

นิพนธ์ต้นฉบับ

การวินิจฉัยผู้ป่วยโรควอนวิลลิแบรนด์ Type 2N โดยการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน

ณัฐพรทิตรา ผลากรกุล^{1,2}, วีระศักดิ์ ศาสนกุล¹, นงนุช สิริชัยนันท์¹ และ อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์¹

¹ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ²กองกุมารเวชกรรม โรงพยาบาลภูมิพลอดุลยเดช

บทคัดย่อ: โรควอนวิลลิแบรนด์ชนิด Normandy (type 2N) เกิดจากความผิดปกติของโมเลกุลของ von Willebrand factor (VWF) ทำให้การจับกันระหว่าง VWF กับ F VIII:C ลดลงอย่างมากหรือไม่จับเลย ทำให้ F VIII:C สลายตัวอย่างรวดเร็ว มีผลให้ระดับ F VIII:C ต่ำลง คล้ายคลึงกับโรคฮีโมฟีเลีย เอ ชนิดรุนแรงน้อย การวินิจฉัยโรควอนวิลลิแบรนด์ type 2N อย่างจำเพาะด้วยการศึกษา binding capacity ระหว่าง VWF กับ F VIII:C ทำได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการบางแห่ง ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาโดยการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ (mutation) ของยีนวอนวิลลิแบรนด์ เพื่อวินิจฉัยแยกโรควอนวิลลิแบรนด์ type 2N ออกจากโรคฮีโมฟีเลีย เอ ชนิดรุนแรงน้อย **วิธีการ:** เก็บข้อมูลผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยโรคฮีโมฟีเลีย เอ ชนิดรุนแรงน้อย ที่ได้รับการรักษาในหน่วยโลหิตวิทยาเด็กและมะเร็งในเด็ก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดีเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนวอนวิลลิแบรนด์ โดยวิธี PCR ด้วย primer ของ exon 18, 19, 20, 21 และ 24 ตรวจคัดกรองหาตำแหน่งผิดปกติของยีนด้วย conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) และตรวจยืนยันความถูกต้องด้วยวิธี sequencing **ผลการศึกษา:** มีผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลีย เอ ชนิดรุนแรงน้อยเข้าร่วมการวิจัย 14 ราย อายุที่เริ่มมีอาการเลือดออกผิดปกติตั้งแต่ 1 เดือนถึง 20 ปี เฉลี่ย 4 ปี 5 เดือน อาการที่พบได้แก่ จ้ำเลือด เลือดออกในช่องปาก เลือดออกในข้อ เลือดออกผิดปกติจากแผล และเลือดกำเดาไหล ตามลำดับ ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการมีดังนี้ ค่า F VIII:C ตั้งแต่ 5.5-21% (เฉลี่ย 11.8%) ค่า VWF:Ag ตั้งแต่ 81-140% (เฉลี่ย 88.7%) ค่า ristocetin cofactor activity ตั้งแต่ 54-140% (เฉลี่ย 85.9%) ได้ศึกษาการตอบสนองต่อการให้ DDAVP ทางหลอดเลือดดำในผู้ป่วย 8 ราย พบว่าที่ 1 ชั่วโมง ระดับ F VIII:C เพิ่มขึ้น 2.7-6 เท่า และที่ 4 ชั่วโมง ระดับ F VIII:C เหลือ 40% (1 ราย) 40-60% (2 ราย) และ >60% (5 ราย) ของระดับที่เพิ่มขึ้น ผลการตรวจ CSGE ให้ผลบวก ที่ยีนวอนวิลลิแบรนด์ exon 18 ในผู้ป่วยหนึ่งราย คิดเป็นร้อยละ 7.1 ซึ่งเป็นผู้ป่วยรายที่ผลการตอบสนองต่อการให้ DDAVP ทางหลอดเลือดดำที่มี half life ของ F VIII:C สั้นกว่าปกติ แต่การวิเคราะห์พบ polymorphism แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนวอนวิลลิแบรนด์ **สรุป:** การศึกษานี้ ไม่มีผู้ป่วยรายใดได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรควอนวิลลิแบรนด์ type 2N สามารถใช้วิธี CSGE เป็นการคัดกรองหายีนที่ผิดปกติและการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ด้วยวิธี sequencing หากไม่สามารถศึกษา factor VIII binding test

Key Words : ● โรควอนวิลลิแบรนด์ ● โรคฮีโมฟีเลีย เอ ชนิดรุนแรงน้อย

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2554;21:159-65.

บทนำ

โรควอนวิลลิแบรนด์เป็นโรคเลือดออกง่ายทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยที่สุด¹⁻⁶ เกิดจากความผิดปกติของยีนที่ควบคุมการสร้าง von Willebrand factor (VWF) ทำให้ปริมาณและ/หรือคุณภาพของ VWF ลดลง VWF เป็นโปรตีนในร่างกายนที่จับกับคอลลาเจนและ glycoprotein Ib receptor ของเกล็ดเลือด ทำให้เกล็ดเลือดยึดติดกับชั้นใต้เซลล์เอนโดเธลิยมและเกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ด

เลือด นอกจากนั้น VWF ยังเป็น carrier protein ของ factor VIII clotting activity (F VIII:C) ทำให้ F VIII:C สามารถคงสภาพในกระแสเลือด และออกฤทธิ์ในปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดได้^{1-3, 6-8}

ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้นักจะมีเลือดออกจากเยื่อต่างๆ เช่น เลือดกำเดาไหล จ้ำเขียวตามตัว เลือดออกมากหลังจากการผ่าตัด หรือหัตถการทางทันตกรรม ประจำเดือนมากผิดปกติ อาเจียนเป็นเลือดหรือถ่ายเป็นเลือด^{2,8,9} การวินิจฉัยอาศัยประวัติอาการเลือดออกผิดปกติในผู้ป่วยและครอบครัว การตรวจเบื้องต้น ได้แก่ จำนวนเกล็ดเลือด, bleeding time, activated partial thromboplastin time (APTT) และการตรวจยืนยันได้แก่ F VIII:C, VWF:Ag, ristocetin cofactor activity (VWF:RCO), collagen binding

ได้รับต้นฉบับ 12 พฤษภาคม 2554 ให้ลงตีพิมพ์ 19 กรกฎาคม 2554

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พญ.อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400 e-mail: raajs@mahidol.ac.th

capacity (VWF:CB), ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA), multimer analysis และ factor VIII binding test^{2,8,10}

โรควอนวิลลิแบรนด์แบ่งได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ type 1 มีระดับ VWF ต่ำกว่าปกติ (partial deficiency) type 2 มีความผิดปกติในคุณภาพของ VWF (qualitative defect) และ type 3 ไม่สร้าง VWF เลย (complete deficiency) type 1 และ 2 ถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบยีนเด่น (autosomal dominant) ยกเว้น type 2N และ type 3 ซึ่งถ่ายทอดแบบยีนด้อย (autosomal recessive)

โรควอนวิลลิแบรนด์ type 2 แบ่งเป็นชนิดย่อย 4 ชนิด ได้แก่ 2A, 2B, 2M และ 2N^{2,6,11,12} ซึ่ง 3 ชนิดแรกสามารถตรวจยืนยันการวินิจฉัยได้โดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น เช่น ระดับ VWF, ristocetin cofactor activity และ multimer analysis สำหรับการวินิจฉัย type 2N ซึ่งเกิดความผิดปกติของโมเลกุลของ VWF ด้าน N terminus ในส่วน D domain ทำให้การจับกันระหว่าง VWF กับ FVIII:C ลดลงอย่างมากหรือไม่จับเลย ทำให้ FVIII:C สลายตัวอย่างรวดเร็ว มีผลให้ระดับ FVIII:C ต่ำลง คล้ายคลึงกับโรคฮีโมฟีเลีย เอ ชนิดรุนแรงน้อยที่มีระดับ FVIII:C 5-40% (ค่าปกติ 50-150%)¹²⁻¹⁴ แต่การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาการจับกันระหว่าง VWF กับ FVIII:C มีข้อจำกัด ทำได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการบางแห่งเท่านั้น^{4,7,13,15}

ในด้านการรักษาเพื่อควบคุมอาการเลือดออกนั้น มีการศึกษาที่แสดงว่าค่าครึ่งชีวิตของ factor VIII:C ในผู้ป่วยโรควอนวิลลิแบรนด์ type 2N สั้นมากเพียง 2 ชั่วโมงครึ่งเท่านั้นหลังจากได้รับ factor VIII เข้มข้นที่ไม่มี VWF ซึ่งสั้นกว่าในผู้ป่วยฮีโมฟีเลีย เอ ชนิดรุนแรงปานกลางและรุนแรงน้อย และโรควอนวิลลิแบรนด์ type อื่น ดังนั้น ผู้ป่วยโรควอนวิลลิแบรนด์ type 2N ต้องการ factor VIII เข้มข้นที่มี VWF อยู่ด้วยจึงจะได้ผล นอกจากนี้การใช้ DDAVP ซึ่งได้ผลในการรักษาผู้ป่วยฮีโมฟีเลีย เอ ชนิดรุนแรงน้อย และโรควอนวิลลิแบรนด์ชนิดอื่นๆ ได้ผลไม่ดีในผู้ป่วย type 2N นี้¹³

ผู้ป่วยโรควอนวิลลิแบรนด์ type 2N มักมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง exon 18 ถึง 27 บนยีนที่ควบคุมการสร้างวอนวิลลิแบรนด์^{7,16} ทำให้เกิดการแทนที่กันของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ ของ VWF ตำแหน่งที่พบได้บ่อยคือที่ exon 20^{13,16-20}

ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาค้นหาความผิดปกติของยีนที่ควบคุมการสร้าง VWF ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคฮีโมฟีเลีย เอ ชนิดรุนแรงน้อย เพื่อหาการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีนวอนวิลลิแบรนด์ ซึ่งทำให้สามารถวินิจฉัยแยกโรคฮีโมฟีเลีย เอ ชนิดรุนแรงน้อย และโรควอนวิลลิแบรนด์ type 2N ได้ถูกต้อง เป็นผลดีต่อการวินิจฉัยและการรักษา ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ที่ถูกต้อง^{4,16}

วิธีการ

ผู้ป่วย

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคฮีโมฟีเลีย เอ ชนิดรุนแรงน้อย ที่ได้รับการรักษาในหน่วยโลหิตวิทยาและมะเร็งในเด็ก คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี โดยดูจากเวชระเบียนของโรงพยาบาลและแฟ้มประวัติของหน่วยโลหิตวิทยา-มะเร็งในเด็ก ผู้ป่วยและผู้ปกครองที่เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกราย จะได้รับทราบรายละเอียดเกี่ยวกับการเก็บข้อมูล การตรวจเลือดเพิ่มเติม และการติดตามนัด แล้วเซ็นใบยินยอม (informed consent form)

การเก็บข้อมูลพื้นฐาน

เก็บข้อมูลผู้ป่วยจากแฟ้มประวัติผู้ป่วย ได้แก่ เพศ อายุที่เริ่มแสดงอาการ และอายุที่มาโรงพยาบาลครั้งแรก ลักษณะอาการเลือดออก รวมทั้งโรคทางโลหิตวิทยาอื่นที่ร่วมด้วย

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ complete blood counts (CBC), coagulation studies, bleeding time, platelet aggregation, factor VIII clotting activity (F VIII:C), von Willebrand factor antigen (VWF:Ag) และ ristocetin cofactor activity (VWF:R Co)

การศึกษาความผิดปกติของยีนวอนวิลลิแบรนด์ เริ่มต้นด้วยการสกัดดีเอ็นเอจาก buffy coat โดยวิธี salting out แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำ amplification โดยใช้ primers สำหรับยีนวอนวิลลิแบรนด์ที่ตำแหน่ง exon 18, 19, 20, 21, และ 24 ในผู้ป่วยทุกคน สำหรับ primers²¹ ที่ใช้ในการศึกษานี้ ดังตารางที่ 1

หลังจากนั้น ทำการตรวจ conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) ทั้ง 5 exon เพื่อคัดกรองหาตำแหน่ง mutation และรวมทั้งการทำ sequencing ทั้ง 5 exon

สถิติ ใช้ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ความถี่และร้อยละ

ผลการศึกษา

เก็บข้อมูลผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลีย เอ ชนิดรุนแรงน้อย ที่ได้รับการรักษาในหน่วยโลหิตวิทยา-มะเร็งในเด็ก คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดีได้จำนวน 19 ราย มีผู้เข้ารับการวิจัย 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 73.7 ผู้ป่วยทุกรายไม่มีประวัติเลือดออกง่ายในครอบครัว

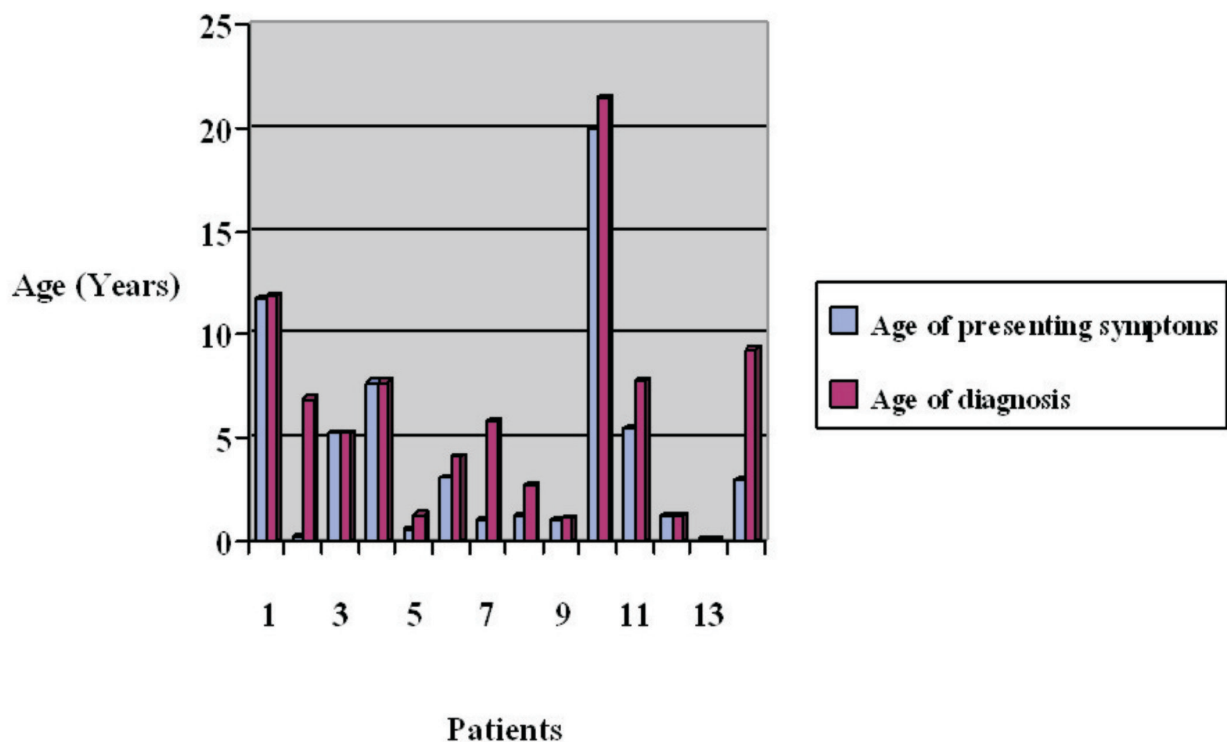
อายุ

อายุที่ผู้ป่วยเริ่มมีอาการเลือดออกผิดปกติ อยู่ในช่วงตั้งแต่ 1 เดือนถึง 20 ปี เฉลี่ย 4 ปี 5 เดือน

อายุที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคฮีโมฟีเลียเอ ชนิดรุนแรงน้อย อยู่ในช่วงตั้งแต่ 1 เดือน ถึง 21 ปี 1 เดือน เฉลี่ย 6 ปี 2 เดือน ดังแสดงในรูปที่ 1

Table 1 PCR primers used in this study

Exon	5' → 3' primer sequence	Product size
18F	AGA CTC TAG GGG ACC AAA GGA CA	289
18R	GAA AAC TGA AGG GCA GGC ACC AG	
19F	AGG GCT TTA GAT CAG TCA CTG TGG CCC T	
19R	TGG CCG CGT GCA CCC TCA CTC CAC C	227
20F	CCA CGC TAC AGG TCC TCA ACT TCC TT	
20R	TTC TGC AGA CAG ATC CAC AGA AC	
21F	AAT CTT CTG GTC TGG TGA GA	328
21R	CCT CAT CCT CTT TAA TGG CT	
24F	AGT GTG CTG ACA CCA GAA	
24R	ACA CTC TGT GTC CAT ACC A	416

**Figure 1** Age distribution of the patients**อาการเลือดออกผิดปกติ**

อาการเลือดออกผิดปกติที่พบในผู้ป่วย 14 ราย ได้แก่ จ้ำเขียว เลือดออกในช่องปาก เลือดออกในข้อ เลือดออกผิดปกติจากบาดแผล และเลือดกำเดา ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

DDAVP test

มีผู้ป่วยเคยได้รับการทำ DDAVP test 8 ราย เพื่อดูการตอบสนองของ FVIII:C ต่อการให้ DDAVP ทางหลอดเลือดดำ พบว่า ที่ 1 ชั่วโมง ระดับ FVIII:C เพิ่มขึ้น 2.7-6 เท่า ซึ่งถือว่าตอบสนองดี และที่ 4 ชั่วโมง ระดับ FVIII:C เหลือ 40 % ของระดับที่เพิ่มขึ้น 1 ราย (รายที่ 7) เหลือ 40-60% 2 ราย (รายที่ 3 และ 10)

เหลือ 60-80% 4 ราย (รายที่ 1, 2, 4, และ 8) และมากกว่า 80% 1 ราย (รายที่ 6) ดังแสดงในตารางที่ 3

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ผู้ป่วยทุกราย มีผลการตรวจ CBC รวมทั้ง bleeding time อยู่ในเกณฑ์ปกติ แต่ผู้ป่วยทุกรายมีค่า APTT ยาวผิดปกติ อยู่ในช่วงตั้งแต่ 40-72.5 วินาที เฉลี่ย 56.7 วินาที ผู้ป่วยทุกรายมีค่า FVIII:C ต่ำกว่าปกติ ตั้งแต่ 5.5-21% เฉลี่ย 11.8% ส่วน VWF:Ag และ VWF:RC อยู่ในช่วงตั้งแต่ 81-140% และ 54-140% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ปกติ ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5

การตรวจกรองหาการกลายพันธุ์ของยีน VWF ทั้ง 5 exon ด้วย

Table 2 Bleeding manifestations of the patients

Bleeding manifestations	Number of patients (%)
Ecchymosis	9 (64.3)
Gum and teeth bleeding	5 (35.7)
Hemarthrosis	4 (28.6)
Wound bleeding	4 (28.6)
Epistaxis	2 (14.3)

Table 3 Factor VIII: C responses to intravenous DDAVP

Patients	FVIII:C(%)					
	0 hr	1 hr	4 hr	8 hr	12 hr	24 hr
1	9	33	20.5	48	-	13
2	7.3	19	12.5	11	9	9
3	11	33	16	-	-	-
4	7	26	17	-	-	-
6	4	18	15	-	-	-
7	9	27	11	-	-	-
8	6.2	9.7	7.3	-	-	5.7
10	9.2	33	18	-	-	-

Table 4 Laboratory results of the patients

Laboratory	Range	Mean	Normal range
APTT (sec)	40-72.5	56.73	29-38
Factor VIII clotting activity (FVIII:C) (%)	5.5-21	11.76	50-150
Von Willebrand factor antigen (VWF:Ag) (%)	81-140	88.65	50-150
Ristocetin cofactor activity (VWF:RCO) (%)	54-140	85.93	50-150

Table 5 Individual laboratory results of the patients

Patients	Hematocrit (%)	Platelets (/ μ L)	APTT (sec)	FVIII:C (%)	VWF:Ag (%)	VWF:RCO (%)
1	43.9	254,000	40	5.5	81	62
2	40.8	180,000	47	8	65	95
3	42.8	440,000	57.2	10	100	140
4	39.9	272,000	59	11	140	100
5	36.6	319,000	72.5	10	62.9	89
6	37.5	499,000	66	7	59.5	55
7	42.5	331,000	57	8	108	116
8	39.7	318,000	71	20	97.5	79
9	34.9	294,000	62.5	10	96.5	72
10	44.2	226,000	65.5	9	106	110
11	40.5	381,000	49	16	75.5	80
12	33.2	312,000	63.5	13.2	97.5	132
13	37.8	492,000	40	16	50.7	54
14	38	380,000	44	21	101	75
Mean	39.5	335,571	56.73	11.76	88.65	85.93

วิธี CSGE ไม่พบว่ามีความผิดปกติในผู้ป่วยทุกราย ยกเว้นผู้ป่วย 1 ราย (ผู้ป่วยรายที่ 7) ที่ให้ผลบวก CSGE ที่ exon 18 คิดเป็นร้อยละ 7.1 เป็นผู้ป่วยรายที่ FVIII:C มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) สั้นผิดปกติหลังจากให้ DDAVP แต่การทำ sequencing ของยีน von Willebrand ที่ exon 18 พบมีความผิดปกติที่ตำแหน่ง 2365 A กลายเป็น G และ 2385 T กลายเป็น C ซึ่งเป็น single nucleotide polymorphism ที่เคยมีรายงานใน ISTH-SSC VWF online database แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรค VWD type 2N

วิจารณ์

ผู้ป่วยมาเข้าร่วมการศึกษาได้จำนวน 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 73.7 สาเหตุที่ไม่สามารถติดตามผู้ป่วยมาได้ทั้งหมด เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงที่อยู่หรือเบอร์โทรศัพท์

การศึกษานี้พบว่าอายุที่ผู้ป่วยเริ่มมีอาการเลือดออกผิดปกติและอายุที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคฮีโมฟีเลียเอ ชนิดรุนแรงน้อยอยู่ในช่วงตั้งแต่ 1 เดือนถึง 20 ปี เฉลี่ย 4 ปี 5 เดือน และ 1 เดือนถึง 21 ปี 1 เดือน เฉลี่ย 6 ปี 2 เดือน ตามลำดับ ส่วนอาการเลือดออกผิดปกติที่พบในผู้ป่วย สอดคล้องกับระดับความรุนแรงของโรคและไม่แตกต่างกับรายงานอื่น ที่น่าสนใจคือพบอาการเลือดออกในข้อ ซึ่งไม่น่าจะพบในผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลียชนิดรุนแรงน้อย นอกจากผู้ป่วยได้รับอุบัติเหตุ

ผู้ป่วยทุกรายมีผลการตรวจ CBC และ bleeding time อยู่ในเกณฑ์ปกติ ค่า APTT ยาวกว่าปกติ ค่า FVIII:C น้อยกว่าปกติ คือน้อยกว่า 40% (แต่มากกว่า 5%) และค่า VWF:Ag และค่า VWF:RCo อยู่ในเกณฑ์ปกติ จึงได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคฮีโมฟีเลียเอ ชนิดรุนแรงน้อย แต่ก็อาจเป็นโรค von Willebrand type 2N เช่นกัน จึงจำเป็นต้องตรวจทางห้องปฏิบัติการต่อ เพื่อให้ได้การวินิจฉัยที่ถูกต้อง ซึ่งโดยหลักการแล้วต้องทำการศึกษาเพื่อดูการจับกันระหว่าง VWF กับ FVIII:C ซึ่งโรค von Willebrand type 2N นั้น จะมีการจับกันที่ลดลงอย่างมาก ทำให้ FVIII:C สลายตัวอย่างรวดเร็ว แต่การตรวจนี้ทำได้ในห้องปฏิบัติการบางแห่งเท่านั้น

ส่วนการทำ DDAVP test ทั้งหมด 8 ราย พบว่าผู้ป่วยทุกรายตอบสนองต่อยา DDAVP ดี คือ FVIII:C เพิ่มขึ้น 2.7-6 เท่า โดยเพิ่มสูงสุดที่เวลา 1 ชั่วโมง สำหรับผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลียเอ ค่าครึ่งชีวิต ($T_{1/2}$) ของ FVIII:C หลังจากได้ยา DDAVP ทางหลอดเลือดดำ คือ 5-8 ชั่วโมง แต่ผู้ป่วยโรค von Willebrand type 2N นั้นค่าครึ่งชีวิต ($T_{1/2}$) ดังกล่าวจะสั้นมาก เหลือเพียง 2.5 ชั่วโมง ดังนั้นจากตารางที่ 3 ผู้ป่วยรายที่ 7 จึงเป็นผู้ป่วยที่อาจจะเป็นโรค von Willebrand type 2N มากที่สุด

สำหรับผลการตรวจ CSGE หากการกลายพันธุ์ของยีน VWF ทั้ง 5 exon ในผู้ป่วย 14 ราย พบมีผู้ป่วย 1 ราย ให้ผลบวกกับการตรวจ CSGE คิดเป็นร้อยละ 7.1 ของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัย แต่การตรวจ sequencing ไม่พบความผิดปกติของยีนซึ่งเป็นสาเหตุของโรค VWD type 2N ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังในการแปลผล CSGE ว่าเป็นผลบวกจริงหรือผลบวกปลอม ผู้ป่วยให้ผลบวกจริงต้องมองหาตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์รวมทั้ง single nucleotide polymorphism ส่วนผลบวกปลอมอาจเกิดจากเทคนิคการใส่ sample ใน well ที่เป็น vertical gel ที่อาจล้าง well ไม่สะอาดพอ มีเศษ gel ค้างใน well ทำให้เมื่อ run electrophoresis เห็นเป็น 2 bands จึงเข้าใจผิดคิดว่าให้ผลบวก

ดังนั้น ผู้ป่วยทุกรายในการศึกษานี้ได้รับการวินิจฉัยที่ถูกต้องแล้ว คือเป็นโรคฮีโมฟีเลียเอ ชนิดรุนแรงน้อย สามารถใช้ CSGE ในการตรวจคัดกรองหายีนที่ผิดปกติได้ แต่ต้องระมัดระวังในการทำและแปลผล CSGE และควรตรวจจำเพาะด้วยวิธี sequencing ของยีน von Willebrand หากไม่สามารถตรวจ factor VIII binding test ที่จำเพาะ

Reference

1. Mannucci PM. Treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 2001;86:149-53.
2. Laffan M, Brown SA, Collins PW, Cumming AM, Hill FGH, Keeling D, et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004;10:199-217.
3. Pasi KJ, Collins PW, Keeling DM, Brown SA, Cumming AM, Dolan GC, et al. Management of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004;10:218-31.
4. Casonato A, Pontara E, Sartorello F, Gemmati D, Cattini MG, Girolami A. Combined hemophilia A and type 2N von Willebrand's disease: defect of both factor VIII level and factor VIII binding capacity of von Willebrand factor. *Haematologica* 2001;86:1110-1.
5. Lethagen S, Carlson M, Lillarp A. A comparative in vitro evaluation of six von Willebrand factor concentrates. *Haemophilia* 2004;10:243-9.
6. Mazurier C, Ribba AS, Gaucher C, Meyer D. Molecular genetics of von Willebrand disease. *Ann Genet* 1998;41:34-43.
7. Miller CH, Kelley L, Green D. Diagnosis of von Willebrand disease type 2N: A simplified method for measurement of factor VIII binding to von Willbrand factor. *Am Hematol* 1998;58:311-8.
8. Budde U, Drewke E, Mainusch K, Schneppenhiem R. Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost* 2002;28:173-90.
9. Kirtava A, Crutcher S, Dilley A, Lally C, Evatt B. Trends in clinical management of women with von Willebrand disease: a survey

- of 75 women enrolled in haemophilia treatment centers in the United States. *Haemophilia* 2004;10:158-61.
10. Favaloro EJ, Bonar R, Kershaw G, Sioufi J, Hertzberg M, Street A, et al. Laboratory diagnosis of von Willebrand's disorder: quality and diagnosis improvements driven by peer review in a multilaboratory test process. *Haemophilia* 2004;10:232-42.
 11. Mannucci PM. Treatment of von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 2004;351:683-94.
 12. Fressinaud E, Mazurier C, Meyer D. Molecular genetics of type 2 von Willebrand disease. *Int J Hematol* 2002;75:9-18.
 13. Mazurier C, Goudemand J, Hilbert L, Caron C, Fressinaud E, Meyer D. Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:337-47.
 14. Schneppenheim R, Lenk H, Obser T, Oldenburg J, Oyen F, Schneppenheim S, et al. Recombinant expression of mutations causing von Willebrand disease type Normandy: characterization multimerization. *Thromb Haemost* 2004;92:36-41.
 15. Zarnovicanova M, Pelikanova S. von Willebrand disease type 2N (case report). *Vnitr Lek* 2003;49:319-21.
 16. Ginsburg D, Sadler JE. von Willebrand factor database. University of Michigan (Ann Arbor, MI), 1997. Available from: URL: <http://mmg2.im.med.umich.edu/vWF/>
 17. Gaucher C, Jorieux S, Mereier B, Outkir D, Mazurier C. The Normandy variant of von Willebrand disease-characterization of a point mutation in the von Willebrand factor gene. *Blood* 1991;77:1937-41.
 18. Gu J, Jorieux S, Lavergne JM, Ruan C, Mazurier C, Meyer D. A patient with type 2N von Willebrand disease is heterozygous for a new mutation: Gly22Glu. Demonstration of a defective expression of the second allele by the use of monoclonal antibodies. *Blood* 1997;89:3263-9.
 19. ISTH SSC vWF database. University of Sheffield, 2004. Available from: URL:<http://www.ragtimedesign.com/vWF/mutation/mutationtableresult.php>
 20. Keeney S, Cumming AM. The molecular biology of von Willebrand disease. *Clin Lab Haem* 2001;23:209-30.
 21. Nesbitt IM, Goodeve AC, Guilliatt AM, Makris M, Preston FE, Peake IR. Characterization of type 2N von Willebrand disease using phenotypic and molecular techniques. *Thromb Haemost* 1996;75:959-64.

Genotypic Diagnosis of Type 2N Von Willebrand's Disease

Nattapornitira Phalakornkul^{1,2}, Werasak Sasanakul¹, Nongnuch Sirachainan¹ and Ampaiwan Chuansumrit¹

¹Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University; ²Pediatric Section, Bhumibol Adulyadej Hospital

Abstract: Von Willebrand disease type Normandy (type 2N VWD) is characterized by a markedly decreased affinity of von Willebrand factor (VWF) for factor VIII (FVIII) caused by mutations at the FVIII binding site of VWF gene. Its clinical and laboratory findings are similar to mild hemophilia A. The confirmatory diagnostic test for type 2N is the FVIII binding capacity of VWF, which can be done in a few centers. Therefore, we aimed to perform the genotypic diagnosis of type 2N VWD. **Methods:** Medical records of mild hemophilia A patients diagnosed at the Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital were reviewed. Mutations in exons 18, 19, 20, 21 and 24 of the VWF gene were screened by conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) followed by the confirmatory study of sequencing. **Results:** Fourteen mild hemophilia A patients were enrolled in the study. Age of bleeding onset ranged from 1 month to 20 years with the mean of 4 years and 5 months. Bleeding symptoms included ecchymosis, oral mucosal bleeding, hemarthrosis, wound bleeding and epistaxis. FVIII:C, VWF:Ag, and ristocetin cofactor activity (VWF:R Co) ranged from 5.5% to 21% (mean 11.76%), 81% to 140% (mean 88.65%), and 54% to 140% (mean 85.93%), respectively. DDAVP test was performed in 8 patients and showed the 2.7-6 time increments of FVIII:C at 1 hour but decreased to 40%, 40% to 60% and >60% of the incremental level at 4 hour in 1, 2, and 5 patients, respectively. Only one patient revealed VWF gene polymorphism at exon 18 using CSGE but no mutation using the sequencing method. **Conclusions:** No patient in this study was diagnosed as type 2N VWD. However, CSGE and direct gene sequencing may be helpful where factor VIII binding test is not available.

Key Words : ● von Willebrand disease ● Mild hemophilia A ● Type 2 N ● CSGE ● Sequencing

J Hematol Transfus Med 2011;21:159-65.

