x	x
خونریزی از بریدگی		x	x			x
خونریزی دوران پریودی					x	x
خونریزی از دهان ودندان					x	x
خونریزی از دستگاه گوارش					x	x
خونریزی هنگام کشیدن دندان	x					
خونریزی هنگام جراحی یا زایمان			x	x		

جدول۱. خصوصیات فنوتیپی شش خانواده مبتلا به تیپ یک بیماری فون ویلیبرانت

افراد	VWF:Ag (IU/dl)	VWF:Rco (IU/dl)	FVIII:C (IU/dl)	گروه خون ی

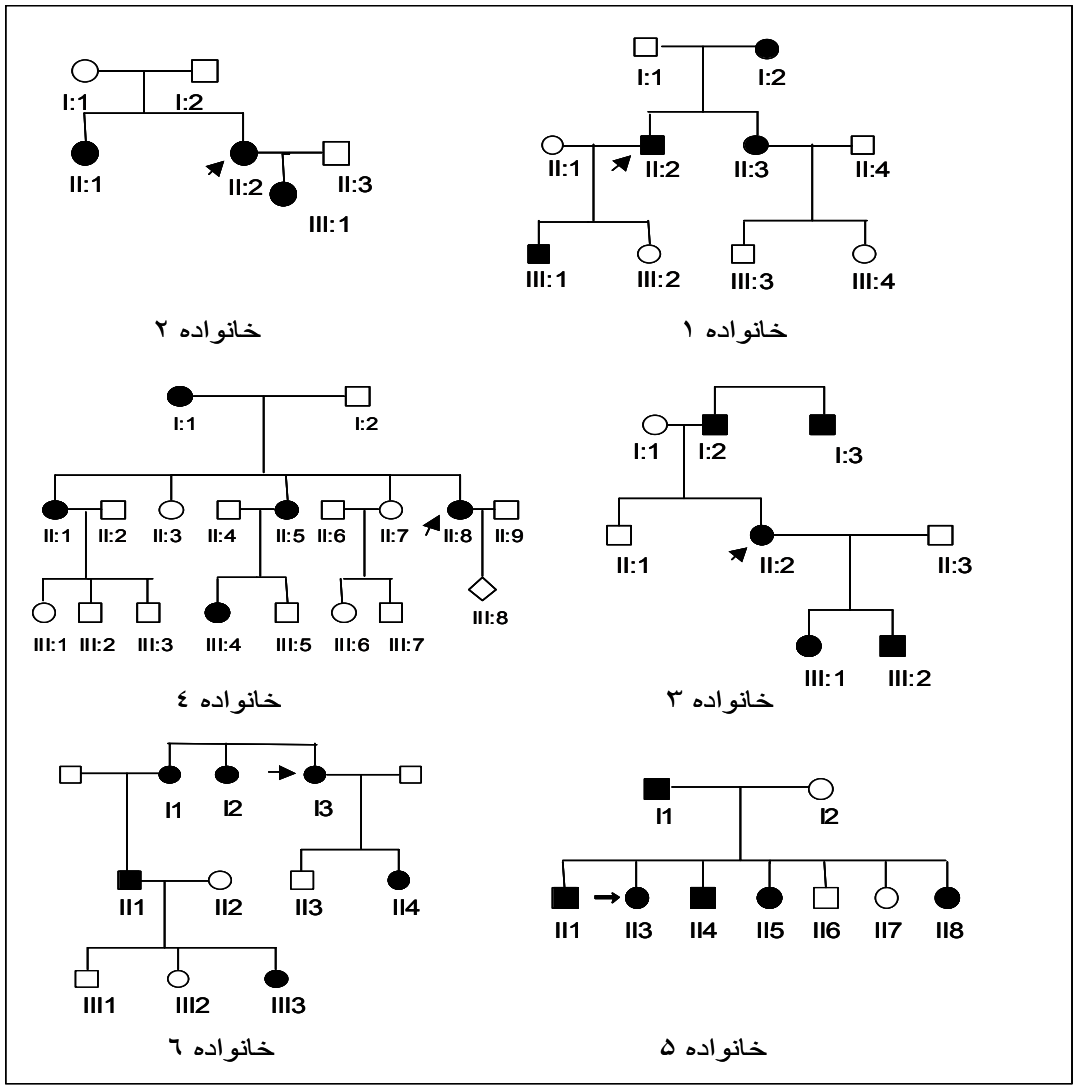
[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.14.4]

خانواده اول				
I:1	ND	ND	ND	B/O
I:2	۴۶	۶۰	۱۰۰	A/B
II:1	ND	۳۰	۹۲	O/O
II:2	۹/۵	۵	۱۱	B/B
II:3	۷/۵	۴	۱۶	ND
III:1	۱۰<	۵	۲۸	B/O
III:2	۷۰	۶۰	۱۲۹	B/O
III:3	۶۶	ND	۶۷	ND
III:4	۸۹	ND	۱۹۰	ND
خانواده دوم				
II:1	۵۴	۴۵	۶۰	A/O
II:2	۶۴	۵۷	۵۲	A/O
III:1	۴۵	۴۸	۵۷	ND
خانواده سوم				
I:3	۱۰<	۱۰<	۲۵	O/O
II:1	۸۵	۸۰	۱۰۵	O/O
II:2	۱۰	۱۰	۱۴	O/O
II:3	ND	ND	ND	A/O
III:1	۱۰	۱۰	۲۹	O/O
III:2	۱۰	۱۰	۲۱	A/O
خانواده چهارم				
I:1	۶۳	۶۱	۸۰	ND
II:5	۳۶	۱۹	۸۷	O/O
II:7	۷۵	۶۵	۶۸	O/O
II:8	۴۰	۴۰	۷۹	O/O
خانواده پنجم				
I:1	۵۰	۵۸	۱۱۴	O/O
I:2	۸۰	۷۵	۹۶	O/A
II:1	۵۱	۳۲	۷۵	O/A
II:3	۳۵	۳۳	۸۰	O/O
II:4	۳۴	۲۶	۵۱	O/O
II:5	۵۸	۵۵	۹۷	O/O
II:6	۵۳	۴۷	۷۲	O/O
II:7	۵۲	۴۸	۸۴	O/O
II:8	۳۷	۲۴	۶۰	O/A
خانواده ششم				
I:3	۳۲	۴۴	۱۱۴	O/O
II:1	۲۴	۲۳	۵۳	O/O
II:2	۸۹	۸۸	۱۴۴	O/O
II:4	۳۳	۳۰	۱۰۹	O/O
III:1	۹۷	۱۰۲	۱۴۶	O/O
III:2	۹۳	۸۷	۱۲۱	O/O
III:3	۲۵	۲۴	۹۳	O/O

VWF:Ag (IU/dl) = میزان آنتي ژن فون ویلیبرانت درپلاسما، VWF:Rco (IU/dl)= میزان فعالیت فون ویلیبرانت درپلاسما.

VIII:C (IU/dl) = میزان فاکتور هشت انعقادي درپلاسما. ND= تعیین نشده.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.14.4]



شکل ۱. شجره نامه شش خانواده مبتلا به تیپ یک بیماری فون ویلیبرانت مورد بررسی در این مطالعه (علامت، نشانه افراد شاخص در خانواده است).

جدول ۳. نتایج مولکولی بررسی بیماران تیپ یک فون ویلیبرانت در شش خانواده مورد بررسی

خانواده	جهش	شماره اگزون یا اینترون	تغییر نوکلئوتید
یک	به هیستیدین ۱۲۰۵ آرژنین	اگزون۲۷	(G>A)گوانین به آدنین
دو	پیدا نشد	-	-
سه	به هیستیدین ۱۲۰۵ آرژنین	اگزون۲۷	(G>A)گوانین به آدنین

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.14.4]

چهار	پیدا نشد	-	-
پنج	***گلایسین۱۹ به آرژنین***	اگزون۲	(G>A)گوانین به آدنین
شش	نوکلئوتید شماره (۲۸۲۱)	اینترون۲۱	(G>A)گوانین به آدنین

بحث و نتیجه گیری

بررسی جهش ژن VWF با اندازه خیلی بزرگ و وجود پلی مورفیسم های زیاد مطالعه این ژن را مشکل کرده است. همچنین وجود ژن کاذب فون ویلیبرانت با ۹۷% تشابه توالی این کار را مشکل تر نیز نموده است(۲۱). در این مطالعه از روش CSGE دستی (M-CSGE) استفاده شد و نیز یک روش تعیین موتاسیون جدید برای ژن فون ویلیبرانت به نام CSGE فلوئورسانت (F-CSGE) طراحی و بکار گرفته شد نهایتا روش مستقیم تعیین توالی (Sequencing DNA) برای یافتن موتاسیون ها در قطعات بکار گرفته شد و نشان داد که غربالگری ژنهای بزرگ مانند فون ویلیبرانت (VWF) با ۶۳ PCR به این شیوه عملی تر و اقتصادی تر است(۲۳و۲۲). میانگین سطح آنتی ژن فون ویلیبرانت (VWF:Ag) در ۲۳ فرد مبتلا از شش خانواده ۳۵/۱۸ واحد/ دسی لیتر با طیف ۵/۷ تا ۶۴ بوده است و میانگین VWF:RCo ۳۱/۴ واحد/ دسی لیتر برای افراد مبتلای این خانواده (با دامنه ۴ تا ۶۱ واحد/ دسی لیتر) بوده است. علائم خونریزی مختلف در افراد بیمار همانند خونریزی از بینی، خونریزی دوران قاعدگی، خونریزی زیر جلدی و خونریزی بعد از کشیدن دندان و جراحی دیده شده است. میانگین سطح پلاسمائی فاکتور فون ویلیبرانت در افراد نرمال حدود ۱۰۰ واحد/دسی لیتر است ولی مقدار آن در افراد مختلف بسیار متغیر و از ۴۰% تا ۲۴۰% در جمعیت متغیر می باشد(۲۴). دلایل این تغییرات هنوز روشن نیست و تحت تاثیر فاکتورهای ژنتیکی و محیطی مختلفی قرار دارد. عامل ژنتیک سبب تغییرات ۳۰ تا ۶۰ درصدی سطح فاکتور فون ویلیبرانت در خون است. مهمترین عامل ژنتیکی شناخته شده دخیل بر سطح فاکتور فون ویلیبرانت، گروه خونی ABO است. افراد با گروه خونی O، به طور متوسط دارای ۲۵ الی ۳۵ درصد کاهش سطح فاکتور فون ویلیبرانت نسبت به افراد با گروه های خونی دیگر هستند(۲۶و۲۵). سطح پلاسمای VWF:Ag در بیماران تیپ یک در مطالعات

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.14.4]

گروه کانادائی بین ۵ تا ۸۸ واحد/ دسی لیتر گزارش شده است(۲۷). مطالعات بیماران تیپ یک در گروه اروپائی هم میانگین را در بین ۱۵۴ فرد شاخص ۴۴/۷ (با دامنه ۱ تا ۱۴۱) واحد/ دسی لیتر و میانگین VWF:RCo را ۵۰ (با دامنه ۶ تا ۱۷۴) واحد/ دسی لیتر گزارش کرده است(۲۸). این یافته ها نشان می دهد که دامنه داده های فنوتیپی در افراد بیمار تیپ یک خیلی متغیر است و ممکن است با دامنه نرمال در بعضی از موارد همپوشانی هم داشته باشد.

پدیده خونریزی در انسان پدیده خیلی شایعی است و دلایل زیادی از جمله کمبود پروتئین دارد. مطالعات در افراد نرمال حاکی از خونریزی از ارگان های مختلف می باشد به عنوان مثال خونریزی دوران قاعدگی در ۲۳ تا ۴۳ درصد، خونریزی بینی در ۵ تا ۳۹ درصد، خونریزی از دهان در ۷ تا ۵۱ درصد، خونریزی از زخم های کوچک در ۰/۲% تا ۲% و خونریزی بعد از کشیدن دندان در ۱ تا ۱۳ درصد از افراد نرمال دیده می شود فرض بر اینکه این علائم مستقل از هم باشند و با استفاده از پائین ترین مقادیر گزارش شده برای هر یک از علامت های مذکور؛ درصد افراد نرمالی که حداقل یکی از علائم خونریزی فوق را داشته باشند تا ۲۵% محاسبه می شود (۲۹و۱۴). تیپ یک بدلیل هتروژن بودن علائم بالینی و آزمایشگاهی دارای شرایط پیچیده ای است. بعضی از بیماران براحتی تشخیص داده می شوند چونکه از خونریزیهای شدید رنج می برند و دارای سطح خیلی پائین فاکتور فون ویلیبرانت هستند. اما اکثر افراد که باور بر این است که دارای تیپ یک هستند دارای کاهش جزئی سطح فاکتور فون ویلیبرانت می باشند و دارای علائم ملایم خونریزی در بعضی از افراد مبتلای خانواده می باشند نه در همه آنها، که در این صورت تمایز بین افراد سالم و بیمار ممکن است خیلی مشکل باشد یا غیر ممکن باشد. مطالعه ای در مورد علائم خونریزی در میان بیماران تیپ یک روشن ساخت که خونریزی های زیر جلدی بهترین نشانگر های این بیماری در بین علائم خونریزی خودبخودی در این بیماران چه در زنها و چه درمردها می باشند(۲۹).

از بررسی های مولکولی ژن در این ۶ خانواده، جهش عامل بیماری در ۴ خانواده بدست آمده است(جدول ۳). جهش آرژنین ۱۲۰۵ به هیستیدین (R۱۲۰۵H)، که در گذشته به عنوان عامل ایجاد جهش تیپ Vicenza شناخته می شد. در

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.14.4]

این مطالعه در دو خانواده از فلسطین اشغالی برای اولین بار یافت و گزارش شده است. از خصوصیات خانواده های واجد این جهش، داشتن شاخص های فنوتیپی پائین و علائم خونریزی ملایم است(جدول۱و۲). در مطالعات اخیر بر روی تیپ یک بیماری فون ویلیبرانت در ۱۵۴ خانواده غیر فامیل توسط گروه اروپائی، جهش آرژنین ۱۲۰۵ به هیستیدین در ۱۰% (۱۶/۱۵) از بیماران یافت شده است و از موتاسیونهای شایع در تیپ یک بیماری فون ویلیبرانت به حساب
می آید. جهش گلایسین ۱۹ به آرژنین (G۱۹R) در خانواده ۵، یک جهش جدید است که قبلا گزارش نشده است. این تغییر که در قسمت سیگنال پپتید پروتیین اتفاق می افتد بدلیل اینکه به محل برش سیگنال پپتید نزدیک است (بین اسید آمینه ۲۲ و ۲۳) و چون اسید آمینه گلایسین که یک اسید آمینه کوچک و بدون بار است با اسید آمینه گلوتامیک، که یک اسید آمینه بزرگتر با بار اسیدی است جایگزین شده است ممکن است برش سیگنال پپتید را تغییر داده یا تحت تاثیر قرار دهد. در خانواده پنج، فرد شماره II:۶، یک فرد سالم گزارش شده بود اما در مطالعات مولکولی موتاسیون را نشان داده است و فرد II:۵ نیز به عنوان بیمار گزارش شده است که در مطالعات مولکولی موتاسیون را نشان نداده است. مکانیسم های مختلفی مانند فنوتیپ ملایم، نفوذ ناکامل، فنوکپی و تشخیص غلط به عنوان مکانیسم های احتمالی در افراد مذکور در این خانواده پیشنهاد شده است(۳۰).

در خانواده شماره شش، تغییري در اینترون شماره ۲۱ یعنی جابجائی گوانین شماره ۲۸۲۱ با آدنین (G>A ۲۸۲۱) بدست آمده است که محل برش اگزون-اینترون (Site Splice) را متاثر می کند و سبب ایجاد بیماری در این خانواده می شود. این جهش که قبلا گزارش نشده و موتاسیون جدید است در تمامی اعضای مبتلای خانواده دیده شده است. البته در دو خانواده باقیمانده از شش خانواده هیچگونه جهشي یافت نشده بود.

مطالعات مشابه دیگر بیانگر این مطلب است که حدود ۳۰% از خانواده های مبتلا به تیپ یک این بیماری، هیچگونه جهشی در ژن فون ویلیبرانت نشان نمي دهند، این مسئله این احتمال را تقویت می کند که ژنهای دیگری (مانند گروه خونی ABO) علاوه بر ژن فون ویلیبرانت در ایجاد بیماری یا

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.14.4]

بروز علائم آن دخیل هستند که مکانیسم عملکرد آنها هنوز شناخته نشده است(۲۷و۲۳). نتیجه این مطالعه نشان داد که جهش هاي متفاوتي در خانواده هاي مختلف، عامل ایجاد این بیماري مي باشند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و بخش تحقیقاتی اتحادیه اروپا بخاطر حمایت مالی این طرح تشکر و قدردانی می گردد.

****

References

1. Von Willebrand E. Hereditar pseudohemofili. Finska Lakarsallskapetes Handl 1926; 67: 7.

2. Von Willebrand E. Uber hereditare pseudohemofili. Acta Med Scand 1931; 76: 521.

3. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. Blood 1987; 69(2): 454-9.

4. Castaman G, Federici AB, Rodeghiero F, Mannucci PM. Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. Haematologica 2003; 88(1): 94-108.

5. Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, et al. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. Thromb Haemost 2000; 84(2): 160-74.

6. Sadler JE. A revised classification of von Willebrand disease. For the subcommittee on von Willebrand Factor of the scientific and standardization committee of the International society on thrombosis and haemostasis. Thromb Haemost 1994; 71(4): 520-5.

7. Schneppenheim R. The evolving classification of von Willebrand disease. Blood Coagul Fibrinolysis 2005; 16(Suppl 1): S3-S10.

8. Michiels JJ, Gadisseur A, Budde U, et al. Characterization, classification, and treatment of von Willebrand diseases: a critical appraisal of the literature and personal experiences. Semin Thromb Hemost 2005; 31(5): 577-601.

9. Shelton Inloes B, Titani K, Sadler J. cDNA sequences for human von Willebrand factor reveal five types of repeated domains and five possible protein sequence polymorphisms. Biochemistry 1986; 25(11): 3164-71.

10. Sadler J, Shelton Inloes B, Sorace J, Harlan J, Titani K, Davie E. Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82(19): 6394-8.

11. Schneppenheim R. Molecular genetics of von Willebrand disease. Hamostaseologie 2004; 24(1): 37-43.

12. Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, Peyvandi F, Srivastava A, Federici AB, Mannucci PM. Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients. Blood Cells Mol Dis 2003; 30(3): 264-70.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.14.4]

13. Fressinaud E, Mazurier C, Meyer D. Molecular genetics of type 2 von Willebrand disease. Int J Hematol 2002; 75(1): 9-18.

14. Laffan M, Brown SA, Collins PW, et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization. Haemophilia 2004; 10(3): 199-217.

15. Zhang ZP, Lindstedt M, Falk G, Blomback M, Egberg N, Anvret M. Nonsense mutations of the von Willebrand factor gene in patients with von Willebrand disease type III and type I. Am J Hum Genet 1992; 51(4): 850-8.

16. Zhang ZP, Blomback M, Nyman D, Anvret M. Mutations of von Willebrand factor gene in families with von Willebrand disease in the Aland Islands. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90(17): 7937-40.

17. Ganguly A, Mathew JR, Darwin JP. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. USA, Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90(21): 10325-9.

18. Korkko J, Annunen S, Pihlajamaa T, Prockop DJ, Ala Kokko L. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. Proc Natl Acad Sci 1998; 95(4): 1681-5.

19. Williams IJ, Abuzenadah A, Winship PR, et al. Precise carrier diagnosis in families with haemophilia A: use of conformation sensitive gel electrophoresis for mutation screening and polymorphism analysis. Thromb Haemost 1998; 79(4): 723-6.

۲۰.هاشمی سوته م ب، پیک ا، گودیو آ. آنالیز مولکولی ژن فون ویلیبرانت در بیماران فون ویلیبرانت تیپ یک با استفاده از تکنیک ژل الکترفورز حساس به ساختار (CSGE): مقایسه دو روش دستی و فلوروسانت. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران ۱۳۸۵؛۱۶(۵۲):۱۰-۱.

21. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Lester Mancuso TL, Le Beau MM, Sorace JM, Sadler JE. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. Biochemistry 1991; 30(1): 253-69.

22. Ganguly, A. An update on conformation sensitive gel electrophoresis. Hum Mutat 2002; 19(4): 334-42.

23. Goodeve A, Peake I, Hashemi M, et al. Mutation analysis in type 1 von Willebrand disease patients entered in the multicenter MCMDM 1VWD study. J Thromb Haemost 2003; 1(suppl 1): OC075.

24. Keightley AM, Lam YM, Brady JN, Cameron CL, Lillicrap D. Variation at the von Willebrand factor (vWF) gene locus is associated with plasma vWF: Ag levels: identification of three novel single nucleotide polymorphisms in the vWF gene promoter. Blood 1999; 93(12): 4277-83.

25. Castaman G, Eikenboom JC. ABO blood group also influences the von Willebrand factor (VWF) antigen level in heterozygous carriers of VWF null alleles, type 2N mutation Arg854GIn, and the missense mutation Cys2362Phe. Blood 2002; 100(5): 1927-8.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.14.4]

26. Chng WJ, Yip CY, Baliwag MB, Liu TC. Differential effect of the ABO blood group on von Willebrand factor collagen binding activity and ristocetin cofactor assay. Blood Coagul Fibrinolysis 2005; 16(1): 75-8.

27. James P, Cameron CL, Notley CRP, et al. Clear familial co-segregation of the type 1 von Willebrand disease phenotype and VWF haplotypes in the Canadian type 1 VWD study. J Throm Haemost 2003; 1(suppl 1): OC076.

28. Peake IR, Goodeve A, Rodeghiero F, et al. Molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 von Willebrand's disease (VWD): The progress of a European collaboration. J Throm Haemost 2003; 1(suppl 1): OC073.

29. Sadler JE. Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. Blood 2003; 101(6): 2089-93.

30. Eikenboom J, Van Marion V, Putter H, et al. Analysis of cosegregation of type 1 Von Willebrands disease phenotype and Von Willebrand factor gene haplotypes in the European multicenter MCMDM-1VWD Study. Blood 2003; 102: 305.

*آدرس نویسنده مسئول: ساری، بلوار خزر، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی - بیوفیزیک، تلفن: ۰۱۵۱-۳۲۴۹۴۰۰.

hashemisoteh@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.4.14.4]