

Klasyfikacja i diagnostyka choroby von Willebranda

Classification and diagnosis of von Willebrand disease

Ksenia Bykowska

Pracownia Choroby von Willebranda, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych,
Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Streszczenie

Choroba von Willebranda (vWD) jest najczęściej występującą skazą krwotoczną. Jest ona spowodowana ilościowym lub/i jakościowym defektem glikoproteiny osocza — czynnika von Willebranda (vWF). Kliniczna i molekularna heterogenność vWD, a także fizjologiczna zmienność vWF sprawiają, że diagnostyka choroby jest trudna i wieloetapowa, a interpretacja wyników, szczególnie w typie 1, często problematyczna.

Słowa kluczowe: choroba von Willebranda, klasyfikacja, parametry diagnostyczne, badania laboratoryjne

Hematologia 2013; 4, 1: 24–34

Abstract

Von Willebrand disease (vWD) is the most common inherited bleeding disorder which results from quantitative or qualitative defect of plasma glycoprotein, von Willebrand factor (vWF). The diagnosis is difficult and multistep because of its clinical and molecular heterogeneity. The interpretation of laboratory results, especially in type 1 vWD, may be challenging due to pathophysiological variability of vWF.

Key words: von Willebrand disease, classification, diagnostics parameters, laboratory investigations

Hematologia 2013; 4, 1: 24–34

Wprowadzenie

Choroba von Willebranda (vWD, *von Willebrand disease*) jest wrodzoną, osoczną skazą krwotoczną, dziedziczną autosomalnie. Występuje u 0,5–1% populacji polskiej, czyli 1,5–2 razy częściej niż hemofilia [1]. Charakteryzuje się ogromną heterogennością kliniczną i molekularną. U członków tej samej rodziny z tym samym defektem genetycznym obraz kliniczny choroby może się znacznie różnić. Pierwszy etap rozpoznawania vWD to dokładna analiza kliniczna. Diagnostyka laboratoryjna vWD jest wieloetapowa. Składają się na nią badania ogólnego

układu hemostazy, badania określające typ vWD i badania określające podtyp, wykonywane w nielicznych wysokospecjalistycznych laboratoriach.

Pierwsza publikacja na temat vWD ukazała się w 1926 roku. Jej autorem był fiński lekarz Eric von Willebrand [2]. Opisał on liczącą 52 osoby rodzinę rybaków z wysp Alandzkich, w której zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn występowały krwawienia skórno-słuzówkowe, a 4 dzieci zmarło z powodu krwawień w pierwszych latach życia. Początkowo nazwano tę chorobę pseudohemofilią, trombocytopenią Willebranda-Jürgensa, a następnie chorobą von Willebranda [3].

Adres do korespondencji: Ksenia Bykowska, Pracownia Choroby von Willebranda, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel.: 22 349 61 60, e-mail: kbykowska@ihit.waw.pl

Eric von Willebrand zmarł w roku 1949, w wieku 79 lat. Jego badania kontynuowała grupa szwedzkich uczonych z *Karolinska Institute* w Sztokholmie: Inga Marie Nilsson, Margareta Blombäck, Irene von Francken i inni [3]. W 1956 roku opracowali oni pierwszy preparat do leczenia chorych na vWD. Była to frakcja I-0, nazywana też AHG (globuliną antyhemofilową) lub AHF KABI. W 1959 roku badacze ci wykazali, że przyczyną przedłużonego czasu krwawienia u pacjentów z vWD jest niedobór białka występującego w osoczu osób zdrowych i chorych na hemofilię A. Białko to nazwano czynnikiem von Willebranda (vWF, *von Willebrand factor*).

Struktura molekularna vWF

W 1992 roku opisano strukturę genu i pseudogenu *vWF* [4, 5]. Gen *vWF* jest zlokalizowany na chromosomie 12. Ma wielkość 178 kb (*kilo base pairs*); składa się z 52 eksonów i 51 intronów. Na chromosomie 22 występuje pseudogen odpowiadający eksonom 23–34 genu *vWF*. Obecność pseudogenu znacznie utrudnia analizę defektów vWD. Mutacje genu *vWF* (delecje, insercje, mutacje w miejscu składania, mutacje typu *nonsense*, *missense*), które mogą występować w każdym z 52 eksonów i powodujące zmiany struktury białkowej, są odpowiedzialne za wystąpienie skazy krwotocznej.

Syntetyzowany w komórkach śródbłonna i megakariocytach vWF jest częściowo uwalniany do osocza, a częściowo magazynowany w ziarnistościach płytek krwi i ciałkach Weibel-Palade komórek śródbłonna. W osoczu vWF występuje w postaci multimerów zbudowanych z 1–40 dimerów (2 monomery o masie 250 kDa). Fizjologicznym regulatorem wielkości multimerów vWF w osoczu jest metaloproteaza ADAMTS13 (*A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin repeats*) [6]. Wielkość i struktura obecnych w osoczu multimerów są ważnymi czynnikami diagnostycznymi.

W obrębie monomeru wyróżnia się różne domeny (A, B, C, D), których struktura jest odpowiedzialna za funkcje biologiczne vWF: domena A1 — za wiązanie z kolagenem i glikoproteiną (GP) Ib płytek krwi (adhezja), domena A3 — za wiązanie z kolagenem, domena C1 — za wiązanie z GP IIb/IIIa płytek krwi (agregacja), a domena D3 — z czynnikiem VIII:C [7].

Rola vWF w procesie w hemostazy

W procesie hemostazy vWF bierze udział zarówno w pierwotnej (płytkowej), jak i wtórnej (krzepnięcie) hemostazie [7]. W hemostazie pier-

wotnej jest on odpowiedzialny za adhezję i agregację płytek krwi. W miejscu uszkodzenia naczynia vWF wiąże się poprzez domenę A1 z GP Ib płytek i tworzy mostki między receptorem płytkowym GP Ib α i podśródbłonkowym kolagenem, a także uczestniczy w agregacji płytek krwi, tworząc połączenia między GP IIb–IIIa sąsiadujących płytek i sekwencją RGD (Arg-Gly-Asp) znajdującą się w domenie C1 vWF. Za adhezję i agregację płytek krwi odpowiadają największe multimetry vWF. W hemostazie wtórnej vWF pełni funkcje stabilizatora (chroni przed proteolizą) i nośnika dla czynnika VIII. Czynniki VIII i vWF tworzą we krwi słaby, niekowalencyjny kompleks. Ilość monomerów czynnika VIII połączonych z vWF wynosi zaledwie 1–2% [8]. Rozpad kompleksu i aktywacja czynnika VIII zachodzą w momencie uszkodzenia ściany naczyniowej i powstania śladowych ilości trombiny. W obecności vWF czas półtrwania czynnika VIII we krwi wynosi 8–12 godzin, zaś przy braku vWF poniżej 3 godzin.

Klasyfikacja vWD

Do 1994 roku rozróżniano ponad 20 wariantów vWD. W roku 1994 Sadler [9] zaproponował nową klasyfikację vWD, którą następnie przyjął Międzynarodowy Komitet do Spraw Zakrzepów i Hemostazy (ISCTH, *International Society on Thrombosis and Haemostasis*) i po zmodyfikowaniu w 2006 roku [10] obowiązuje do dziś (tab. 1).

Tabela 1. Klasyfikacja choroby von Willebranda (vWD) (źródło [9, 10])

Table 1. Classification of von Willebrand disease (vWD) (source [9, 10])

| Typ vWD | Charakterystyka |
|---------|--|
| 1 | Częściowy ilościowy niedobór vWF |
| 2 | Defekt jakościowy cząsteczki vWF |
| 2A | Defekt jakościowy vWF; upośledzona adhezja płytek krwi zależna od vWF, selektywny niedobór wysokocząsteczkowych multimerów vWF |
| 2B | Zwiększone powinowactwo vWF do glikoproteiny Ib |
| 2M | Obniżona adhezja płytek krwi zależna od vWF, bez selektywnego niedoboru wysokocząsteczkowych multimerów vWF |
| 2N | Znacznie obniżona zdolność wiązania czynnika VIII |
| 3 | Całkowity brak vWF |

vWF (*von Willebrand factor*) — czynnik von Willebranda

Tabela 2. Zmiany w klasyfikacji choroby von Willebranda (vWD) wprowadzone w 2006 roku (źródło [9, 10])

Table 2. Modification of von Willebrand disease (vWD) classification introduced in 2006 (source [9, 10])

| Klasyfikacja vWD 1994 [9] | Klasyfikacja vWD 2006 [10] |
|--|--|
| vWD jest spowodowana mutacjami w <i>locus vWF</i> | vWD nie ogranicza się do mutacji w genie <i>vWF</i> |
| vWD typ 1 obejmuje częściowy, ilościowy niedobór vWF Rozkład multimetrów i struktura osoczowego vWF są prawidłowe | vWD typu 1 obejmuje częściowy niedobór vWF Osoczowy vWF może zawierać zmutowane podjednostki o prawidłowej aktywności proporcjonalnie do stężenia antygeny; proporcja wielkich multimetrów nie jest znacząco obniżona |

vWF (*von Willebrand factor*) — czynnik von Willebranda

Wprowadzona w 2006 roku modyfikacja polegała głównie na rozszerzeniu definicji typu 1 (tab. 2).

Diagnostyka vWD

Diagnostyka vWD składa się z dwóch etapów: klinicznego i laboratoryjnego.

Diagnostyka kliniczna

Etap kliniczny diagnostyki vWD obejmuje wywiad chorobowy, rodzinny i badanie przedmiotowe. Objawy skazy krwotocznej są zróżnicowane w zależności od typu vWD i defektu molekularnego [11]. Charakterystycznymi objawami vWD są: krwawienia skórno-słuzówkowe, nawracające krwotoki z nosa, krwawienia z dziąseł, przedłużone krwawienia po ekstrakcjach zębów i zabiegach chirurgicznych, krwawienia z przewodu pokarmowego, a w ciężkiej postaci, podobnie jak w hemofilii, krwawienia do mięśni i stawów. Interpretacja obrazu klinicznego jest trudna, ponieważ łagodne objawy skazy krwotocznej, podobnie jak wywiad chorobowy, mogą wyglądać podobnie, także u osób zdrowych [12]. U bezobjawowych nosicieli mutacji genu *vWF* skaza krwotoczna może się ujawniać dopiero po przypadkowych zranieniach lub zabiegach chirurgicznych. U kobiet jedynym przejawem choroby mogą być obfite i przedłużone krwawienia miesięczne. Jeżeli krwawienia pojawiają się wielokrotnie w tym samym miejscu, należy przede wszystkim wykluczyć miejscową przyczynę krwawień, a dopiero potem przystąpić do dalszych etapów postępowania diagnostycznego. U osób z tej samej rodziny, z tym samym defektem genetycznym, nasilenie skazy krwotocznej może być różne. W vWD typu 3 i części przypadków typu 2 skaza krwotoczna pojawia się od wczesnego dzieciństwa. To zjawisko, mimo braku wywiadu krwotocznego u innych członków rodziny, może sugerować nową mutację *vWF*. Interpretację danych klinicznych ułatwiają tak zwane standaryzowane metody oceny skazy krwotocznej (BAT, *bleeding assessment tool*).

Każdy BAT składa się z ujednoliconego kwestionariusza i punktowej skali oceny, w której objawy skazy krwotocznej są wartościowane przez tak zwany współczynnik krwotoczny (*bleeding score*). Takimi skalami posłużono się w badaniach *International Multicenter Study* (skala IMC) i w *European MCMDM-1vWD* [12–14]. W Klinice Hemostazy i Chorób Wewnętrznych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (IHT) jest on stosowany od 2010 roku.

Diagnostyka laboratoryjna

Przystępując do badań laboratoryjnych należy pamiętać o dużej heterogenności vWD i zmienności stężeń vWF w osoczu zależnie od czynników patofizjologicznych i genetycznych [15–18]. Stężenie vWF zmienia się w przebiegu ciąży, zależy od wieku i wzrasta: w przebiegu stanów zapalnych, chorób nowotworowych, cukrzycy, nadczynności tarczycy, po wysiłku fizycznym, doustnych lekach antykoncepcyjnych. W 30% przypadków stężenie vWF zależy od grupy krwi. U osób z grupą krwi 0 średnie stężenie vWF jest o 25–30% niższe niż u osób z grupą krwi A, B czy AB [19]. Ponieważ dolna granica normy dla osób z grupą krwi 0 (35%) odpowiada łagodnej postaci vWD, trudno niekiedy zdecydować na podstawie badań laboratoryjnych, czy jest to osoba chora czy zdrowa. Stężenie vWF wzrasta po 40. roku życia, dlatego przebieg vWD u osób starszych jest łagodniejszy. Przejściowe wzrosty stężenia vWF (np. po wysiłku fizycznym czy stresie) u osób vWD typu 1 utrudniają rozpoznanie choroby i dlatego zaleca się 2–3-krotne powtórzenie badania w różnych odstępach czasu po 15–30-minutowym odpoczynku [17, 20]. Diagnostyka laboratoryjna vWD jest wieloetapowa. Składa się ona z: 1) badań przesiewowych; 2) badań określających typ vWD; 3) badań wysokospecjalistycznych określających podtyp i potwierdzających rozpoznanie vWD, wykonywanych w laboratoriach referencyjnych (tab. 3).

Tabela 3. Diagnostyka choroby von Willebranda (vWD)**Table 3.** Diagnosis of von Willebrand disease (vWD)

| Etap | Postępowanie diagnostyczne |
|------------------------|---|
| Etap kliniczny | Wywiad chorobowy Wywiad rodzinny Badanie przedmiotowe |
| Etap laboratoryjny (1) | Badania ogólne układu hemostazy: morfologia/liczba płytek krwi APTT PT fibrynogen/PT czas krwawienia czas okluzji w PFA-100 |
| Etap laboratoryjny (2) | Badanie typu vWD: FVIII:C vWF:RCo vWF:Ag vWF:CB FVIII:C/vWF:Ag vWF:RCo/vWF:Ag vWF:CB/vWF:Ag |
| Etap laboratoryjny (3) | Badanie podtypu vWD: analiza multimetrów vWF L-RIPA FVIII:B |
| Etap laboratoryjny (4) | Badania dodatkowe niewykonywane rutynowo: test z DDAVP vWFpp |

APTT (activated partial thromboplastin time) — czas częściowej tromboplastyny po aktywacji; PT (prothrombin time) — czas protrombinowy; TT (thrombin time) — czas trombinowy; FVIII:C (factor VIII coagulant) — aktywność czynnika VIII; vWF:RCo (ristocetin cofactor) — kofaktor rystocetyny; vWF:Ag (VWF antigen) — antygen vWF; vWF:CB (collagen binding) — wiązanie kolagenu; L-RIPA (low-ristocetin induced platelet agglutination) — aglutynacja z rystocetyną 0,6 mg/ml; FVIII:B (factor VIII binding) — wiązanie czynnika VIII; DDAVP (deamino-D-arginine-vasopressin) — desmopresyna; vWFpp — propeptyd vWF

Badania przesiewowe

Badania przesiewowe układu hemostazy obejmują oznaczenie liczby płytek krwi oraz takie testy, jak: czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT, *activated partial thromboplastin time*), czas protrombinowy (PT, *prothrombin time*), czas trombinowy (TT, *thrombin time*) i stężenie fibrynogenu, wykonywane w analizatorach hematologicznych, pomiar czasu okluzji (CT, *closure time*), CT/ADP (adenozynodifosforan) i CT/EPI (epinefryna), wykonywane z użyciem aparatu do badania funkcji płytek (PFA-100 [*platelet function*

analyzer, Dade Behring], oraz czas krwawienia. Badania te są pomocne w diagnostyce różnicowej skaz krwotocznych, ale ani same nie wykluczają, ani nie potwierdzają vWD [21].

Oznaczenie liczby płytek krwi pozwala wykluczyć małopłytkowość niezwiązaną z vWD. W vWD liczba płytek jest prawidłowa, z wyjątkiem typu 2B. W typie tym występuje łagodna małopłytkowość; we krwi pacjentów stwierdza się obecność płytek olbrzymich. Czas protrombinowy nie zależy od stężeń FVIII:C i vWF. Jest on wydłużony we wrodzonych i nabytych niedoborach/defektach czynników zewnątrzpochodnego układu krzepnięcia krwi. Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji jest przedłużony u osób z wrodzonym i nabytym niedoborem czynników układu wewnątrzpochodnego krzepnięcia krwi (nawet przy niewielkim obniżeniu stężenia czynnika XII), w vWD typu 3, u części chorych z vWD typu 1 i 2. Prawidłowy APTT nie wyklucza vWD. W vWD typu 1 i 2 APTT często jest prawidłowy. Oznaczenie stężenia fibrynogenu i TT wyklucza niedobory fibrynogenu jako możliwą przyczynę wydłużenia testów APTT i PT. Badanie czasu krwawienia ma małą wartość diagnostyczną i nie jest obecnie wykonywane. Jest on przedłużony w vWD typu 3, u części chorych z vWD typu 2 i u 50% chorych z vWD typu 1, u osób z małopłytkowością, a także u osób z zaburzeniami funkcji płytek i ściany naczyniowej.

Najczulszym badaniem przesiewowym w kierunku vWD jest pomiar czasu okluzji naczyń w aparacie do badania funkcji płytek PFA-100 [20, 22]. Zasadą testu jest oznaczenie adhezji i agregacji płytek krwi w warunkach imitujących przepływ krwi *in vivo* w naczyniach o wysokiej sile ścinania (*high shear stress*). Badanie wykonuje się w kasie pomiarowej (*cartridge*) zbudowanej z kapilary i przegradzającej ją membrany z centralnie położonym otworem. Membrana jest pokryta kolagenem (fibrilarnym, typ I ze ścięgien końskich) i agonistą agregacji płytek krwi: ADP lub EPI. Włana do kasety pełna krew jest zasysana przez kapilarę i otwór w membranie z szybkością odpowiadającą przepływowi krwi w naczyniach o wysokiej sile ścinania. Aparat rejestruje czas okluzji, czyli czas od początku pomiaru do zamknięcia światła naczyń przez powstający w wyniku adhezji i agregacji płytek krwi czop płytkowy. Czas okluzji jest przedłużony u 85–90% chorych na vWD, ale może być przedłużony także u osób z trombocytopenią, trombocytopenią, przyjmujących leki przeciwplateletowe czy w przypadku obecności przeciwciał anti-vWF lub inhibitorów funkcji płytek krwi. Jest natomiast prawidłowy w vWD typu 2N.

Określenie typu vWD

Jeżeli badania kliniczne sugerują vWD, a wynik badań przesiewowych nie jest rozstrzygający lub jest negatywny, to mimo to należy oznaczyć stężenie i aktywność biologiczną vWF. Aktywność biologiczną vWF charakteryzują trzy parametry: wiązanie vWF z receptorem płytkowym GP Iba (vWF:RCo [kofaktor ristocetyny; *ristocetin cofactor*]), wiązanie z kolagenem (vWF:CB, [*collagen binding*]) i aktywność koagulacyjna czynnika VIII (FVIII:C, *factor VIII coagulant*). Określenie stosunku aktywności vWF (vWF:RCo i vWF:CB) do antygenu vWF (vWF:Ag) i FVIII:C do vWF:Ag umożliwia wstępne różnicowanie typów vWD. Testy vWF:RCo i FVIII:C są wykonywane rutynowo, natomiast test vWF:CB stosuje się w nielicznych laboratoriach jako test uzupełniający.

Oznaczenie vWF:RCo służy do oceny płytkowej hemostazy zależnej od vWF. Badanie to wprowadzono do diagnostyki w latach 70. XX wieku i jest uważane za „złoty standard”, najlepszą metodę oceny aktywności biologicznej vWF. Można je wykonywać metodą immunoenzymatyczną ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay test*) lub immunoturbidymetryczną w automatach koagulologicznych (np. BC von Willebrand, Dade Behring). Zasada vWF:RCo wykonywanej metodą turbidymetryczną jest pomiar aglutynacji świeżych lub formaldehydowanych, liofilizowanych płytek krwi w obecności antybiotyku, ristocetyny. Ristocetyna jest glikopeptydem o niskim ciężarze cząsteczkowym, izolowanym z bakterii *Nocardia lurida*. Dimery ristocetyny, wiążąc się zarówno z GP Ib, jak i vWF (Glu1239-Pro-Gly-Gly1242), mogą aglutynować i agregować płytki krwi [23]. Wynik badania zależy od obecności wielkocząsteczkowych multimetrów vWF i prawidłowej struktury monomerów vWF oraz receptora płytkowego GP Iba. Wadą testu jest mała czułość (dolny próg detekcji wynosi zwykle 5%) i brak precyzji w zakresie stężeń antygenu do 20–30 j./dl, co może być przyczyną błędnych rozpoznań vWD. Aby zwiększyć czułość i precyzję oznaczeń vWF-GP Ib, do testu vWF:RCo wprowadzono wiele modyfikacji polegających na zastosowaniu wyższego stężenia ristocetyny i dwóch krzywych kalibracyjnych — dla niskich i wysokich stężeń vWF.

W ostatnich latach opracowano testy nowej generacji wykonywane w automatach koagulologicznych, łączące metodę vWF:RCo i ELISA [24]. Metody te charakteryzują się znacznie większą czułością i precyzją oraz niższym progiem detekcji niż klasyczny vWF:RCo. W 2007 roku Pinol M. i wsp. [25] opisali test immunoturbidymetryczny

(HemosIL™ vWF activity), w którym zastosowano cząsteczki lateksowe opłaszczone przeciwciałami monoklonalnymi, skierowanymi do miejsca wiążącego GP Ib w cząsteczce vWF (domena A1). W roku 2012 Lawrie i wsp. [26] przedstawili nowy handlowy zestaw (Innovance vWF Ac, Siemens) do oceny aktywności wiązania vWF z GP Ib. W teście tym do zawiesiny cząstek polistyrenowych, opłaszczonych przeciwciałami przeciw GP Ib, dodaje się rekombinowany GP Ib (z dwiema mutacjami niedotyczącymi funkcji), który wiąże się z przeciwciałami i vWF osocza badanego i powoduje aglutynację. Oba te testy nie wymagają obecności ristocetyny i są czulsze niż wcześniej stosowany test vWF:RCo.

Badanie wiązania kolagenu (vWF:CB) wykonuje się immunoenzymatyczną metodą ELISA [27–29]. Metodę tę opracowali Brown i Bosak w 1986 roku [27]. Badanie wykonuje się na płytkach opłaszczonych kolagenem. Ilość związanego z mikropłytką vWF oznacza się metodą chromogenną. Wynik i czułość badania zależą od obecności wielkocząsteczkowych multimetrów i/lub prawidłowej struktury domeny vWF wiążącej kolagen oraz typu opłaszczającego mikropłytkę kolagenu. Początkowo stosowano mieszaninę typów I i III, obecnie wykorzystuje się raczej kolagen typu III [29]. Test vWF:CB jest czulszy niż vWF:RCo i pozwala na ocenę wiązania w zakresie 0,01–1,7 j./ml. Wyniki aktywności vWF:CB i vWF:RCo są porównywalne u chorych z vWF typu 1, 2A, 2B, 2N i 3 (badania własne), mogą być natomiast rozbieżne w vWF typu 2M. Testy vWF:CB i vWF:RCo nie mogą być stosowane zamiennie, ponieważ charakteryzują różne właściwości biologiczne vWF. Test vWF:CB nie wykrywa defektów spowodowanych mutacją w domenie vWF wiążącej płytkowy receptor GP Ib, natomiast wynik testu vWF:RCo jest prawidłowy u chorych z mutacją w regionie wiązania kolagenu. Ponadto, badanie vWF:CB wykonywane metodą ELISA jest bardziej czaso- i pracochłonne niż vWF:RCo i tylko w niewielu wyskospecjalistycznych laboratoriach jest włączone do panelu badań rutynowych. W 2012 roku opisano nową metodę oznaczania vWF:CB w cytometrze przepływowym z zastosowaniem 20 µm polistyrenowych cząstek opłaszczonych kolagenem [30].

Stężenie antygen u vWF (vWF:Ag) jest ważnym parametrem diagnostycznym [18, 21]. Badanie to można wykonywać wieloma metodami: elektroimmunoddyfuzji, immunoradiometryczną, immunolateksową, immunoturbidymetryczną czy immunoenzymatyczną ELISA. W ostatnich latach wprowadzono nowe, całkowicie zautomatyzowane metody oznaczania vWF:Ag o swoistości porów-

nywalnej ze swoistością testów ELISA. Od wielu lat „złotym standardem” w badaniach rutynowych jest dwustopniowy immunofluorescencyjny test VIDAS vWF, wykonywany z użyciem aparatu tej samej firmy. Obecnie dostępne są także handlowe zestawy do oznaczania vWF:Ag w analizatorach koagulologicznych metodą immunoturbimetryczną. Zasadą tych testów jest pomiar zmętnienia osocza wskutek aglutynacji cząsteczek polistyrenu opłaszczonych przeciwciałami anti-vWF pod wpływem vWF osocza badanego. Stopień zmętnienia jest proporcjonalny do stężenia vWF:Ag w badanej próbce osocza. Stężenie vWF:Ag można oznaczać także w cytometrze przepływowym [30].

Aktywność czynnika VIII (FVIII:C) oznacza się jednostopniową, koagulacyjną lub chromogenną zmodyfikowaną metodą APTT. Niska aktywność FVIII:C przy prawidłowych lub nieznacznie obniżonych vWF:RCo i vWF:Ag może sugerować typ 2N. Prawidłowe stężenie VIII:C nie wyklucza vWD.

Wylczenie ilorazów vWF:RCo/vWF:Ag oraz VIII:C/vWF:Ag i vWF:CB/vWF:Ag pozwala na wstępną klasyfikację typu vWD. Współczynnik vWF:RCo/vWF:Ag o wartości powyżej 0,6–0,7 jest charakterystyczny dla vWD typu 1, vWD typu 2N i vWF osocza prawidłowego, zaś współczynnik o wartości poniżej 0,6–0,7 — dla typów 2A, 2B, 2M. Współczynnik VIII:C/vWF:Ag o wartości poniżej 0,7 jest charakterystyczny dla vWD typu 2N.

Określenie podtypu vWD

Określenie podtypu vWD wymaga wysoko-specjalistycznych badań wykonywanych w laboratoriach referencyjnych.

Celem badania jest różnicowanie typów i podtypów vWD na podstawie obecności w osoczu trzech frakcji multimerów: wysokocząsteczkowej (HMW, *high molecular weight*), średnicząsteczkowej (IMW, *intermediate molecular weight*) i drobnocząsteczkowej (LMW, *low molecular weight*).

Badanie wykonuje się metodą elektroforezy w nieredukującym żelu agarozowym w obecności siarczanu sodowego dodecyłu (SDS, *sodium dodecyl sulphate*) i immunoblotingu [31]. Obecnie obraz multimerów uzyskuje się najczęściej metodą chemiluminescencji i analizuje densytometrycznie. W elektroforezie stosuje się dwa rodzaje żeli agarozowych — o niskiej (LRG, *low resolution gel*) oraz o wysokiej rozdzielczości (HRG, *high resolution gel*). Żele LRG (0,7–1,2%) pozwalają uzyskać obraz pojedynczych multimerów, ale bez linii satelitarnych. Stosuje się je głównie do analizy obecności multimerów HMW (różnicowanie typów 1 i 2 vWD). Zróżnicowanie typu 2 (2A, 2B, 2M, 2N), a w szczególności wariantów typu 2A (IIA, IIC, IID, IIE) wymaga powtórzenia analizy z zastosowaniem żelu HRG (1,4–2%). Żele HRG umożliwiają charakterystykę najmniejszych multimerów i tak zwanej struktury tripletów (linia główna i dwie linie satelitarne) pojawiających się w wyniku proteolizy vWF przez ADAMTS13. Obraz multimerów i struktura tripletów są ważnymi parametrami diagnostycznymi w różnicowaniu typów 1 i 2M, a także wariantów typu 2A. Interpretacje analizy multimerów u chorych na vWD przedstawiono w tabeli 4.

Badanie wiązania vWF z czynnikiem VIII (vWF:FVIII:B) służy do rozpoznania vWD typu 2N [32] i różnicowania vWD 2N z hemofilią A. Wykonuje się je wtedy, gdy iloraz VIII:C/vWF:Ag jest niższy niż 0,6–0,7. Diagnostyka *Stago* opracowała pierwszy handlowy, immunochromogenny test ELISA do oznaczania wiązania vWF:FVIII:B (Asserachrom vWF:FVIII:B). Zasada testu jest następująca: 1) do mikroplątki opłaszczonej monoklonalnymi przeciwciałami anti-vWF wykonuje się wiązanie kompleksu vWF/VIII:C (o znanym stężeniu vWF) z osocza pacjenta, 2) ze związanego z mikroplątką kompleksu oddysocjowuje się czynnik VIII (w wysokim stężeniu chlorku wapnia), 3) po odmyciu

Tabela 4. Charakterystyka typów choroby von Willebranda (vWD) metodą analizy multimerów

Table 4. Characteristics of von Willebrand disease (vWD) types and subtypes using multimer analysis

| Typ vWD | Struktura multimerów vWF |
|---------|--|
| 1 | Prawidłowa struktura multimerów |
| 2A | Brak multimerów HMW i IMW vWF; w wariantach często nieprawidłowa struktura tripletów |
| 2B | Brak HMW vWF; multimery prawidłowe w wariantach I <i>Malmö</i> i <i>New York</i> i <i>Hiroshima</i> [26, 27]; często nieprawidłowa struktura tripletów |
| 2M | Obecność wszystkich multimerów, w niektórych przypadkach obecność UL-HMW vWF |
| 2N | Prawidłowa dystrybucja multimerów vWF |
| 3 | Brak widocznych multimerów; w części przypadków obecność dimerów |

vWF (von Willebrand factor) — czynnik von Willebranda; HMW (*high molecular weight*) — wysokocząsteczkowe; IMW (*intermediate molecular weight*) — średnicząsteczkowe; UL-HMW (*ultra-large high molecular weight*) — ultrawielkie cząsteczki

czynnika VIII przeprowadza się reakcję między związanym na mikro płytce vWF pacjenta i egzogenym, rekombinowanym czynnikiem VIII, 4) ilość związanego czynnika VIII oznacza się metodą chromogenną, 5) wyniki wiązania wyraża się w odsetku osocza prawidłowego. Wiązanie vWF–VIII w osoczu prawidłowym wynosi powyżej 80% normy; wiązanie poniżej 15% wskazuje na homozygotyczny lub heterozygotyczny typ 2N. U chorych z izolowanym niedoborem czynnika VIII i prawidłowym lub nieznacznie obniżonym wiązaniem vWF–FVIII:B (30–65%), w celu wyjaśnienia podłoża defektu, konieczne jest wykonanie analizy genu czynnika VIII.

Badanie RIPA (*ristocetin-induced platelet agglutination*) i L-RIPA (*low-ristocetin-induced platelet agglutination*) wykonuje się w agregometrze i polega ono na ocenie agregacji płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym (PRP, *platelet rich plasma*) pod wpływem dodanej rystocetyny (1,25–1,5 mg/ml). Wysokość krzywych agregacji, wyrażona w odsetku normy, zależy od stężenia i powinowactwa płytkowego receptora GP Ib i vWF. Prawidłowa lub upośledzona RIPA występuje w vWD typu 1 i 2, a całkowity brak agregacji — w vWD typu 3. Stężenia rystocetyny 0,6 mg/ml (L-RIPA) powodują zwiększoną agregację płytek chorych z vWD typu 2B (zwiększone powinowactwo vWF do płytek) i chorobę pseudo von Willebranda (zwiększone powinowactwo płytek do vWF), natomiast nie wywołują agregacji prawidłowych płytek kontrolnych.

Badania dodatkowe

Test z desmopresyną. Desmopresyna (DDAVP, *1-deamino-8-D-arginine vasopressin*) jest syntetycznym analogiem wazopresyny stosowanym w leczeniu vWD. Podana dożylnie w dawce 0,3 µg/kg mc. stymuluje uwalnianie vWF i FVIII:C z komórek śródbłonna. Stosuje się ją w łagodnej hemofilii, vWD i trombocytopeniach [33]. Poza tym, że ma znaczenie kliniczne, jest również ważnym badaniem diagnostycznym [34–37]. Na podstawie wzrostu stężeń FVIII:C, vWF:RCo, vWF:Ag i vWF:CB po podaniu DDAVP można różnicować typ 1 z 2 oraz typ 1 ciężki (vWF:RCo < 15%) z typem 3 i potwierdzać rozpoznanie pozostałych typów vWD [33, 34]. U osoby zdrowej obserwuje się 2–4-krotny wzrost wszystkich trzech parametrów: FVIII:C, vWF:RCo i vWF:Ag. Podobnie jest w typie 1 łagodnym. U chorych z recesywnym ciężkim typem 1 obserwuje się niewielkie wzrosty vWF:Ag i vWF:RCo lub ich brak oraz zwykle prawidłowy wzrost VIII:C. W typie 2A obserwuje się prawidłowy wzrost VIII:C i słabsze zwiększenie aktywności vWF:RCo. U chorych z typem 2N po podaniu DDAVP następuje pra-

widłowy wzrost vWF i vWF:RCo oraz słabszy i krótkotrwały VIII:C. W typie 2M stwierdza się prawidłowy wzrost vWF:Ag, vWF:CB i FVIII:C oraz słaby wzrost vWF:RCo. Chorzy z typem 3 nie reagują na podanie DDAVP. U rodziców chorych z recesywnym typem 3 i typem 1 ciężkim wzrost aktywności FVIII:C jest 2–3 razy wyższy niż vWF:Ag. W typie 2B podawanie DDAVP jest przeciwwskazane, ponieważ powoduje ona przejściową trombocytopenię.

Oznaczenie stężenia propeptydu vWF (vWFpp) w osoczu służy do oceny stopnia biosyntezy vWF, w której vWFpp jest odpowiedzialny za proces multimeryzacji. Propeptyd vWF jest uwalniany z komórek śródbłonna do krwi równolegle z dojrzalą cząsteczką vWF. Ma on ciężar cząsteczkowy 97 kDa (741 aminokwasów), a jego okres półtrwania we krwi wynosi 2 godziny. Stężenie vWFpp w osoczu nie zależy od grupy krwi [38, 39]. W typie 1 stężenie vWFpp jest prawidłowe lub obniżone, w typie 2B — zazwyczaj prawidłowe, zaś w typie 2A z mutacją blokującą wewnątrzkomórkowy transport i typie 3 — znamienne obniżone. Badanie vWFpp wykonuje się metodą ELISA przy użyciu przeciwciał monoklonalnych [38, 39]. Stężenie vWFpp jest wyrażane w jednostkach; jedna jednostka vWFpp znajduje się w jednym ml prawidłowego osocza.

Badania genetyczne

Badania genetyczne nie są wykonywane rutynowo. Analizę molekularną utrudniają wielkość genu oraz obecność pseudogenu.

Charakterystyka laboratoryjna

Typ 1 stanowi około 75% objawowych przypadków vWD. Jest on spowodowany mutacjami występującymi na całej długości genu. Są to mutacje typu *missens* (60%), mutacje transkrypcji (8%), małe insercje (2%), delecje (6%) i mutacje typu *splicing* (9%). Choroba dziedziczy się głównie autosomalnie dominująco; znacznie rzadziej recesywnie. Dominująco dziedziczy się typ 1 łagodny (vWF:RCo < 50% i > 15%), natomiast recesywnie — typ 1 ciężki (vWF:RCo < 15%), spowodowany głównie mutacjami typu *missens* w domenie D1 i D2 oraz obszarze dimeryzacji. Diagnostyka typu 1 (łagodnego) jest trudna, ponieważ na wyniki badań wpływają czynniki genetyczne (grupa krwi), a także: ciąża, wiek, ćwiczenia fizyczne, doustne leki antykoncepcyjne, wysiłek fizyczny oraz choroby: infekcje, nowotwory, choroby nerek i wątroby, nadczynność i niedoczynność tarczycy. U pacjentów z typem 1 liczba płytek jest prawidłowa, zaś APTT — prawidłowy lub

wydłużony, zależnie od stężenia VIII:C. Charakteryzuje się defektem ilościowym, polegającym na częściowym równomiernym niedoborze vWF:Ag, vWF:RCo, vWF:CB i VIII:C. Współczynnik vWF:RCo/vWF:Ag oraz VIII:C/vWF:Ag jest wyższy niż 0,7 (tab. 5). Wynik testu RIPA może być prawidłowy lub obniżony, a struktura multimetrów vWF — prawidłowa. W typie 1 ciężkim, w przeciwieństwie do typu 3, antygen vWF jest oznaczalny, chociaż bardzo niski, natomiast aktywność VIII:C zwykle wynosi poniżej 30%. Heterozygotyczni nosiciele ciężkiego, recesywnego typu 1 zwykle nie mają objawów lub występuje u nich łagodna skaza krwotoczna.

Typ 2 charakteryzuje się jakościowym defektem vWF spowodowanym brakiem lub defektem multimetrów wielkocząsteczkowych. Występuje u 25% chorych na vWD. W typie 2 rozróżnia się podtypy 2A, 2B, 2M, 2N. Z wyjątkiem typu 2N u chorych obniżony jest vWF:RCo, natomiast vWF:Ag jest prawidłowy lub bliski normy. Współczynnik vWF:RCo/vWF:Ag wynosi poniżej 0,7 (tab. 5).

Typ 2A (warianty IIA, IIC, IIE, IID) dziedziczy się dominująco lub recesywnie (IIC). Defekt vWF może powstawać w wyniku dwóch alternatywnych mechanizmów. Pierwszy jest spowodowany mutacjami powodującymi defekt dimeryzacji (IID) lub multimeryzacji (IIC, IIC Miami IIE), upośledzenie wewnątrzkomórkowego transportu vWF i retencję HMW multimerów w retikulum endoplazmatycznym. Drugi jest wywołany mutacjami zwiększającymi podatność vWF na proteolizę. Większość opisanych mutacji to mutacje typu *missens* w domenie A2 (IIA); w propeptydzie (IIC), w obszarze dimeryzacji (IID); w D3 (IIE). Laboratoryjnie podtyp ten charakteryzuje się upośledzoną funkcją płytek spowodowaną brakiem lub częściowym niedoborem multimerów HMW lub HMW i IMW oraz często nieprawidłową strukturą tripletów. Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji jest prawidłowy lub wydłużony. Aktywność FVIII jest prawidłowa lub obniżona. Czas okluzji w PFA-100 jest wydłużony proporcjonalnie do upośledzenia reakcji płytki-vWF; upośledzona jest też agregacja z rystocetyną. Współczynnik vWF:RCo/vWF:Ag wynosi poniżej 0,7, a VIII:C/vWF:Ag — powyżej 0,7.

Typ 2B występuje u 5–8% chorych na vWD. Jest spowodowany mutacją w eksonie 28 kodującym domenę A1 vWF [11, 17]. Charakteryzuje się prawidłową lub łagodnie obniżoną liczbą płytek. Trombocytopenia może się pogłębiać podczas ciąży lub po podaniu DDAVP. W teście L-RIPA, vWD 2B charakteryzuje się zwiększoną agregacją płytek pod wpływem niskich stężeń rystocetyny (0,6 mg/ml),

spowodowaną zwiększonym powinowactwem vWF do receptora płytkowego GP Iba. Płytki pacjenta z typem 2B, w przeciwieństwie do płytek chorych z pseudo vWD, nie agregują spontanicznie w obecności krioprecypitatu (vWF 200 j./dl). Aktywności vWF:RCo i vWF:CB są obniżone, stężenie antygeny prawidłowe lub obniżone, a aktywność czynnika VIII — prawidłowa lub obniżona. Czas okluzji jest przedłużony, tak jak w typie 2A. Mutacje sprawcze zachodzą głównie w domenie A1 zawierającej miejsce wiązania GP Iα. Współczynnik vWF:RCo/vWF:Ag wynosi poniżej 0,7. W osoczu brakuje frakcji multimetrów HMW, zaś w płytkach wzór multimetrów jest prawidłowy [40, 41]. Prawidłowy wzór osoczowych multimetrów występuje w wariantach I *Malmö*, *New York*, *Hiroshima* i *Tampa* [42, 43]. U pacjentów z vWD typu 2B z prawidłowymi HMW multimetrami może występować łagodna lub ciężka trombocytopenia połączona z obecnością w krążeniu płytek olbrzymich i agregatów płytkowych [43].

Typ 2M dziedziczy się autosomalnie dominująco. Charakteryzuje się upośledzoną agregacją z rystocetyną spowodowaną mutacjami w miejscu wiązania vWF z GP Iba (domena A1). Najczęściej są to mutacje typu *missens* i małe delecje w eksonie 28. W przeciwieństwie do typu 2A struktura multimetrów jest prawidłowa. W części przypadków występuje niewielki niedobór lub zwiększone stężenie multimerów HMW [9]. Charakterystyczny dla typu 2M jest rozmyty obraz tripletów (plama). Typ 2M jest niekiedy mylony z typem 1.

Typ 2N dziedziczy się dominująco lub recesywnie. Mutacje sprawcze występują w domenie D'-D3 (eksony 18–28) vWF wiążącej VIII:C [5, 32]. U chorych stężenie VIII:C wynosi 5–40 j./dl⁻¹, a w przypadkach ciężkich — 1–2 j./dl⁻¹. Stężenia vWF:Ag i vWF:RCo są prawidłowe lub nieznacznie obniżone. Współczynnik VIII:C/vWF:Ag wynosi poniżej 0,7. Typ 2N jest często mylony z łagodną hemofilią. Różnicowanie vWD typu 2N z hemofilią A polega na oznaczeniu zdolności wiązania vWF pacjenta z egzogennym czynnikiem VIII (vWF:VIII B). Reakcja na DDAVP jest podobna jak w typie 1 łagodnym, przy czym wzrost aktywności VIII:C jest ograniczony z powodu skróconego okresu półtrwania tego białka w krążeniu.

Typ 3 vWD jest spowodowany całkowitym brakiem vWF w osoczu i płytkach krwi [44]. Występuje rzadko, bo w 0,1–5,3% vWD — najczęściej w krajach arabskich (5,3 osób/mln), a najrzadziej w Europie Zachodniej. Dziedziczy się autosomalnie recesywnie. Podłożem genetycznym typu 3 vWD są duże delecje, delecja całego genu, insercje, mutacje typu nonsens i przesunięcie ramki odczytu.

Tabela 5. Laboratoryjna charakterystyka typów i podtypów choroby von Willebranda

Table 5. Laboratory characteristics of different types of von Willebrand disease

| Badanie | Choroba von Willebranda | | | | | |
|--------------------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | Typ 1 | Typ 2A | Typ 2B | Typ 2N | Typ 2M | Typ 3 |
| PT | N | N | N | N/↓ | N | N |
| APTT | ↑/N | ↑/N | ↑/N | ↑/N | ↑/N | W |
| Liczba płytek | N | N | N/↓ | N | N | N |
| PFA-100 | ↑/N | ↑ | ↑ | N | ↑ | ↑↑↑ |
| FVIII:C | ↓/N | ↓/N | ↓/N | ↓↓ | N/↓ | Brak |
| vWF:Ag | ↓ | ↓/N | ↓/N | ↓/N | ↓/N | Brak |
| vWF:RCo | ↓ | ↓↓ | ↓↓ | N/↓ | ↓ | Brak |
| vWF:CB | ↓ | ↓↓ | ↓↓ | N/↓ | ↓/N | Brak |
| vWF RCo/vWF:Ag | > 0,7 | < 0,7 | < 0,7 | > 0,7 | < 0,7 | — |
| FVIII:C/vWF:Ag | > 0,7 | > 0,7 | > 0,7 | < 0,7 | > 0,7 | — |
| vWF:VIII B | N | N | N | ↓ | N | — |
| Multimery vWF | N | P* | P* | N | N/A | P** |
| L-RIPA (0,6 mg/ml) | Brak | Brak | ↑↑ | Brak | Brak | Brak |

↓/↑ — obniżony/wydłużony; N — prawidłowy; P* — brak wysokocząsteczkowych multimerów; P** — całkowity brak multimerów; A — nieprawidłowa budowa multimerów, obecność wszystkich frakcji; PT (*prothrombin time*) — czas protrombinowy; APTT (*activated partial thromboplastin time*) — czas częściowej tromboplastyny po aktywacji; PFA-100 — *platelet function analyser*; FVIII:C (*factor VIII coagulant*) — aktywność czynnika VIII; vWF (*von Willebrand factor*) — czynnik von Willebranda; vWF:Ag (*vWF antigen*) — antygen vWF; vWF:RCo (*ristocetin cofactor*) — kofaktor rystocetyny; vWF:CB (*collagen binding*) — wiązanie kolagenu; vWF:VIII:B (*factor VIII binding*) — wiązanie czynnika VIII; L-RIPA (*low-ristocetin induced platelet agglutination*) — aglutynacja z rystocetyną 0,6 mg/ml

U chorych zaburzona jest zarówno pierwotna (niedobór vWF), jak i wtórna hemostaza (niedobór VIII:C), powodując objawy charakterystyczne dla hemofilii A, takie jak wylewy do stawów i mięśni. Mimo ciężkiego niedoboru vWF u części chorych z typem 3 skaza krwotoczna jest mniej nasilona, co najprawdopodobniej jest związane ze stężeniem FVIII:C. Rodzice chorych są najczęściej ze sobą spokrewnieni. Heterogenetyczni nosiciele zazwyczaj nie mają objawów, czas krwawienia jest u nich prawidłowy, zaś stężenia FVIII i vWF są prawidłowe lub obniżone. U części chorych (7,5–9,5%) z vWD typu 3 (najczęściej u chorych z delecją całego genu), w wyniku transfuzji preparatów vWF/VIII, mogą się pojawiać alloprzeciwciała, głównie klasy IgG [45, 46]. U chorych APTT, czas krwawienia i czas okluzji są przedłużone, wartości stężeń vWF:RCo, vWF:CB i vWF:Ag — poniżej czułości metody oraz nie występuje agregacja z rystocetyną (tab. 5). W większości przypadków stężenie VIII:C wynosi do 10 j./dl. Analiza multimerów wykazuje ich całkowity brak, chociaż na froncie żelu mogą być widoczne ślady drobnocząsteczkowych peptydów.

Różnicowanie vWD z pseudo vWD i nabytą vWD

Wrodzoną vWD należy różnicować z pseudo vWD (vWD typu płytkowego) i nabytą vWD (AvWS, *acquired von Willebrand syndrome*).

Pseudo vWD jest spowodowana mutacjami w genie receptora płytkowego GP Ib powodującymi wzrost powinowactwa płytek do vWF. Obraz laboratoryjny jest identyczny, jak w vWD typu 2B. Obie choroby można różnicować albo przeprowadzając badania genetyczne vWF i GP Ib α , albo w teście spontanicznej agregacji płytek krwi. Jeżeli po dodaniu krioprecypitatu do zawiesiny płytek chorego zachodzi spontaniczna agregacja, to rozpoznaje się pseudo vWD [47], natomiast jeśli agregacja nie zachodzi, rozpoznaje się typ 2 vWD.

Nabyta vWD zazwyczaj rozwija się w przebiegu chorób o podłożu immunologicznym, mielo- i limfoproliferacyjnych, układu sercowo-naczyniowego oraz podczas przyjmowania niektórych leków, choć opisano także przypadki idiopatycznej AvWS [48]. Przyczyną AvWS mogą być: autoprzeciwciała, zwiększona proteoliza, adsorpcja vWF na komórkach. Cechą charakterystyczną AvWS jest brak wywiadu rodzinnego skazy krwotocznej i pojawienie się objawów skazy krwotocznej w późnym wieku.

Kontrola zewnątrzlaboratoryjna

Od 2003 roku do programu kontroli zewnątrzlaboratoryjnej (ECAT, *European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Foundation*) włączony jest moduł dla testów wykonywanych w vWD. W programie uczestniczy ponad 150–180 labora-

torów. Cztery razy w roku do biorących udział w programie laboratoriów są rozsyłane liofilizowane próbki osocza, w których oznacza się vWF:Ag, vWF:RCo, vWF:CB, VIII:C i multimetri vWF. Zebrane wyniki są analizowane z uwzględnieniem metody badań i użytej do nich aparatury.

Podsumowanie

Choroba vWD jest spowodowana niedoborem lub defektem vWF — osoczowej glikoproteiny biorącej udział w hemostazie pierwotnej (krzepnięcie krwi) i wtórnej (płytkowej).

Wrodzoną vWD należy podejrzewać u osób ze skłonnością do krwawień i wywiadem rodzinnym wskazującym na dziedziczenie autosomalne. Skaza krwotoczna u tych chorych pojawia się najczęściej już we wczesnym dzieciństwie. Są to krwawienia skórno-śluzówkowe, przedłużone krwawienia po ekstrakcji zębów, zranieniach czy urazach, a u kobiet — obfite i przedłużone krwawienia miesięczne. W typie ciężkim, 3, podobnie jak w hemofilii, mogą występować krwawienia do mięśni i stawów.

Trzeba pamiętać, że objawy skazy krwotocznej u chorych na vWD w tej samej rodzinie i u osób z tym samym defektem vWF mogą się znacznie różnić. Diagnostykę utrudnia zależność aktywności vWF we krwi od czynników genetycznych (np. grupa krwi), fizjologicznych (np. ciąża, ćwiczenia fizyczne) i patologicznych (stany zapalne, choroba nowotworowa, choroby nerek i wątroby), a także duża rozpiętość aktywności vWF w osoczu osób zdrowych (35–150%). Diagnostyka vWD jest głównie fenotypowa. Metody molekularne mają zastosowanie w identyfikacji chorych z typami 2A, 2B, 2M i 2N (w których mutacje występują w określonych eksonach), natomiast są mało przydatne w typie 3 (mutacje występują na całej długości genu) i typie 1 (mutacje są wykrywane głównie u chorych z vWF < 30%).

Piśmiennictwo

1. Rodeghiero F, Castaman G., Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987; 69: 454–459.
2. Von Willebrand E.A. Hereditär pseudohemophili. *Finska Lakarselskapets Handlingar* 1926; 57: 87–112.
3. Holmberg L., Nilsson I.M. Von Willebrand's disease. *Eur. J. Haematol.* 1992; 48: 127–141.
4. Mancuso D.J., Tuley E.A., Westfield L.A. i wsp. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochem.* 1991; 30: 253–269.
5. Goodeve A.C. The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Rev.* 2010; 24: 123–134.

6. Mannucci P.M., Canciani M.T., Forza I. i wsp. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2001; 98: 2730–2735.
7. Ruggeri Z.M. Structure and function of von Willebrand factor. *Thromb. Haemost.* 1999; 82: 576–584.
8. Federici A.B. The factor VIII/von Willebrand factor complex: basis and clinical issues. *Haematologica* 2003; 88: P02.
9. Sadler J.E. 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: 520–525.
10. Sadler J.E., Budde U., Eikenboom J.C. i wsp. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand factor. *J. Thromb. Haemost.* 2006; 4: 2103–2114.
11. Lillicarp D. Genotype/phenotype association in von Willebrand disease: is the glass half full or empty? *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7: 65–70.
12. Favaloro E.J., Lillicarp D., Lazzari M.A. i wsp. Von Willebrand disease: laboratory aspects of diagnosis and treatment. *Haemophilia* 2004; 10: 164–168.
13. Tosetto A., Rodeghiero F., Castaman G. i wsp. A comparison between two semi-quantitative bleeding scales for the diagnosis and assessment of bleeding severity in type 1 von Willebrand disease. *Haemophilia* 2011; 17: 155–171.
14. Tosetto A., Rodeghiero F., Castaman G. i wsp. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J. Thromb. Haemost.* 2006; 4: 766–773.
15. Favaloro E.J. Laboratory identification of von Willebrand disease: laboratory identification of von Willebrand disease: technical and scientific perspectives. *Semin. Thromb. Haemost.* 2006; 32: 456–471.
16. Budde U. Diagnosis of von Willebrand disease subtypes: implications for treatment. *Haemophilia* 2008; 14: 27–38.
17. Gadisseur A., Hermans C., Berneman Z. i wsp. Laboratory diagnosis and molecular classification of von Willebrand disease. *Acta Haematol.* 2009; 121: 71–78.
18. Laffan M., Brown S.A., Collins P.W. i wsp. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctor Organization. *Haemophilia* 2004; 10: 199–217.
19. Gill J.C., Enders-Brooks J., Bauer P.J., Marks W.J., Montgomery R.R. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand's disease. *Blood* 1987; 69: 1691–1695.
20. Weiss D.R., Strasser E.F., Ringwald J., Zimmermann R., Eckstein R. High resolution multimer analysis and PFA-100 platelet function analyser can detect von Willebrand disease type 2A without a pathological ratio of ristocetin cofactor activity and von Willebrand antigen level. *Clin. Lab.* 2012; 58: 1–7.
21. Favaloro E.J. Appropriate laboratory assessment as a critical facet in the proper diagnosis and classification of von Willebrand disorder. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2001; 14: 299–319.
22. Favaloro E.J. Laboratory monitoring therapy in von Willebrand disease: efficacy of the PFA-100 and von Willebrand factor: collagen-binding activity as coupled strategies. *Semin. Thromb. Hemost.* 2006; 32: 566–576.
23. Scott J.P., Montgomery R.R., Retzinger G.S. Dimeric ristocetin flocculates proteins, binds to platelets, and mediates von Willebrand factor-dependent agglutination of platelets. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 8149–8155.
24. Murdock P.J., Woodhams B.J., Matthews K.B., Pasi K.J., Goodall A.H. Von Willebrand factor activity detected in a monoclonal antibody-

- based ELISA: an alternative to the ristocetin cofactor platelet agglutination assay for diagnostic use. *Thromb. Haemost.* 1997; 78: 1272–1277.
25. Pinol M., Sales M., Costa M. i wsp. Evaluation of a new turbidimetric assay for von Willebrand factor activity useful in the general screening of von Willebrand disease. *Haematol.* 2007; 92: 712–713.
 26. Lawrie A.S., Stufano F., Canciani M.T. i wsp. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. *Haemophilia* 2013; 19: 338–342.
 27. Brown J.E., Bosak J.O. An ELISA test for the binding of von Willebrand antigen to collagen. *Thromb. Res.* 1986; 43: 303–311.
 28. Ni Y., Nesrallah J., Agnew M., Geske F.J., Favaloro E.J. Establishment and characterization of a new and stable collagen-binding assay for the assessment of von Willebrand factor activity. *Int. J. Lab. Hematol.* 2013; 35: 170–176.
 29. Favaloro E.J. Collagen binding assay for von Willebrand factor (VWF:CBA): detection of von Willebrand's disease (VWD), and discrimination of VWD subtypes, depends on collagen source. *Thromb. Haemost.* 2000; 83: 127–135.
 30. Mina A., Favaloro E.J., Koutts J. A novel flow cytometry single tube bead assay for quantitation of von Willebrand factor antigen and collagen-binding. *Thromb. Haemost.* 2012; 108: 999–1005.
 31. Krizek D.R., Rick M.E. A rapid method to visualize von Willebrand factor multimers by using agarose gel electrophoresis, immunolocalization and luminographic detection. *Thromb. Res.* 2000; 97: 457–462.
 32. Mazurier C., Goudemand J., Hilbert L. i wsp. Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2001; 14: 337–347.
 33. Mannucci P.M. Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders: the first twenty years. *Haemophilia* 2000; 6: 60–67.
 34. Federici A.B., Mazurier C., Berntorp E. i wsp. Biologic response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease: results of a multicenter European study. *Blood* 2004; 103: 2032–2038.
 35. Federici A.B. Von Willebrand disease. *Haematol.* 2001; 86: 10–16.
 36. Michiels J.J., van de Velde A., van Vliet H.D.M. i wsp. Response of von Willebrand factor parameters to desmopressin in patients with type 1 and type 2 congenital von Willebrand disease: diagnostic and therapeutic implications. *Semin. Thromb. Hemost.* 2002; 28: 111–131.
 37. Mazurier C., Gaucher C., Jorieux S., Goudeman M. Biological effect of desmopressin in eight patients with type 2 (Normandy) von Willebrand disease. *Br. J. Haematol.* 1994; 88: 849–854.
 38. Haberichter S.L., Balistreri M., Christopherson P. i wsp. Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival. *Blood* 2006; 108: 3344–3351.
 39. Haberichter S.L., Castaman G., Budde U. i wsp. Identification of type 1 von Willebrand disease patients with reduced von Willebrand factor survival by assay of the VWF propeptide in the European study: molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD (MCMDM-1VWD). *Blood* 2008; 111: 4979–4985.
 40. Sadler J.E., Mannucci P.M., Berntorp E. i wsp. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* 2000; 84: 160–174.
 41. Budde U., Drewke E., Mainusch K., Schneppenheim R. Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. *Semin. Thromb. Hemost.* 2002; 28: 173–189.
 42. Baronciani L., Federici A.B., Castaman G., Punzo M., Mannucci P.M. Prevalence of type 2b 'Malmö/New York' von Willebrand disease in Italy: the role of von Willebrand factor gene conversion. *J. Thromb. Haemost.* 2008; 6: 887–890.
 43. Takimoto Y., Imanaka F. Type 2B Hiroshima: a variant of von Willebrand disease characterized by chronic thrombocytopenia and presence of all von Willebrand factor multimers in plasma. *Int. J. Hematol.* 1999; 70: 127–131.
 44. Federici A.B., James P. Current management of patients with severe von Willebrand disease type 3: a 2012 update. *Acta Haematol.* 2012; 128: 88–99.
 45. Mannucci P.M., Federici A.B. Antibodies to von Willebrand factor in von Willebrand disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995; 386: 87–92.
 46. Shelton-Inloes B.B., Chehab F.F., Mannucci P.M., Federici A.B., Sadler J.E. Gene deletions correlate with development of allo-antibodies in von Willebrand disease. *J. Lab. Clin. Invest.* 1987; 79: 1459–1465.
 47. Othman M. Platelet-type von Willebrand disease: a rare often misdiagnosed and under diagnosed bleeding disorder. *Semin. Thromb. Hemost.* 2011; 37: 464–469.
 48. Franchini M., Lippi G., Favaloro E.J. Advances in hematology. Etiology and diagnosis of acquired von Willebrand syndrome. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 2010; 8: 20–24.