Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 33, No. 2, Summer 2023 ORIGINAL ARTICLE

Genotyping rs61753984 (R34X) and rs62643623 (Q218X) in Von Willebrand disease patients by tetra ARMS-PCR

Mahmoud Khatib[1], Azam Bolhassani[2], Zahra Noormohammadi [1], Maryam Ghazizadeh[3]
[1] Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[3] Department of Hematology and Oncology, Shahid Modarres Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

Abstract

Background: Von Willebrand disease (VWD) is the most common inherited bleeding disorder around the world. Large size of the gene and heterogeneous nature of its mutations, make it difficult to determine the exact nature of mutations in VWD. Some missense mutations are common in VWD and can be assessed as first step of determining the genetic cause of the disease.
Materials and methods: Forty four unrelated patients categorized as VWD type 3 were included in study. Tetra ARMS-PCR was applied to determine the presence of the point mutations rs61753984 and rs62643623. Then ARMS-PCR was performed with the same primers. In cases with mutant patterns, Sanger sequencing was used for conformation of results.
Results: Two patients showed two bands of 248bp and 181bp in rs61753984 (R34X), which corresponds to homozygous mutant genotype. In other patients, homozygous pattern with 248bp and121bp bands was observed. In rs62643623 (Q218X) position, one patient with two bands of 378bp and 260bp showed homozygous mutant genotype while other patients showed homozygous wild genotype (378bp and 168bp bands). The results of ARMS-PCR was the same as tetra ARMS-PCR. Finally, the results of tetra ARMS-PCR were confirmed by Sanger sequencing.
Conclusion: In present study we used tetra ARMS-PCR for detection of point mutations, while in most studies PCR-PFLP has been used. We found that tetra ARMS-PCR can be used as a simple, cost effective and reliable method. If these mutations are not found, advanced molecular methods such as sequencing should be applied.
Keywords: *Von Willebrand disease, rs61753984, rs62643623, tetra ARMS-PCR.*

Cited as: Khatib M, Bolhassani A, Noormohammadi Z, Ghazizadeh M. Genotyping rs61753984 (R34X) and rs62643623 (Q218X) in Von Willebrand disease patients by tetra ARMS-PCR. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2023; 33(2): **174-182.**

Correspondence to: Azam Bolhassani
Tel: *+98 21 66465132*
E-mail: A_bolhasani@pasteur.ac.ir
ORCID ID: 0000-0001-7363-7406
Received: 26 Oct 2022; **Accepted:** 28 Feb 2023

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.7.1]
[DOI: 10.61186/iau.33.2.174]

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۳، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲، صفحات ۱۷۴ تا ۱۸۲

Original Article

ژنوتایپینگ rs61753984(R34X) و rs62643623(Q218X) در بیماران فون ویلبراند تیپ۳ با تکنیک تترا ارمز پی سی ار

محمود خطیب[۱]، اعظم بوالحسنی[۲]، زهرا نورمحمدی[۱]، مریم قاضی زاده[۳]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
[۲] گروه هپاتیت وایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۳] گروه هماتولوژی و انکولوژی، بیمارستان شهید مدرس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *بیماری فون ویلبراند شایع‌ترین اختلال خونریزی دهنده ارثی در جهان است. اندازه بزرگ ژن همراه با تنوع واریانت‌های پاتوژن عامل بیماری، تعیین ماهیت دقیق ژنتیکی آن را دشوار نموده‌است. برخی جهش‌های بی‌معنی در این بیماری از شیوع بالاتری برخوردارند و می‌توان بررسی آن‌ها را به عنوان گام اول در تعیین عامل ژنتیکی بیماری، در نظر گرفت.*

روش بررسی: *در این مطالعه ۴۴ بیمار غیر وابسته مبتلا به فون ویلبراند تیپ ۳ بررسی شدند. برای تعیین جهش‌های نقطه‌ای rs61753984 and rs62643623 از تکنیک tetra ARMS PCR استفاده شد. سپس تکنیک ARMS-PCR با همان پرایمرها انجام و نهایتا در موارد موتانت، تایید با تکنیک توالی یابی Sanger انجام شد.*

یافته‌ها: *در ژنوتایپینگ rs61753984، دو بیمار باندهای 248bp و 181bp نشان دادند که موید ژنوتایپ هوموزیگوت موتانت است. در سایر موارد باندهای 248bp 121bp دیده شد. در ژنوتایپینگ rs62643623، یک بیمار باندهای 378bp و 260bp نشان داد که موید ژنوتایپ هوموزیگوت موتانت است. در سایر موارد باندهای 378bp 168bp دیده شد. نتایج تست ARMS-PCR مشابه tetra ARMS-PCR بود. نهایتا نتایج با تعیین توالی Sanger تایید شد.*

نتیجه‌گیری: *برخی جهش‌های نقطه‌ای از جمله جهش‌های نقاط داغ آرژینین، در بیماری فون ویلبراند از شیوع بیشتری برخوردارند. در اغلب مطالعات، برای بررسی این واریانت‌ها از تکنیک PCR-RFLP استفاده شده است. در مطالعه حاضر برای این واریانت‌ها، تکنیک tetra -ARMS PCR بکار رفت. و به عنوان تکنیکی آسان، مقرون به صرفه و قابل اعتماد پیشنهاد شد. در مواردی که این واریانت‌ها شایع به عنوان عامل بیماری تعیین نشود، روش‌های پیشرفته مولکولی باید به کار گرفته شوند.*

واژگان کلیدی: *فون ویل براند، تترا ارمز پی سی ار، rs61753984, rs62643623*

مقدمه

بیماری فون ویلبراند (Von Willebrand disease) شایع‌ترین اختلال خونریزی دهنده در انسان است که منجر به نقص در تجمع و چسبندگی پلاکت‌ها می‌شود. شیوع آن در جمعیت انسانی یک درصد برآورد شده است، ولی موارد علامت‌دار حدود یک در هزار نفر است (۱). علایم بالینی این بیماران شامل طیف وسیعی است و از بیماران بی علامت تا افراد مبتلا به خونریزی‌های تهدید کننده حیات متغیر است (۲). این بیماری به دلیل نقصان عملکرد پروتئین پلاسمایی موسوم به فاکتور فون ویلبراند ایجاد می‌شود. این اختلال عملکرد، ناشی از اختلال ساختاری، یا ناشی از کاهش سطح پلاسمایی فاکتور است (۳, ۴).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، اعظم بوالحسنی
(email: A_bolhasani@pasteur.ac.ir)
ORCID ID: 0000-0001-7363-7406
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۸/۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۹

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.7.1]
[DOI: 10.61186/iau.33.2.174]

این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۶۲ توسط دکتر اریک فون ویلبراند در چندین خانواده مبتلا به خونریزی‌های شدید پوستی مخاطی توصیف شد (۵). بیماری فون ویلبراند دارای سه تیپ است. در تیپ ۱ و ۳ عمدتا نواقص کمی پروتئین عامل بروز علایم است. کاهش سطح فاکتور، در تیپ ۱ بسیار کم و در تیپ ۳ شدید (گاهی فاقد فاکتور) می‌باشد. در تیپ۲ که خود شامل ۴ زیرگروه 2A, 2B, 2M, 2N است، اختلالات کیفی پروتئین، عامل بروز بیماری است(۶-۸). ژن فون ویلبراند بر روی کروموزوم ۱۲ جانمایی شده است (12p13.3). طول آن 178kb و واجد ۵۲ اگزون است. یک سودوژن واقع در 22q11.2 که با اگزون‌های ۳۴-۲۳ ژن حدود ۹۷ ٪ هومولوژی دارد، شناسایی شده است. ژن آن عمدتا در پلاکت‌ها، مگاکاریوسیت‌ها و سلول-های اندوتلیال بیان می‌شود. طول mRNA آن 88kb بوده و محصول آن، پروتئینی با ۲۸۱۳ اسیدامینه است. فاکتور فون ویلبراند در رتیکولوم اندوپلاسمیک به صورت یک پروپلی پپتید ساخته می‌شود که واجد دومین‌های مختلف A-D است. پس از جدا شدن سیگنال پپتید، به کمک پل‌های دی‌سولفیدی به صورت دایمر درآمده و سپس در دستگاه گلژی با کمک پیوندهای دی‌سولفیدی، مولتی مرهای بزرگ ایجاد می‌کند. مولتی‌مرها به صورت غیر فعال در پلاسما در گردش هستند و واکنشی با پلاکت‌ها ندارند. در صورت بروز آسیب در اندوتلیوم عروق، فاکتور فون ویلبراند به کلاژن زیر اندوتلیوم متصل شده و پس از باز شدن رشته‌های پیچ خورده آن، محل اتصال GP1bα واقع در دومین A پروتئین، در معرض تماس با پلاکت‌ها قرار می‌گیرد. نهایتا پلاکت‌های فعال شده در محل آسیب عروق تجمع یافته و باعث بند آمدن خونریزی می‌شوند (۸, ۹).

تعداد افراد مبتلا به اختلالات خونریزی دهنده در ایران بر اساس داده‌های انجمن هموفیلی ایران ۱۰۹۴۴ نفر(شیوع ۱۳۱ در هزار) است. از این گروه ۱۶۱۷ نفر (شیوع ۱۹ در میلیون نفر) مبتلا به فون ویلبراند بوده‌اند (بر اساس گزارش فدراسیون جهانی هموفیلی ۱۵۱۶ نفر)(۱۰). هرچند به نظر می‌رسد تعداد مبتلایان واقعی بیش از این باشد. زیرا اولا بسیاری از بیماران به علت علایم خفیف مراجعه نمی‌کنند، ثانیا کمبود آزمایشگاه‌های انعقاد مجهز در کشور تشخیص بیماری را دشوار می‌کند. بدین سبب، برخی مولفین از آن به عنوان کوه یخ (iceberg) یاد کرده‌اند (۱۱). از مجموع ۱۶۱۷ بیمار فون ویلبراند ثبت شده، ۲۰۶ مورد تیپ۱(۱۲/۷ ٪)، ۱۹۹ مورد تیپ ۲ (۱۲/۳ ٪)، ۳۰۴ مورد تیپ ۳ (۱۸/۸ ٪) و ۹۰۸ بیمار (۵۶/۱ ٪) با تیپ نامشخص طبقه بندی شده‌اند (۳). از آنجا که توارث در تیپ ۳ این بیماری به صورت اتوزوم مغلوب است، در جوامعی که ازدواج‌های فامیلی رایج است (نظیر ایران)، شیوع بیماری بسیار بالاتر خواهد بود. با توجه به اندازه بزرگ ژن، گوناگونی واریانت‌ها در آن و وجود یک ژن کاذب که با اگزون‌های ۲۳ تا۳۴ همپوشانی داشته و با توالی ژن اصلی ۹۷ ٪ هومولوژی دارد، تعیین واریانت‌های پاتوژن عامل بیماری در افراد مبتلا دشوار است. از آنجا که در گزارش‌های مختلف، برخی جهش‌های بی معنی (nonsense) با شیوع بیشتری گزارش شده‌اند، در اغلب مطالعات ابتدا این واریانت‌ها بررسی می‌شوند. در صورت پاسخ منفی، گام بعدی بررسی تمام ژن با یکی از روش‌های تعیین توالی خواهد بود. برای بررسی جهش‌های نقطه‌ای در اغلب مطالعات از تکنیک PCR RFLP (Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism) استفاده شده است. در این مطالعه، برای تشخیص جهش‌های بی معنی rs61753984(R34X) و rs62643623(Q218X) (به ترتیب بر روی اگزونهای ۳ و ۶) از تکنیک tetra ARMS-PCR (tetra primers amplification refractory mutation system PCR) استفاده شد. rs61753984 از مناطق داغ آرژینین (Arginine hot spot) هستند که تغییر نوکلوتیدی سیتوزین به تیمین در آن باعث تبدیل کدون آرژینین به کدون ایست می‌شود. در rs62643623، تغییر نوکلئوتید سیتوزین به تیمین باعث تبدیل کدون گلوتامین به کدون ایست می‌شود. در نهایت در هر دو مورد در افراد هوموزیگوت، پروتئین کوتاه بی‌اثر ایجاد خواهد شد.

مواد و روشها

تاییدیه اخلاقی

این مطالعه در کمیته اخلاقی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران بررسی و با کد IR.IAU.SRB.REC.1400.001 مورد تایید قرار گرفت. کلیه بیماران فرم رضایت آگاهانه شرکت در این طرح را مطالعه و تکمیل نمودند. در مورد بیماران کودک، رضایت از والدین آنان اخذ شد.

بیماران

۴۴ بیمار غیر وابسته و مبتلا به فون ویلبراند تیپ۳ ثبت شده در مرکز درمان جامع هموفیلی ایران، در این طرح شرکت داده شدند. اطلاعات بالینی و آزمایشگاهی بیماران از پرونده پزشکی آنان، موجود در مرکز درمان جامع هموفیلی ایران، استخراج شد. سن، جنس، نژاد، سوابق خونریزی و درمان‌های صورت گرفته، ارتباط فامیلی والدین و سابقه بیماری در خانواده و نتایج آزمایش-های انعقادی ثبت گردید. تمام شرکت کنندگان در طرح بر اساس علایم بالینی، سوابق فامیلی و نتایج آزمایش‌های انعقادی (FVIII: C < 5 IU/dl, VWF: Ag < 5 IU/dl, VWF activity < 5)، مبتلا به فون ویلبراند تیپ ۳ بودند و بیمارانی که تشخیص قطعی تیپ

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.7.1]
[DOI: 10.61186/iau.33.2.174]

۳ در آنها مسجل نبود، از این طرح خارج شدند. برای کلیه بیماران در ابتدا مشاوره ژنتیک انجام شد. نمره شدت خونریزی (bleeding score) بر اساس پرسشنامه ارزیابی خونریزی انجمن بین‌المللی هموفیلی و ترومبوز (International Society on Thrombosis and Haemostasis Bleeding Assessment Tool (ISTH-BAT)) تعیین و ثبت شد.

استخراج DNA

از تمام بیماران، ۵ میلی لیتر خون وریدی گرفته و در لوله حاوی EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) نگهداری شد. استخراج DNA توسط کیت تجاری (FAVORGENE, BIOTECH CORPOR.) و مطابق دستورالعمل سازنده انجام شد. پس از استخراج، غلظت DNA حاصل، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری نانودراپ اندازه گیری و در صورت نامناسب بودن، فرایند استخراج تکرار شد.

طراحی پرایمر

برای هر یک از واریانت‌ها با استفاده از نرم افزار primer1، پرایمرهای مورد نظر شامل یک جفت پرایمر خارجی و یک جفت پرایمر داخلی طراحی گردید (http://primer1.soton.ac.uk/ Public_html/primer1.html). برای هر واریانت، طراحی پرایمرهای داخلی باید به گونه‌ای باشد که در انتهای '3 یکی از آنها آلل G و در انتهای '3 پرایمر دیگر آلل A قرار گیرد که به ترتیب مسئول تکثیر آلل طبیعی(wild) و موتانت (mutant) خواهند بود (جدول ۱). با استفاده از نرم افزار BLAST، اختصاصیت و دمای ذوب پرایمرها بررسی شده و مناسب‌ترین ست تترا پرایمر انتخاب شد؛ به طوری که دمای ذوب پرایمرها تا حد امکان به هم نزدیک باشد (http://www.ncbi.nlm.nih).

tetra ARMS-PCR و تعیین توالی به روش سنگر

واکنش PCR با استفاده از محلول مسترمیکس (MPLIQON 2x master mix) و در شرایط بهینه شده به لحاظ غلظت پرایمرها و دمای آنیلینگ، در سی سیکل متوالی انجام شد. پس از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز، باندهای با کمک ژلداک مرئی و بررسی شدند.

در نتیجه tpaPCR در جهش R34X با پرایمرهای فوق، سه باند 248bp، 121bp و 181bp بر روی ژل می تواند ظاهر شود که به ترتیب مربوط به باند پرایمرهای خارجی، آلل G (طبیعی) و آلل A (موتانت) می باشند. در افراد سالم با ژنوتیپ هوموزیگوت (GG) باندهای 248bp و 121bp ، در افراد واجد ژنوتیپ موتانت هوموزیگوت (AA) باندهای 248bp و 181bp ، و در افراد هتروزیگوت (GA) هر سه باند 248bp,121bp,181bp روی ژل آگارز آشکار می‌شود.

در نتیجه tpaPCR درجهش Q218X با پرایمرهای فوق، سه باند 378bp، 168bp و 260bp بر روی ژل می تواند ظاهر شود که به ترتیب مربوط به باند پرایمرهای خارجی، آلل G (طبیعی) و آلل A (موتانت) می‌باشند. در افراد سالم با ژنوتیپ هوموزیگوت (GG) باندهای 378bp و 168bp ، در افراد واجد ژنوتیپ موتانت هوموزیگوت (AA) باندهای 378bp و 260bp ، و در افراد هتروزیگوت (GA) هر سه باند 260bp,168bp,378bp روی ژل آگارز آشکار می‌شود.

در مرحله بعد یک دور ARMS-PCR (amplification refractory mutation system PCR) با همان ست پرایمرهای فوق انجام شد. در این تکنیک، تکثیر آلل‌های طبیعی و موتانت بصورت جداگانه انجام می‌شود. بدین منظور conventional PCR در سه تیوب مختلف انجام شد که میزان مسترمیکس و DNA مطابق tetra ARMS-PCR قبلی بوده، ولی در هر واکنش یک جفت پرایمر متفاوت اضافه شد. در میکروتیوب اول، فقط پرایمرهای خارجی فوروارد و ریورس، در میکروتیوب دوم پرایمر فوروارد خارجی همراه با پرایمر ریورس داخلی (mutant allele) و در میکروتیوب سوم پرایمر ریورس خارجی همراه با پرایمر فوروارد داخلی (wild allele) اضافه شد. مقدار هر پرایمر در تمام واکنش‌ها، 10 pmol در نظر گرفته شد. در مواردی‌که نتایج مثبت اولیه با استفاده از تکنیک ARMS-PCR نیز تکرار شدند، برای تایید نهایی، تعیین توالی به روش سنگر (Sanger sequencing)

جدول ۱. توالی پرایمرهای فوروارد و ریورس خارجی و داخلی مربوط به جهش‌های R34X و Q218X

Mutation	Primer type	5'>3'	
R34X	F out	CCTCTGAAGTCCTCCCTGCAGTGCCCAG	
	R out	CAGTTGTGCCCTGAGATCACCAGCCCAA	
	F in	CGAAGTCACTTCCGAAAAGGCTGCAGCG	**G allele**
	R in	AACTCGCGGCAGGTCATCCACGGACT	**A allele**
Q218X	F out	GCACAAATGGACTGAGACACTACACCAAGT	
	R out	CTTTCCTGAAACTTTCCTCCACAGGGAC	
	F in	AGGCCAGTCCACACCCACCTTATG	**G allele**
	R in	ATGCAACATCTCCTCTGGGGAAAGGT	**A allele**

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.7.1]
[DOI: 10.61186/iau.33.2.174]

انجام شد. به منظور تهیه DNA برای توالی یابی، یک دور واکنش conventional PCR صرفا با پرایمرهای خارجی فوروارد و ریورس (با تنظیمات مشابه tetra ARMS-PCR) صورت گرفت و محصول PCR روی ژل آگارز رویت و پس از تایید اندازه و کیفیت باند، برای انجام تعیین توالی یابی (شرکت پیشگام) ارسال شد.

یافته‌ها

در ۴۴ بیمار غیر وابسته و مبتلا به فون ویلبراند تیپ۳، جهش‌های نقطه‌ای و بی‌معنی rs61753984(R34X) و rs62643623(Q218X) با استفاده از روش tetra ARMS-PCR بررسی شدند. نسبت بیماران مونث به مذکر برابر یک بود. سن شروع بیماری از زمان تولد تا ۱۶ سالگی متغیر بود. موارد تشخیص در بدو تولد مربوط به بیمارانی بود که با توجه به سابقه ابتلا در خانواده، آزمایشات انعقاد در زمان تولد برایشان انجام شده بود. در ۴ بیمار میزان مهار کننده فاکتور فون ویلبراند در پلاسما وجود داشت. طیف وسیعی از خونریزی در ارگان‌های مختلف در بیماران دیده شد که شامل خون دماغ، خونریزی از لثه، خونریزی پس از ختنه، اکیموز، خونریزی طولانی از زخمهای پوستی، همارتروز، خونریزی به دنبال کشیدن دندان، خونریزی از دستگاه گوارش، خونریزی از دستگاه ادراری، منوراژی در خانم‌ها و خونریزی شدید پس از زایمان بود. نمره ارزیابی خونریزی ۲۸-۱۱ و به طور میانگین ۲۱ بود. یافته‌های آزمایشگاهی در جدول ۲ آمده است.

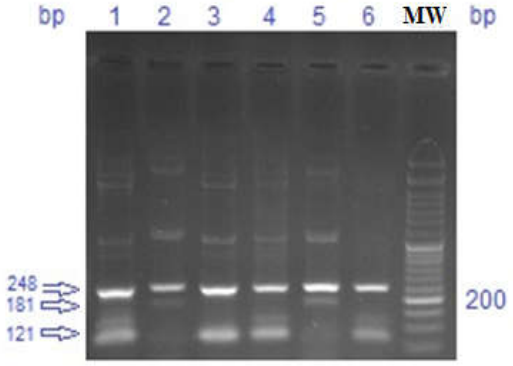
جدول ۲. یافته‌های آزمایشگاهی بیماران

میانگین نمره خونریزی (دامنه)	۲۱ (۲۸-۱۱)
میانگین هموگلوبین (دامنه)	۱۲/۷ (۱۶/۴- ۶/۶)
میانگین تعداد پلاکت (دامنه)	۲۹۴ (۱۶۱ – ۴۹۴)
میانگین PTT (دامنه)	۷۰ (۵۵ -۱۰۰)
سطح فاکتور VIII	<۵
سطح آنتی ژن فاکتور فول ویل براند	<۵
میزان فعالیت فاکتور فون ویل براند	<۵

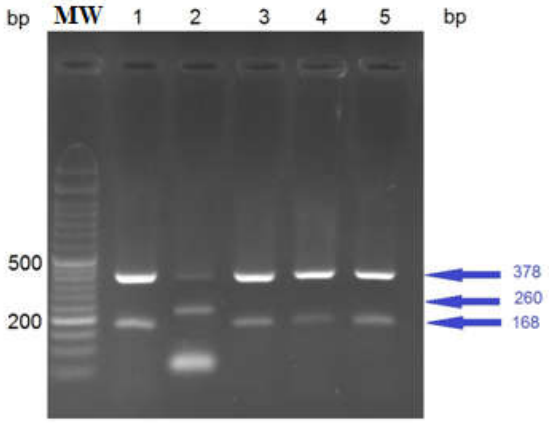
نتایج tetra ARMS-PCR

جهش R34X: دو بیمار (۴/۵٪) الگوی هموزیگوت موتانتAA نشان دادند. در سایر بیماران، الگوی هموزیگوت GG مشاهده شد و هیچ یک از بیماران الگوی هتروزیگوت نداشتند. نتیجه ARMS-PCR نیز موید همان ژنوتیپ بود. در شکل ۱ نتیجه الکتروفورز شش بیمار نشان داده شده است. بیماران شماره ۲ و ۵ ژنوتیپ هموزیگوت موتانت را نشان دادند. در بقیه بیماران هموزیگوت GG مشاهده شد.

جهش Q218X: یک بیمار (۲٪) الگوی هموزیگوت AA نشان داد. در سایر موارد الگوی هموزیگوت GG دیده شد و هیچ یک از بیماران الگوی هتروزیگوت نداشتند. نتیجه ARMS-PCR نیز موید همان ژنوتیپ بود. در شکل ۲ نتیجه الکتروفورز پنج بیمار نشان داده شده است. بیمار شماره ۲ ژنوتیپ هموزیگوت موتانت را نشان داد. در بقیه بیماران ژنوتیپ هموزیگوت طبیعی مشاهده شد.



شکل ۱. نتیجه tetra ARMS-PCR در جهش R34X در شش بیمار. در بیماران شماره ۲ و ۵ باندهای 248bp و 181bp مشاهده شد که بیانگر ژنوتیپ هموزیگوت موتانت(AA) است. در ۴ بیمار دیگر، باندهای 248bp و 121bp مشاهده شد که بیانگر ژنوتیپ هموزیگوت GG است. ستون MW شاخص اندازه ملکولی (۵۰ جفت باز، فرمنتاز) است.



شکل۲. نتیجه tetra ARMS-PCR در Q218X در پنج بیمار. در بیمار شماره ۲ باندهای 378bp و 260bp مشاهده شد که بیانگر ژنوتیپ هموزیگوت موتانت(AA) است. در ۴ بیمار دیگر باندهای 378bp و 168bp دیده شد که بیانگر ژنوتیپ هموزیگوت GG است. ستون MW شاخص اندازه ملکولی (۵۰ جفت باز، فرمنتاز) است.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.7.1]
[DOI: 10.61186/iau.33.2.174]



شکل ۲. تعیین توالی. الف) بیمار با ژنوتیپ AA در tetra ARMS-PCR جهش rs61753984(R34X)، CGA >TGA، Arg>stop codon . ب) بیمار با ژنوتیپ AA در tetra ARMS-PCR جهش rs62643623(Q218X)، CAG >TAG، Gln>stop codon .ج) بیمار با ژنوتیپ GG در tetra ARMS-PCR جهش rs62643623(Q218X) .

تعیین توالی

در سه بیمار با الگوی ژنوتیپ موتانت (AA)، PCR با استفاده از پرایمرهای خارجی انجام و محصول برای تعیین توالی ارسال شد. در هر سه مورد، نتیجه توالی یابی موید نتایج اولیه بود (شکل‌های ۳ الف و ب). در دو بیمار که نتیجه tetra ARMS-PCR مربوط به جهش Q218X مبین ژنوتیپ هوموزیگوت نرمال(GG) بود، توالی یابی کل اگزون ۶ (حامل این جهش) صورت گرفت که موید نتیجه اولیه بود(شکل ۳ج).

بحث

فون ویلبراند شایع‌ترین بیماری خونریزی دهنده در انسان است. ولی تیپ ۳ آن که غالبا شدید است، در برخی کشورهای در حال توسعه نظیر ایران، که ازدواج فامیلی در آنها رایج است، شیوع بسیار بیشتری دارد (۱۲). در مطالعه مصطفی سادات و همکارانش، شیوع ازدواج فامیلی درجنوب ایران، در مناطق شهری ۵۰/۷ ٪ و در مناطق روستایی ۸۲/۲ ٪ ذکر شده است (۱۳).

در مطالعه پاینده و همکارانش، از ۵۶ بیمار مبتلا به منوراژی، ۳۱ نفر (۵۵/۳ ٪) مبتلا به فون ویل براند بودند و ۴۵/۲ ٪ از این گروه تیپ ۳ بیماری را نشان دادند (۱۴). درمطالعه ناهید رهبر و همکارانش بر روی ۴۶۰ بیمار مراجعه کننده با منوراژی ، ۲۴ ٪ آنان دچار فون ویلبراند بودند (۱۵).در مطالعه کوهورت Hagberg و همکارانش نشان داده شد که تاثیر خونریزی‌های شدید قاعدگی و هیسترکتومی متعاقب آن بر سلامت زنان مبتلا به فون ویل براند نسبت به سایر زنان، چشمگیرتر است (۱۶).

از آنجا که نحوه توارث تیپ ۳ بیماری به صورت اتوزوم مغلوب است، تعیین دقیق جهش ژنتیکی عامل بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۶). زیرا در صورت تشخیص جهش، امکان شناسایی ناقلین در بستگان فرد مبتلا به راحتی و با

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.7.1]
[DOI: 10.61186/iau.33.2.174]

هزینه کم قابل انجام است. با شناسایی افراد ناقل، مشاوره ژنتیک به موقع و در صورت لزوم، انجام آزمایشات بررسی جنین (شامل PND و PGD) می‌توان از تولد بیماران جدید، پیشگیری کرد. (PND: prenatal diagnosis, PGD: pre-implantation genetic diagnosis)

هر چند توالی‌یابی، تکنیک استاندارد طلایی برای ژنوتایپینگ به شمار می‌رود، با توجه به طول زیاد ژن فون ویلبراند (178kb/52exons)، انجام آن وقت گیر و پرهزینه است. علاوه بر مشکل اندازه بزرگ ژن فون ویلبراند، تنوع ژنتیکی در جهش‌های بیماری‌زای آن که از انواع جهش‌های نقطه‌ای تا حذف کامل ژن متغیر است، و نیز حضور یک ژن کاذب که با اگزون‌های ۲۳تا۳۴ ژن فون ویل براند همپوشانی دارد، تعیین موتاسیون‌های عامل بیماری را دشوار و چالش برانگیز کرده است (۱۷). امروزه با استفاده از تکنیک‌های نوین مولکولی نظیر next generation sequencing، مطالعه چنین ژن‌های بزرگی آسان‌تر شده است ولی با توجه به هزینه بسیار زیاد آن، در کشورهای در حال توسعه در اکثر بیماران قابل انجام نیست (۱۷ ,۱۶).

در بسیاری از مطالعات، ابتدا برخی از جهش‌های شایع مورد بررسی قرار گرفته و در مواردی که پاسخ منفی بوده از تکنیک‌های تعیین توالی کل ژن استفاده شده است. گروهی از این جهش‌های شایع، در نواحی داغ کدون آرژینین Arginine (Hot Spots, CGA) حاوی دی نوکلئوتیدهای CG شناسایی شده است. جهش نقطه‌ای C>T (سیتوزین به تیمین) باعث تبدیل کدون آرژینین به کدون ایست شده و جهشی از نوع بی معنی ایجاد می‌کند. همچنین در rs61753984 جهش نقطه ای C>T منجر به تبدیل کدون گلوتامین به کدون ایست و جهش بی معنی می‌شود. در اغلب این مطالعات برای بررسی این موتاسیون‌های نقطه ای از تکنیک PCR-RFLP استفاده شده‌است (۲۰-۱۸). Etlik و همکارانش در مطالعه خود، تکنیک‌های مختلف ژنوتایپینگ شامل PCR-RFLP ، real time PCR, sequencing را با روش tpaPCR مقایسه کردند و نشان دادند که تکنیک tetra ARMS-PCR، در مقایسه با سایر روش‌ها، سریع، آسان، حساس و مقرون به صرفه است (۲۱). Rambabu Undi و همکارانش در مطالعه خود برای ژنوتایپینگ، tetra ARMS-PCR را در مقایسه با PCR-RFLP روشی مطمئن، سریع و مقرون به صرف معرفی کرده‌اند (۲۲). همچنین در مطالعات متعدد دیگری تکنیک tetra ARMS-PCR به منظور ژنوتایپینگ و بررسی جهش‌های تک نوکلئوتیدی مورد تایید قرار گرفته است (۲۳, ۲۴).

در این مطالعه دو جهش نقطه‌ای شامل rs61753984(R34X) و rs62643623(Q218X) در ۴۴ بیمار مبتلا به فون ویلبراند تیپ ۳ با استفاده از تکنیک tetra ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفت. در این تکنیک از دو جفت پرایمر شامل یک جفت پرایمر خارجی و یک جفت پرایمر داخلی استفاده می‌شود. طراحی پرایمرها طوری است که محصول پرایمرهای خارجی فارغ از ژنوتیپ بیمار تولید شده، ولی پرایمرهای داخلی، یکی اختصاصی برای آلل طبیعی (روی رشته فوروارد) و دیگری اختصاصی برای آلل موتانت (روی رشته ریورس) است. بنابراین در این تکنیک صرفا دو ژنوتیپ بررسی می‌شود و در صورت وجود واریاسیون‌های دیگر، باند داخلی (اختصاصی) رویت نخواهد شد. لذا اگرچه در بانک‌های اطلاعاتی واریاسیون G>C نیز در نقاط مورد بررسی مطالعه ما گزارش شده است، اما طراحی پرایمرها در tetra ARMS-PCR طوری بود که صرفا آلل های G یا A تکثیر شوند و از آنجا که در تمام بیماران مورد مطالعه باندهای داخلی به صورت هوموزیگوت (G یا A) دیده شد؛ لذا می‌توان نتیجه گرفت که هیچیک از بیماران واجد واریاسیون G>C نبوده‌اند. بر خلاف ARMS-PCR که دو آلل را در دو واکنش مستقل ارزیابی می‌کند (مستلزم دو واکنش PCR مجزا)، در tetra ARMS-PCR تمام واکنش‌ها در یک تیوب و در یک مرحله انجام می‌شود (۲۱, ۲۳). پس از انجام tetra ARMS-PCR، جهش R34X در دو بیمار و جهش Q218X در یک بیمار تایید شد. در هر سه مورد، ژنوتیپ بیمار بصورت هوموزیگوت موتانت (AA) بود. در سایر بیماران ژنوتیپ هوموزیگوت با آللهای طبیعی (GG) مشاهده شد. با استفاده از پرایمرهای داخلی و در دو واکنش مجزا، تکنیک ARMS-PCR نیز انجام شد که نتایج قبلی تکرار شد. نهایتا در هر سه بیمار با الگوی هوموزیگوت موتانت، توالی یابی به روش سنگر موید نتایج اولیه بود.

تکنیک tpaPCR توانست از مجموع ۴۴ بیمار، در سه نفر (۷ ٪) ژنوتایپینگ دقیق را تعیین کند. لذا به نظر می‌رسد با توجه به هزینه زیاد و در دسترس نبودن تکنیک‌های نوین (NGS) و با عنایت به هزینه و دشواری انجام توالی یابی به روش سنگر در این ژن بزرگ، بهتر است ابتدا جهش‌های نقطه‌ای شایع، مورد بررسی قرار گیرد. از آنجا که در مطالعات متعدد، دقت و حساسیت tetra ARMS-PCR تایید شده است، ممکن است بتوان از آن عنوان روشی در دسترس، آسان، سریع، حساس، دقیق و مقرون به صرفه استفاده کرد (۳۰-۲۵). با عنایت به اینکه نخستین بار است که از این تکنیک در بررسی بیماران فون ویل براند استفاده می‌شود، مطالعات بیشتر و بزرگ‌تر در

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.7.1]
[DOI: 10.61186/iau.33.2.174]

آینده در خصوص حساسیت و اختصاصیت آن کمک کننده خواهد بود. از طرفی در این روش ضمن استفاده از محصول پرایمرهای خارجی به عنوان یک کنترل داخلی، در صورتی که نتوان با تغییر المان‌های واکنش، نتیجه مورد نظر را گرفت، امکان استفاده از پرایمرهای داخلی در دو واکنش مجزا وجود دارد، یعنی با همین ست پرایمر می‌توان ARMS-PCR نیز انجام داد. بدیهی است در مواردی که پاسخ بررسی جهش‌های نقطه‌ای شایع (با هر تکنیکی) منفی باشد، ناگزیر از انجام توالی یابی خواهیم بود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت آزمایشگاه تحقیقات مرکز درمان جامع هموفیلی ایران انجام شده است. از کارکنان محترم آن مرکز به ویژه خانم الناز آگی برای همکاری در طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Weyand AC, Flood VH. Von Willebrand Disease: Current Status of Diagnosis and Management. Hematol Oncol Clin North Am. 2021;35:1085-101.

2.Eladly F, Miesbach W. Von Willebrand Disease-Specific Aspects in Women. Hamostaseologie 2022;42:330-6.

3.Dorgalaleh A, Tabibian S, Shams M, Ala F, Bahoush G, Jazebi M, et al. Von Willebrand disease in Iran: diagnosis and management. Ann blood 2018;3:1-11.

4.Fogarty H, Doherty D, O'Donnell JS. New developments in von Willebrand disease. Br J Haematol 2020;191:329-39.

5.Von Willebrand EA. Hereditary pseudohaemophilia. Haemophilia 1999;5:223-31.

6.Sharma R, Haberichter SL. New advances in the diagnosis of von Willebrand disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2019;2019:596-600.

7.Goodeve A, James P. von Willebrand Disease. 2009 Jun 4 [updated 2017 Oct 5]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2023.

8.Leebeek FW, Eikenboom JC. Von Willebrand's disease. N Engl J Med 2016;375:2067-80.

9.Echahdi H, El Hasbaoui B, El Khorassani M, Agadr A, Khattab M. Von Willebrand's disease: case report and review of literature. Pan Afr Med J 2017;27:147.

10.The World Federation of Hemophilia (WFH). Report on the Annual Global Survey 2021. Available from: https://wfh.org/article/report-on-the-annual-global-survey-2021-now-available/

11.Kujovich JL. von Willebrand's disease and menorrhagia: prevalence, diagnosis, and management. Am J Hematol 2005;79:220-8.

12.Mansouritorghabeh H. Consanguineous marriage and rare bleeding disorders. Expert Rev Hematol 2021;14:467-72.

13.Saadat M, Zarghami M. Consanguineous marriages among Iranian Mandaeans living in south-west Iran. J Biosoc Sci 2018;50:451-6.

14.Payandeh M, Rahimi Z, Kansestani AN, Hemmati S, Aleyasin M, Zare ME, et al. Clinical features and types of von Willebrand disease in women with menorrhagia referred to hematology clinic of kermanshah. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 2013;7:1-5.

15.Rahbar N, Faranoush M, Ghorbani R, Sadr Alsadat B. Screening of von Willebrand disease in Iranian women with menorrhagia. Iran Red Crescent Med J 2015;17:e18244.

16.Gindele R, Kerényi A, Kállai J, Pfliegler G, Schlammadinger Á, Szegedi I, et al. Resolving Differential Diagnostic Problems in von Willebrand Disease, in Fibrinogen Disorders, in Prekallikrein Deficiency and in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia by Next-Generation Sequencing. Life (Basel) 2021;11.

17.Favaloro EJ, Pasalic L. Laboratory Diagnosis of von Willebrand Disease (VWD): Geographical Perspectives. Semin Thromb Hemost 2022;48:750-66.

18.Kasatkar P, Shetty S, Ghosh K. VWF pseudogene: Mimics, masks and spoils. Clin Chim Acta 2010; 411: 607-609.

19.Shahbazi S, Mahdian R, Ala F, LAVERGNE JM, Denis C, Christophe O. Molecular characterization of Iranian patients with type 3 von Willebrand disease. Haemophilia 2009;15:1058-64.

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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.7.1]
[DOI: 10.61186/iau.33.2.174]

21.Etlik O, Koksal V, Arican-Baris ST, Baris I. Development and validation of a cost-effective in-house method, tetra-primer ARMS PCR assay, in genotyping of seven clinically important point mutations. Mol Cell Probes 2011;25:177-81.

22.Undi R, Lim HY, Wang W. Rapid and reliable identification of insulin 2 gene mutation in Akita diabetic mice by a tetra-primer-ARMS-PCR method. Heliyon 2019;5:e01112.

23.Suhda S, Paramita DK, Fachiroh J. Tetra primer ARMS PCR optimization to detect single nucleotide polymorphisms of the CYP2E1 gene. Asian Pacific J Cancer Prev 2016;17:3065-9.

24.Medrano RFV, De Oliveira CA. Guidelines for the tetra-primer ARMS–PCR technique development. Mol Biotechnol 2014;56:599-608.

25.Wang Y, Chen H, Wei H, Rong Z, Wang S. Tetra-primer ARMS-PCR combined with dual-color fluorescent lateral flow assay for the discrimination of SARS-CoV-2 and its mutations with a handheld wireless reader. Lab Chip 2022;22:1531-41.

26.Zongze Z, Xin Y, Awais AA, Weiqiang L, Chunqun W, Di W, et al. Development of a tetra-primer ARMS-PCR for detecting the E198A SNP in the isotype-1 β-tubulin gene of Haemonchus contortus populations in China. Vet Parasitol 2018;252:127-30.

27.Muhammad SB, Hassan F, Bhowmik KK, Millat MS, Sarwar MS, Aziz MA, et al. Detection of association of IL1β, IL٤R, and IL6 gene polymorphisms with cervical cancer in the Bangladeshi women by tetra-primer ARMS-PCR method. Int Immunopharmacol 2021;90:107131.

28. Mahmoudi S, Badali H, Rezaie S, Azarnezhad A, Barac A, Kord M, et al. A simple and low cost tetra-primer ARMS-PCR method for detection triazole-resistant Aspergillus fumigatus. Mol Biol Rep 2019;46:4537-43.

29.Heidari MM, Hadadzadeh M, Fallahzadeh H. Development of One-Step Tetra-primer ARMS-PCR for Simultaneous Detection of the Angiotensin Converting Enzyme (ACE) I/D and rs4343 Gene Polymorphisms and the Correlation with CAD Patients. Avicenna J Med Biotechnol 2019;11:118-23.

30.Fatima S, Khan B, Khan OY, Amjad M, Zehra S, Azhar A. Tetra-primers ARMS-PCR Based Association Analyses of Synonymous and Intronic Variants in the ADAM12 Gene with Susceptibility to Knee Osteoarthritis: A Case-Control Study. Biochem Genet 2022;60:1695-715.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-14]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.2.7.1]

[DOI: 10.61186/iau.33.2.174]