

Von Vilebrando liga sergančių pacientų gydymas desmopresinu ir diagnostika taikant multimerų tyrimą

Goda Aleknavičiūtė-Valienė¹, Irma Raščiūtė², Valdas Banys²

¹ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centras

Center of Laboratory Medicine, Vilnius University Hospital Santaros Klinikos

² Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra

Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University

El. paštas: goda.aleknaviciute@santa.lt

Santrauka

Įvadas. Von Vilebrando liga (vVL) yra pats dažniausias kraujo krešėjimo sutrikimas, kuriuo serga iki 1 % bendros populiacijos žmonių. Šios ligos diagnostika yra gana sudėtinga ir kompleksiška. Tik įvairių tyrimo metodų visuma gali užtikrinti patikimą vVL diagnozę, o svarbiausia – tikslų šios ligos tipo nustatymą. Vienas iš daugiausia iššūkių keliančių, tačiau tuo pat metu ir galimybių vVL suvaldyti atveriančių tyrimų yra von Vilebrando faktoriaus (vVF)

multimerų analizė elektroforezės būdu. Svarbus aspektas yra ir tai, jog šiuo tyrimu galima ne tik padėti diferencijuoti ligos tipus, bet ir stebėti desmopresino atsaką taikomam gydymui. Šio darbo tikslas – apžvelgti vVL patofiziologiją, diagnostiką elektroforezės metodu, gydymą desmopresinu ir atsaką į desmopresiną vertinimą. Atsižvelgiant į tai, kad vVF multimerų tyrimas atliekamas tik specializuotuose centruose ir ne visose Baltijos šalyse, tampa itin aktualu plėsti žinias apie šią metodiką, jos privalumus bei pritaikomumą.

Tyrimo medžiaga ir metodai. Atlikta literatūros apžvalga *PubMed*, *Cochrane Library* ir *Google Scholar* duomenų bazėse.

Išvados. Vertinant kartu su kitais vVF tyrimais, multimerų analizė leidžia diferencijuoti vVL tipus ir (ar) potipius – ypač 1, 2A/2B, 3. vVF multimerų tyrimas yra tinkamas ir pacientų, sergančių 1 tipo vVL, atsaką į desmopresiną stebėti, tačiau iki šiol nėra patvirtintų rekomendacijų, kiek laiko turi būti praėję po vaisto suleidimo, kaip tinkamai interpretuoti rezultatus. Siekiant pritaikyti šį metodą desmopresino atsaką stebėti bei užtikrinti objektyvius rezultatus, būtini tolimesni išsamūs moksliniai tyrimai.

Reikšminiai žodžiai: von Vilebrando liga, elektroforezė, desmopresinas, multimerai.

ĮVADAS

Von Vilebrando liga (vVL) – pats dažniausias kraujo krešėjimo sutrikimas, kuriuo serga iki 1 % bendros populiacijos žmonių. Pirmą kartą šis sutrikimas aprašytas dar 1926 m. suomių kilmės gydytojo Eriko von Vilebrando kaip liga, pasireiškianti įvairiais kraujavimais, tačiau besiskirianti nuo klasikinės hemofilijos. Tikimybė sirgti vVL tiek vyrams, tiek moterims yra vienoda, tačiau moterys serga du kartus dažniau. Darytina prielaida, kad moterims vVL diagnozuojama dažniau dėl menoragijos ar gausaus kraujavimo gimdymo metu. Nors šios ligos bendro pobūdžio simptomai gali pasireikšti bet kuriame amžiaus tarpsnyje, o simptomų sunkumas priklauso nuo vVL tipo, dažniausiai pasitaikantys ligos simptomai yra šie: lengvai atsirandančios hematomos; dažnas, ilgai trunkantis kraujavimas iš nosies, dantenų, o ypač po danties traukimo ar chirurginių procedūrų; smarkus ir ilgai trunkantis kraujavimas įsijovus [1]. Šios ligos diagnostika yra gana sudėtinga ir kompleksiška. Tik įvairių tyrimo metodų visuma gali užtikrinti patikimą vVL diagnozę, o svarbiausia – tikslų šios ligos tipo nustatymą. Todėl

siekiant, kad vVL sergantys asmenys galėtų gyventi kokybišką gyvenimą atsižvelgdami į ligos sunkumą ir rizikas, tampa itin svarbu užtikrinti tikslią ligos diagnostiką. Vienas iš daugiausia iššūkių keliančių, tačiau tuo pat metu ir galimybių vVL suvaldyti atveriančių tyrimų yra von Vilebrando faktoriaus (vVF) multimerų analizė elektroforezės būdu. Tai brangus, ilgai trunkantis, sudėtingas bei aukštos ne tik tyrimo atlikimo, bet ir rezultatų vertinimo kompetencijos reikalaujantis tyrimas. Tikėtina, kad tai yra pagrindinės priežastys, kodėl multimerų tyrimai Baltijos šalių regione atliekami tik Estijoje ir Lietuvoje trečiojo lygio ligoninėse. Svarbus aspektas yra ir tai, jog šiuo tyrimu galima ne tik padėti diferencijuoti ligos tipus, bet ir stebėti desmopresino (DDAVP) atsaką taikomam gydymui.

Šio darbo tikslas – apžvelgti von Vilebrando ligos patofiziologiją, diagnostiką elektroforezės metodu, gydymą desmopresinu ir atsaką į desmopresiną vertinimą. Atsižvelgiant į tai, kad vVF multimerų tyrimas atliekamas tik specializuotuose centruose ir ne visose Baltijos šalyse, tampa itin aktualu plėsti žinias apie šią metodiką, jos privalumus bei pritaikomumą.

Von Vilebrando ligos patofiziologija

vVL genas, esantis 12 chromosomos ilgajame petyje, gali būti paveldimas autosominiu dominantiniu arba autosominiu recesyviniu būdu, o pati liga išsivystyti dėl kiekybinio von Vilebrando faktoriaus (vVF) trūkumo ar kokybinio vVF baltymo vienos iš funkcijų praradimo [2]. vVF atlieka dvi esmines funkcijas: pirma, jis suriša trombocitus ir subendotelines struktūras veikdamas kaip pradinę jungiančiąją molekulę pirminės hemostazės metu, antra – suriša VIII krešėjimo faktorių ir apsugo jį nuo proteolizės. Šis faktorius yra itin didelis multimerinis glikoproteinas, kuris sintetinas endotelio ląstelėse ir megakariocituose [3]. Pirmiausia yra sintetinas pirminis vVF geno produktas – pre-pro-vVF molekulė, kurioje iki 22 aminorūgščių (a. r.) liekanų sudaro signalinį polipeptidą, 23–764 a. r. liekanos yra liekamojo propeptido dalis, o 765–2813 a. r. liekanos sudaro pagrindinį vVF subvienetą. Signalinis polipeptidas pre-pro-vVF molekulėje pašalinamas išnašos iš branduolio į endoplazminį tinklą metu. Propeptidas ir pagrindinis subvienetas sudaro pro-vVF molekulę. Tai yra mažiausias aktyvus vienetas – monomeras. Pagrindiniai vVF sintezės žingsniai apima N-glikozilinimą, kurio metu pro-vVF monomerai jungiasi į dimerus, o toliau vykdoma dimerų multimerizacija, kai dimerai jungiasi į itin didelę spiralę [3–4]. Po sekrecijos kraujyje išvyniota labai didelės molekulinės masės (LDMM) multimerų molekulė (>20 dimerų, iki 20 000 kDa) skaldoma į fragmentus veikiant kraujo plazmos proteazei ADAMTS13 (angl. *a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13*) [3]. LDMM sveikų žmonių kraujyje neaptinkama, nes jos jai patekus į kraujotaką ADAMTS13 fermentas ima skaidyti vVF multimerą A2 domene. Įprastai cirkuliacijoje randami multimerai gali būti mažos molekulinės masės (MMM) ir sudaryti iš 1–5 dimerų (500–2 500 kDa), vidutinės molekulinės masės (VMM) – 6–10 dimerų (3000–5000 kDa) bei didelės molekulinės masės (DMM) – 11–20 dimerų (5 500–10 000 kDa) [3–4]. 95 % viso susintetinto vVF išskiriama į kraujotaką, o likusi dalis nukreipiama į saugojimo granules – Weibel–Palade kūnelius endotelinėse ląstelėse arba alfa granules megakariocituose. Weibel–Palade kūneliuose saugomi vVF multimerai yra didesni nei 10 000 kDa [3, 5].

Tarptautinės trombozės ir hemostazės draugijos (angl. *The International Society on Thrombosis and Haemostasis – ISTH*) rekomendacijose nurodoma, kad pacientai, sergantys vVL, turėtų būti klasifikuojami į tris grupes: į 1-ą, 2-ą ir 3-ią tipus [6]. Pirmas tipas nustatomas 60–80 % sergančių pacientų. Tai dalinis kiekybinis sutrikimas, pasireiškiantis sumažėjusiu vVF kiekiu kraujyje. Šio tipo vVL sukeliančios mutacijos sutrikdo dimerų brendimą, pernašą ir multimerų stabilumą. Dėl šių priežasčių itin greitai degraduoja multimerai ir sumažėja funkcionalaus baltymo kiekis kraujyje. Pirmo tipo vVL sergantiems pacientams dažniausiai būdingi lengvi kraujavimo epizodai. Taip pat yra išskiriamas ir 1C potipis, kuris atsiranda dėl reikšmingai padidėjusio vVF klirenso, dėl ko sumažėja vVF ir atsiranda didesnis atsakas į desmopresiną, nei įprastai [2–3]. Antro tipo vVL sukelia kokybiniai vVF struktūros arba funkcijos sutrikimai. Šis tipas nustatomas 15–30 % sergančiųjų vVL ir dažniausiai pasireiškia vidutinio sunkumo simptomais. vVL 2 tipas klasifikuojamas į keturis potipius: 2A, 2B, 2M ir 2N.

Potipiui 2A būdinga sutrikusi nuo vVF priklausoma trombocitų adhezija bei DMM ir VMM multimerų stoka dėl įvykusių mutacijų, kurios lemia netinkamą vVF multimerizaciją ir padidina ADAMTS13 proteazės poveikį. Potipis 2B išsivysto tuomet, kai padidėja afinitetas trombocitų GPIb receptoriams – tuomet atsiranda DMM stoka. Potipį 2M sukelia sutrikusi nuo vVF priklausoma trombocitų adhezija be selektyvios DMM multimerų stokos. Potipis 2N išsivysto dėl sumažėjusio vVF prisijungimo prie VIII krešėjimo faktoriaus [2, 7]. Trečio tipo vVL lemia beveik visiškai vVF baltymo nebuvimas ir labai mažas VIII krešėjimo faktoriaus (FVIII) aktyvumas. Šio tipo ligą sukelia stabdančios ir skaitymo rėmelio poslinkio mutacijos. Trečio vVL tipo pacientams simptomai būna sunkiausi, gali pasireikšti kraujavimas į raumenis ar sąnarius be jokios traumos. Šis tipas yra rečiausias, nustatomas 1 pacientui iš 1 milijono [1]. Retais atvejais pasitaiko įgytas von Vilebrando sindromas. Jis atsiranda, kai sumažėja vVF koncentracija, pakinta struktūra ar funkcija, nors vVF gaminamas kiekis nepakitęs. Taip nutinka dėl įvairių įgytų būklių, pvz.: lėtinės limfocitinės leukemijos, aortos stenozės, įvairių imunologinių būklių (hipotirozės), autoimuninių ligų, arba tam tikrų vaistų vartojimo (pvz. vaistų nuo traukulių). Kadangi įgytą von Vilebrando sindromą gali sukelti plati įvairovė būklių, sindromo klinikinis vaizdas nėra galutinai aiškus, todėl dažnai neatpažįstamas, kol pacientai nepatiria sunkios traumos ar operacijos. Įgytu sindromu sergančių asmenų kraujyje vVF multimerų frakcijų pasiskirstymas dažnai panašus į 2A tipą [3].

Desmopresinas

Desmopresinas (DDAVP), dar žinomas kaip 1-desamino-8-D-arginino vazopresinas, yra natūralaus hormono vazopresino sintetinis analogas [8]. Šis vaistas pirmą kartą susintetintas 1969 m. Danijoje mokslininko Poulo B. Jepseno kartu su kolegomis [9]. Tyrėjų komanda nagrinėjo vazopresino struktūrą ir siekė sukurti patobulintą farmakologinių savybių turintį junginį. Natūralaus vazopresino cheminė struktūra pakeista dviejose vietose, deamininant cisteiną ir pakeičiant L-argininą D-argininu. Europoje DDAVP pradėtas vartoti 1977 m. gydant sutrikimus, pasireiškiančius per mažą antidiurezinio hormono gamybą, pavyzdžiui, ne cukrinį diabetą ar naktinę enurezę [10]. Taip pat DDAVP preparatai imti vartoti ir krešėjimo sutrikimams, ypač vVL, gydyti. Šių dienų medicinoje DDAVP dažniausiai vartojamas kraujavimo kontrolei ir profilaktikai arba prieš nedidelės chirurgines operacijas.

Vazopresino receptoriai yra randami inkstuose, kepenyse, smegenyse, aortos lygiuosiuose raumenyse, taip pat ant trombocitų paviršiaus. Šie vazopresino receptoriai skirstomi į dvi grupes: V1 ir V2. V1 receptoriai didina fosfatidilinozitolio ir kalcio jonų koncentraciją. Padidėjusi Ca^{2+} koncentracija skatina kraujagyslių lygiųjų raumenų susitraukimus. V2 receptorius distaliniuose meduliniuose nefronuose aktyvuoja adenilato ciklazę ir taip ląstelėse padidina adenosino monofosfato kiekį [11]. DDAVP veikimo mechanizmas apima jo gebą stimuliuoti vVF atpalaidavimą iš endotelinių ląstelių. DDAVP jungiasi ir aktyvina V2 receptorių ant endotelinių ląstelių, tai lemia proteinkinazės A aktyvavimą, dėl to

vVF atpalaiduojamas iš *Weibel–Palade* kūnelių, o faktorius VIII – iš endotelinių ląstelių [12]. Taip kraujo cirkuliacijoje yra padidinamas tiek vVF kiekis, kuris jungdamasis prie trombocitų aktyvina jų agregaciją, tiek FVIII, kuris dalyvauja krešėjimo kaskadoje. Svarbus aspektas yra ir tai, kad DDAVP stimuliuoja ADAMTS13, kuri LDMM multimerus skaido į mažesnius.

DDAVP yra kelių farmakologinių formų: nosies purškalo, tabletės, injekcinis tirpalas (intraveninis (i/v) arba poodinis (p/o)). vVL gydyti vartojamas tik injekcinis tirpalas, kurio skilimo pusperiodis priklauso nuo injekcijos tipo. Intraveninio desmopresino veikimo pradžia bei skilimo pusperiodis yra trumpesni lyginant su p/o. Desmopresino i/v tirpalo skilimo pusperiodis 1,5–3 val., o veikimo pradžia 30 min.–2 val. po injekcijos ir tęsiasi 2–4 val. P/o desmopresinas turi šiek tiek ilgesnį skilimo pusperiodį – 2,5–4 val. ir lėtesnę veikimo pradžią – 1–3 val. [13]. Be abejonės, šios desmopresino veikimo bei skilimo trukmės gali svyruoti kiekvienam pacientui individualiai, priklausomai nuo jo amžiaus ir inkstų funkcijos, todėl ir dozė, ir injekcijos būdo pasirinkimas turi būti individualizuoti. Dažniausi šio vaisto šalutiniai poveikiai yra galvos, pilvo skausmai, pykinimas, hiponatremija, paraudimas infuzijos vietoje, hipertenzija ar hipotenzija. Šie šalutiniai poveikiai gali būti kontroliuojami lėčiau suleidžiant DDAVP. Šio vaisto negalima vartoti pacientams, kuriems diagnozuota vainikinių arterijų liga [3]. Jį reikėtų skirti atsargiai pacientams, kurie turi nekontroliuojamą hipertenziją, neseniai patyrusiems miokardo infarktą ar insultą, taip pat sergantiems krūtinės angina, dėl galimos trombozės rizikos [14]. DDAVP gali būti saugiai skiriamas gimdymo metu vVL sergančioms moterims, kurios jį sėkmingai vartojo pirmąjį nėštumo trečdalį atliekant tokias invazines procedūras, kaip vilocentezė ir amniocentezė [14].

Vadovaujantis ISTH rekomendacijomis, DDAVP yra pirmo pasirinkimo vaistas pacientams, sergantiems 1 tipo vVL [12]. Taip pat DDAVP kartais gali būti skiriamas 2A potipiu, bet ne 2B, 2M, 2N bei 3 vVL tipu sergantiems asmenims. 2B atvejais DDAVP gali sužadinti trombocitų sukibimą su vVF, lemti didelių nefunkcionalių agregatų susidarymą ir dėl to paūmėjusį kraujavimą [11, 15]. Retrospektyviojoje studijoje, atliktoje su 55 pacientų imtimi, buvo parodyta, jog net 43 % pacientų po injekcijos patyrė kraujavimo epizodus [16]. 2M potipio atveju yra sutrikusi nuo vVF priklausoma trombocitų adhezija, o DDAVP skatinama vVF ir FVIII sekrecija neturės įtakos tinkamos vVF ir trombocitų sąveikos susidarymui, kadangi problema yra ne vVF kiekis, o struktūros defektai [10, 16]. 2N potipio atveju situacija labai panaši į 2M, tik yra pastebimas vVF ir FVIII sąveikos defektas. Dėl šios priežasties DDAVP didinama FVIII ir vVF koncentracija neturės įtakos tinkamam krešėjimui ir vaistas bus neveiksmingas kraujavimui gydyti [17]. Svarbu paminėti, jog pacientai gali patirti kraujavimo epizodus po vaisto suleidimo, nes sumažės FVIII aktyvumas dėl defektyvaus vVF ir FVIII jungimosi [18]. Ligos 3 tipui būdingas absoliutus vVF nebuvimas, tad dėl šios priežasties DDAVP injekcijos bus visiškai neefektyvios. Pacientams, sergantiems

1 tipo liga, DDAVP efektyvumas varijuoja: vieniems atsakas yra geresnis, kitiems – prastesnis. Atsaką galima pagerinti optimizuojant dozę ir injekcijos tipą kiekvienam pacientui individualiai. Kadangi ne visi pacientai vienodai reaguoja į vaistą ir atsako stiprumas bei trukmė skiriasi, svarbu stebėti pacientų atsaką, kad būtų galima nustatyti tinkamiausią dozę, vartojimo dažnumo poreikį ir įvertinti gydymo efektyvumą bei nustatyti, ar reikia papildomų vaistų. Siekiant nustatyti individualų atsaką į vaistą modelį reikalinga bandomoji DDAVP infuzija. Atsakas į DDAVP vertinamas mažiausiai po 1 valandos (piko metu) nuo infuzijos [14]. Atsakas dažniausiai stebimas pasitelkiant keletą tyrimų, pavyzdžiui:

- vVF antigeno (vVF:Ag) tyrimą, kurio metu matuojamas vVF baltymo kiekis paciento mėginyje;
- vVF aktyvumo (vVF:Ac) tyrimą, kurio metu matuojamas funkcinis vVF aktyvumas paciento mėginyje;
- FVIII aktyvumo tyrimą, kurio metu matuojamas funkcinis FVIII aktyvumas paciento mėginyje.

Po DDAVP visų šių tyrimų rezultatai, t. y. vVF:Ag kiekis, vVF:Ac, FVIII aktyvumas, turi reikšmingai padidėti po 1–2 val. ir tokie rezultatai išlikti iki 8–12 val. vVF:Ag kiekio bei FVIII aktyvumo padidėjimas varijuoja ir priklauso nuo pradinio vVF bei FVIII kiekio paciento kraujyje. Tačiau dažniausiai randamas didesnis vVF:Ac padidėjimas nei vVF:Ag. Atsakas laikomas efektyviu, kai vVF:Ac ir (ar) FVIII aktyvumas būna bent 3 kartus didesnis nei pradinis lygis [14]. Taip pat svarbu išmatuoti vVF:Ac bei FVIII aktyvumą plazmoje praėjus 4 val. po DDAVP infuzijos, kad būtų galima nustatyti šių rodiklių klirenso modelį. Praėjus 30–90 min. po DDAVP infuzijos, vVF:Ac bei FVIII aktyvumas padidėja nuo dviejų iki penkių kartų, o į pradinės ribas grįžta praėjus maždaug 8–10 val. [3]. Tačiau nemaža dalis pacientų gali turėti labai trumpą FVIII ir vVF:Ac pusinės eliminacijos periodą, o į pradinį lygį šis rodiklis gali grįžti jau po 2–4 val. [14].

Trombocitų funkcijos tyrimas (PFA-100/PFA-200) taip pat tinkamas DDAVP terapijos efektyvumo stebėsenai. Dažniausiai po DDAVP PFA tyrimų rezultatai patenka į pamatinių biologinių verčių intervalus.

vVF multimerų analizė elektroforezės metodu

Įtariant vVL, pirmiausiai pradedama nuo pirminio atrankinio laboratorinio įvertinimo: atliekamas automatizuotas hematologinis tyrimas, trombocitų funkcijos tyrimai, fibrinogeno, aktyvinto dalinio tromboplastino laiko (ADTL) bei protrombino laiko (PL) nustatymas. Stipriai pailgėjęs ADTL pastebimas 3 bei 2N vVL tipų atvejais, kai pailgėjimą lemia sumažėjusi FVIII koncentracija [5]. Vis dėlto dažnu atveju nustatytas ADTL patenka į pamatinių biologinių verčių intervalo ribas arba yra tik šiek tiek pailgėjęs. PL ir fibrinogeno tyrimai naudojami siekiant atmesti kitas kraujavimo priežastis, nes vVL atveju šie rodikliai išlieka pamatinių biologinių verčių intervalų ribose. Norint nustatyti vVL tipą, diagnostikai pasitelkiami skirtingi specifiniai tyrimai: vVF:Ag, vVF:Ac, FVIII aktyvumo, trombocitų

agregacijos, vVF multimerų (vVF:MM) bei molekuliniai genetiniai tyrimai.

Pagal ISTH rekomendacijas, vVF:MM tyrimas indikuojamas tik tada, kai vVF:Ac ir vVF:Ag santykis yra $<0,7$, taip diferencijuojant 2A, 2B, 2M potipius [6]. Tačiau klinikinėje praktikoje vVF:MM atliekamas ir 1 tipo vVL pacientams. Multimerų tyrimo principas pagrįstas elektroforezės principu. Tai brangus, sudėtingas bei aukštos ne tik tyrimo atlikimo, bet ir rezultatų vertinimo kompetencijos reikalaujantis tyrimo metodas. Tai yra pagrindinės priežastys, kodėl multimerų tyrimas Baltijos šalių regione atliekamas tik Estijoje ir Lietuvoje trečio lygio ligoninėse.

Pirmasis vVF:MM elektroforezės metodas aprašytas sąlyginai vėlai, tik 1993 m. Net ir modifikuotas siekiant išgauti geresnę MMM multimerų raišką ir sutrumpinti tyrimo laiką, užtrunka mažiausiai 18 val. Dabar visame pasaulyje įsivyravę pirmasis ir kol kas vienintelis prancūzų *in vitro* diagnostikos priemonių gamintojo *Sebia* sukurtas pusiau automatizuotas vVF:MM elektroforezės metodas, kuris užtrunka apytiksliai 7 val. Šį metodą lyginant su kitais laboratorijose sukurtais metodais (angl. *in-house*), kurių yra keletas, vieni iš pagrindinių privalumų yra trumpas atlikimo laikas bei standartizacija ir atkuriamumas [19]. Dauguma laboratorijose sukurtų metodų remiasi natrio dodecilsulfato (SDS) baltymų elektroforeze poliamidiniame gelyje, kur multimerams gelyje vizualizuoti pasitelkiami radioaktyviais izotopais žymėti polikloniniai antikūnai arba monokloninių antikūnų derinys [20]. Taip pat gali būti atliekama ir *Western-blot* analizė, kai multimerai identifikuojami imunofluorescencijos ar kitu dažymo būdu. Tokius laboratorijų sukurtus metodus sudėtinga standartizuoti ir dažniausiai jiems reikalinga specializuota įranga bei aukšta specialistų kompetencija, o štai komerciniai rinkiniai turi standartizuotus protokolus bei validuotus reagentus. *Sebia* vVF:MM sistemos naudojimas užtikrina patikimus, tikslus bei

atsikartojančius rezultatus, kuriuos gali būti sunku pasiekti naudojant daug rankinio darbo reikalaujančius laboratorijų sukurtus metodus. Šio metodo rezultatų analizės etape naudojamas gelio skenavimas densitometru lemia puikų rezultatų atsikartojamumą, o pats metodas pasižymi dideliu jautrumu (100 %) ir specifiskumu (97,1 %) [21]. Taip pat pažymėtini ir kiti privalumai: pusiau automatizuota sistema leidžia pasiekti didelį našumą bei greitą sąlyginai didelio mėginių skaičiaus analizę (iki 10 mėginių), dėl to sutaupoma laiko ir resursų. Dažniausiai standartizuoti komerciniai rinkiniai yra pigesni nei reagentai bei įvairi įranga, reikalinga laboratorijų sukurtiems metodams, tad jie leidžia sutaupyti lėšų.

vVF:MM tyrimas pagrįstas baltymų atskyrimu pagal jų dydį ir krūvį, o esminiai šio metodo etapai yra šie: 1) pacientų plazmos mėginių elektroforezė agarozės gelyje: dėl savo molekulinės masės DMM multimerai migruoja lėčiau nei MMM, todėl pastarieji migruoja toliausiai nuo mėginio užnešimo takelio; 2) pirmoji imunofiksacija su antikūnais prieš vVF antigeną; 3) antroji imunofiksacija su peroksidaze konjuguotais monokloniniais antikūnais; 4) agarozės gelio frakcijų vizualizavimas dažais; 5) gelio džiovinimas, plovimas ir skenavimas densitometru (1 pav.) [22]. Agarozės gelyje vVF:MM frakcijas galima įvertinti vizualiai, tačiau skirtingo dydžio multimerų frakcijų MMM, VMM, DMM (2 pav., A) santykiui (procentiniam) įvertinimui būtinas skenavimas densitometru (2 pav., B). Esant 1 tipo vVL paprastai yra matomos visos trys multimerų frakcijos, jų procentinis pasiskirstymas yra būdingas ir sveikiems asmenims, tačiau vizualiai gelyje yra mažesnio intensyvumo, o tai atspindi mažesnę vVF baltymo koncentraciją tiriamoje kraujo plazmoje (2 pav., B 2). Kitiems vVL tipams būdingas vVL:MM frakcijų pasiskirstymas apibendrinamas lentelėje [6, 22, 23]. Iš lentelėje pateiktų duomenų akivaizdu, kad vien vVF:MM tyrimo vVL tipui ar potypiui diferencijuoti neužtenka – būtina vVF tyrimų visuma, neretai apimanti ir molekulinis genetinis tyrimas.

Lentelė. vVF multimerų elektroforezės rezultatų variantai ir tikėtini vVL tipai

Table. Variants and possible types of vWD of results obtained during vWF multimer electrophoresis

Galimas vVF multimerų modelis	Tikėtinas ligos tipas
Aiškiai matomos visos trys frakcijos	Sveikas pacientas arba 2M, 2N tipai
Tuščias takelis gelyje	3 tipas
Sumažėjęs visų trijų frakcijų intensyvumas	1 tipas
Matoma LDMM frakcija	1C tipas
DMM intensyvumo sumažėjimas arba nebuvimas	2A, 2B tipai, retai įgytas von Vilebrando sindromas
DMM nebuvimas ir VMM intensyvumo sumažėjimas arba nebuvimas	Dažniausiai 2A tipas, tačiau būtina diferencijuoti nuo 2B tipo

LDMM – labai didelės molekulinės masės multimerai; DMM – didelės molekulinės masės multimerai; VMM – vidutinės molekulinės masės multimerai

vVF:MM elektroforezės tyrimas gali būti naudojamas ne tik diagnostikai, bet ir gydymo efektyvumo stebėsenai. Tai ypač svarbu 1 tipo vVL pacientams, kurių atsaką į DDAVP gydymą galima stebėti vertinant, ar ir kaip po gydymo pasikeitė frakcijų intensyvumas. Nors kol kas šis tyrimas nėra naudojamas DDAVP atsako stebėsenai, tačiau DDAVP gali paveikti multimerų dydžio pasiskirstymą. Nors ir atliktų tyrimų, įrodančių frakcijų išsidėstymo pokyčius, nėra daug, tačiau aprašomas DMM frakcijos padidėjimas [20]. Šios

molekulinės masės multimerai yra svarbūs trombocitų adhezijai bei agregacijai ir taip prisideda prie geresnės hemostazės po DDAVP injekcijos. Komercinio vVF:MM tyrimo rinkinio gamintojas aprašo, jog metodas gali būti naudojamas DDAVP terapijos efektyvumui vertinti, tačiau jokių tyrimų kol kas neatlikta. Taip pat nėra rekomendacijų, kiek laiko praėjus po vaisto suleidimo reikėtų paimti paciento kraujo mėginį ir kaip tinkamai interpretuoti rezultatus. Kadangi nėra rekomendacijų, gali pasitaikyti neobjektyvių paciento atsako į gydymą

vertinimų ar net klaidų. Dėl šios priežasties prieš pradedant naudoti šį tyrimą terapijai įvertinti būtina išsamiau ištirti ir įvertinti vVF:MM frakcijų pasiskirstymo pokyčius bei nustatyti rekomendacijas, kaip ir kada imti mėginius.

IŠVADOS

Pastaraisiais dešimtmečiais buvo įdėta daug pastangų siekiant suprasti ir išsiaiškinti visus biologinius mechanizmus, kurie dalyvauja vVL patogenezėje. Nors egzistuoja tiksli ligos tipų ir potipių klasifikacija, tačiau jų nustatymas kelia daug iššūkių ne tik kliniciams, bet ir laboratorijų specialistams. Siekiant tiksliai klasifikuoti tipus ar potipius, reikia pasitelkti įvairius diagnostinius algoritmus, kurie apima

ne vieną reikalingą vVF tyrimą. Vienas iš svarbių tyrimų yra von Willebrando faktoriaus multimerų analizė elektroforezės metodu. Vertinant kartu su kitais vVF tyrimais, multimerų analizė leidžia diferencijuoti vVL tipus ir (ar) potipius, ypač 1, 2A/2B ir 3. vVF:MM tyrimas yra tinkamas ir pacientų, sergančių 1 tipo vVL, atsako į desmopresiną stebėsenai, tačiau iki šiol nėra patvirtintų rekomendacijų, kiek laiko turi būti praėję po vaisto suleidimo, kaip tinkamai interpretuoti rezultatus. Siekiant pritaikyti šį metodą DDAVP atsako stebėsenai bei užtikrinti objektyvius rezultatus, būtini tolesni išsamūs moksliniai tyrimai.

Gauta: 2023 05 15

Priimta spaudai: 2023 07 29

Summary

TREATMENT OF PATIENTS WITH VON WILLEBRAND DISEASE WITH DESMOPRESSIN AND DIAGNOSIS BY MULTIMER ASSAY

Goda Aleknavičiūtė-Valienė,
Irma Raščiūtė, Valdas Banys

Introduction. Von Willebrand disease (vWD) is the most common blood clotting disorder, affecting up to 1% of the general population. The diagnosis of this disease is quite difficult and complex. Only a set of various research methods can ensure a reliable diagnosis of vWD, and most importantly, the determination of the type of this disease. One of the most challenging but at the same time opening up opportunities for vWD control is the analysis of Von Willebrand factor (vWF) multimers by electrophoresis. An important aspect is that this test can not only help to differentiate the types of the disease, but also it is useful to

monitor desmopressin's response to treatment. The aim of this work is to review the pathophysiology of vWD, diagnosis by electrophoresis, treatment and assessment of response to desmopressin. vWF multimers is carried out only in specialized centers and not in all Baltic countries, thus it becomes extremely important to expand knowledge about this methodology, its advantages and applicability.

Material and methods. Literature review was performed in PubMed, Cochrane Library and Google Scholar databases.

Conclusions. When evaluated together with other vWF tests, multimer analysis allows differentiation of vWD types and/or subtypes – especially 1, 2A/2B, 3. The vWF multimer test is also suitable for monitoring response to desmopressin in patients with type 1 vWD, but so far there are no established recommendations about how long after drug administration blood sample should be taken and how to interpret the results. In order to apply this method to the monitoring of desmopressin response and to ensure objective results, detailed scientific studies are necessary.

Keywords: von Willebrand disease, electrophoresis, desmopressin, multimers.

LITERATŪRA

1. Fogarty H, Doherty D, O'Donnell JS. New developments in von Willebrand disease. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 329–39. doi: 10.1111/bjh.16681.
2. Denis CV, Susen S, Lenting PJ. Von Willebrand disease: what does the future hold? *Blood* 2021; 137(17): 2299–2306. doi.org/10.1182/blood.2020008501.
3. Craig S, Craig M, Konkle A. Consultative hemostasis and thrombosis. 3rd ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data Consultative hemostasis and thrombosis. 2013. ISBN: 978-1-4557-2296-9.
4. Stocksclaeder M, Schneppenheim R, Budde U. Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014; 25(3): 206–16. doi: 10.1097/MBC.0000000000000065.
5. Marder VJ, Aird WC, Bennet JS, Schulman S, White GC. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2013.
6. James D, Connell T, Ameer B, di Paola D, Eikenboom J, Giraud N, et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Adv* 2021; 5(1): 280–300. doi:10.1182/bloodadvances.2020003265.
7. National Hemophilia Foundation [žiūrėta 2023-02-02]. Internetinė prieiga: www.hemophilia.org/bleeding-disorders-a-z/types/von-willebrand-disease.
8. Laffan M, Lester W, O'Donnell S, Will A, Tait RC, Goodvee 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. doi: 10.1111/bjh.13064.
9. Jeppesen PB, Høgh O, Schwartz T. Desmopressin: a new potent and specific vasopressin analogue. *Brit J Pharmacol* 1972; 44(1): 69–75. doi: 10.1111/j.1476-5381.1972.tb07279.x.

10. Kruse-Jarres R, Johnsen M, Kessler C, Srivastava A, Serban M, Werner S, et al. An observational study of patients with von Willebrand disease treated with Wilate: efficacy and safety in elective and emergency surgery. *Haemophilia* 2013; 19(5): 696–702.
11. Siddiq S, Abiad R, Hopman W, James P. Desmopressin use and platelet function in patients with type 2B von Willebrand disease. *J Thromb Haemost* 2017; 15(8): 1613–20.
12. Mannucci M. New therapies for von Willebrand disease. *Blood Adv* 2019; 3(21): 3481–7. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000368.
13. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia* 2013; 19(1): e1–e47. doi: 10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x
14. Castaman G, Goodeve A, Eikenboom J. European Group on von Willebrand Disease. Principles of care for the diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Haematologica* 2013; 98: 667–74. doi: 10.3324/haematol.2012.077263.
15. Castaman G, Lethagen S, Federici B, Tosetto A, Goodeve A, Budde U, et al. Response to desmopressin is influenced by the genotype and phenotype in type 2 von Willebrand disease (VWD): results from the European study MCMDM-1VWD. *Blood* 2015; 125(11): 1701–5. doi: 10.1182/blood-2007-08-109231.
16. Federici B, Mannucci M, Castaman G, Federici AB. Treatment of von Willebrand disease. *Haematologica* 2013; 98(5): 667–74.
17. Seidizadeh O, Peyvandi F, Mannucci M. Von Willebrand disease type 2N: An update. *J Thromb Haemost* 2021; 19(4): 909–16. doi: 10.1111/jth.15247.
18. Lillicrap D. von Willebrand disease: advances in pathogenic understanding, diagnosis, and therapy. *Blood* 2013; 122(23): 3735–40. doi: 10.1182/blood-2013-06-498303.
19. Michiels J, Smejkal P, Penka M, Batorova A, Pricangova T, Budde U, et al. Diagnostic Differentiation of von Willebrand Disease Types 1 and 2 by von Willebrand Factor Multimer Analysis and DDAVP Challenge Test. *Clin Appl Thromb Hemost* 2017; 23: 518–31. doi: 10.1177/1076029616647157.
20. Nichols L, Hultin B, James H, Manco-Johnson J, Montgomery R, Ortel L, et al. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 2008; 14: 171–32. doi: 10.1111/j.1365-2516.2007.01643.x.
21. Hydragel 5/11 von Willebrand multimers IVD Instructions. 2018.
22. Skornova I, Simurda T, Stasko J, Zolkova J, Sokol J, Holly P, et al. Multimer Analysis of Von Willebrand Factor in Von Willebrand Disease with a Hydrasys Semi-Automatic Analyzer-Single-Center Experience. *Diagnostics (Basel)* 2021; 11(11): 2153. doi: 10.3390/diagnostics11112153.
23. Franchini M, Mannucci PM. Acquired von Willebrand syndrome: focused for hematologists. *Haematologica* 2020; 105(8): 2032–7. doi: 10.3324/haematol.2020.255117.