

Podejście diagnostyczne do choroby von Willebranda typu 2B

Diagnostic approach to type 2B von Willebrand disease

Ksenia Bykowska¹, Bernardeta Ceglarek²

¹Pracownia Choroby von Willebranda Zakładu Hemostazy i Chorób Metabolicznych

²Klinika Zaburzeń Hemostazy i Chorób Metabolicznych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Streszczenie

Typ 2B choroby von Willebranda (VWD) jest to wrodzona skaza krwotoczna. Charakteryzuje się zwiększonym powinowactwem czynnika von Willebranda (VWF) do płytkowego receptora GPIIb-IX-V, spowodowanym mutacjami w eksonie 28 genu VWF, kodującym domenę A1 cząsteczki VWF. Fenotypowo i klinicznie VWD 2B przypomina inną skazę krwotoczną — chorobę von Willebranda typu płytkowego (PT-VWD). Wykonując diagnostykę w kierunku VWD 2B, należy zawsze różnicować VWD 2B z typem PT-VWD. Należy także pamiętać, że VWD 2B powinna być zawsze brana pod uwagę u chorych z małopłytkowością.

Słowa kluczowe: choroba von Willebranda 2B, patofizjologia, podłoże genetyczne, diagnostyka kliniczna i laboratoryjna

J. Transf. Med. 2016; 9: 87–100

Summary

Type 2B Von Willebrand disease (VWD) is an inherited bleeding disorder with enhanced VWF affinity to platelet glycoprotein Iba receptor. It results from mutation within 28 exon of von Willebrand factor (VWF) that encodes the VWF A1 protein domain. As far as phenotype and clinical symptoms are concerned 2B VWD resembles another type of bleeding disorder called platelet-type von Willebrand disease (PT-VWD). In the course of the diagnostic procedure VWD 2B should always be differentiation from PT-VWD. It should always be reckoned with in the case of patients with thrombocytopenia.

Key words: Von Willebrand disease 2B, pathophysiology, genetic basis, clinical and laboratory diagnosis

J. Transf. Med. 2016; 9: 87–100

Wprowadzenie

„Chorobę von Willebranda należy podejrzewać u osób ze skłonnością do nadmiernych krwawień, jeżeli badania przesiewowe z zakresu hemostazy nie naprowadzają na rozpoznanie innej skazy krwotocz-

nej, a wywiady rodzinne wskazują na autosomalny sposób dziedziczenia” [1]

Choroba von Willebranda (VWD, von Willebrand disease) jest najczęściej występującą wrodzoną skazą krwotoczną, dziedziczną autosomalnie dominująco, rzadziej recesywnie. Jest ona spowo-

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

dowana niedoborem/defektem wielkocząsteczkowej glikoproteiny — czynnika von Willebranda (VWF, *von Willebrand factor*) [1–4].

Występuje stosunkowo często, bo u około 1–2% ogólnej populacji. Na VWD chorują zarówno kobiety, jak i mężczyźni. Skaza krwotoczna ma charakter skórno-słuzówkowy. Charakterystyczne objawy VWD to krwawienia z nosa i dziąseł, krwawe podbiegnięcia, przedłużone krwawienia po ekstrakcji zębów, skaleczeniach i zabiegach chirurgicznych. U kobiet najczęstszym objawem są przedłużone, krwotoczne miesiączki. W typie 3, ciężkim, mogą występować — podobnie jak w hemofilii — krwawienia do mięśni i stawów, krwawienia do centralnego układu nerwowego i z przewodu pokarmowego. Łagodna postać VWD (typ 1) jest częściej rozpoznawana u kobiet niż u mężczyzn, co powoduje, że w rejestrach chorych na VWD z reguły przeważają kobiety.

Choroba von Willebranda charakteryzuje się dużą heterogennością — zarówno fenotypową, jak i molekularną. Stężenie VWF w osoczu chorych, a także nasilenie skazy krwotocznej zależą od wielu czynników genetycznych i środowiskowych. Skaza krwotoczna występująca w tej samej rodzinie i z tą samą mutacją ma często bardzo różny przebieg. Rozpoznanie VWD utrudnia dodatkowo fakt, że łagodna skaza krwotoczna (przedłużone krwawienia miesięczne u kobiet, krwawienia z nosa) może występować równie często u ludzi zdrowych, jak i u chorych z VWD.

Klasyfikacja VWD [3] obejmuje trzy główne typy VWD (1, 2, 3) i cztery podtypy typu 2 (2A, 2B, 2M, 2N). Typy 1 i 3 charakteryzują defekt ilościowy cząsteczki VWF, natomiast typ 2 – defekt jakościowy (tab. 1). Do roku 2016 w Centralnym Rejestrze Wrodzonych Skaz Krwotocznych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie znalazło się 1215 chorych z typem 1; 146 z typem 2 (w tym 19 z typem 2B) i 161 z typem 3.

Czynnik von Willebranda

Czynnik von Willebranda jest osoczną glikoproteiną, biorącą udział w hemostazie w naczyniach o wysokiej sile ścinania; tętnicach, drobnych naczyniach i naczyniach patologicznie zwężonych [2, 3].

Synteza VWF przebiega w komórkach śródbłonna i megakariocytach szpiku kostnego pod kontrolą genu znajdującego się na końcu krótkiego ramienia chromosomu 12 (*12p13.2*). Gen VWF (*178 kb*) jest zbudowany z 52 eksonów i 51 intronów. Większość eksonów ma wielkość 40–342 bp; wyjątek stanowi ekson 28 (1,4 kb), kodujący domeny odpowiadające za ważne funkcje hemostatyczne VWF [4, 5].

Delecje, insercje, mutacje w miejscu składania typu *nonsense* i *missense* mogą powodować upośledzenie syntezy lub produkcję nieprawidłowej cząsteczki VWF, a wtórnie — niedobór czynnika VIII [6].

Najczęściej wykrywane są mutacje w typie 2 i 3. W typie 1 jedynie w części przypadków udaje się ustalić mutację sprawczą. Mutacje wykrywane w typie 2 i 3 zwykle korelują z typem VWD.

Prekursorowa cząsteczka VWF (pre-pro-VWF; 2813 aminokwasów) jest zbudowana z peptydu sygnałowego (22 aminokwasów), który bierze udział w translokacji VWF do reticulum endoplazmatycznego, propeptydu (741 aminokwasów; domena D1-D2) biorącego udział w procesie multimeryzacji i monomeru VWF (2050 reszt aminokwasowych). W monomerze VWF wyróżniamy cztery powtarzające się domeny (A, B, C, D), odpowiedzialne za funkcje biologiczne VWF. Są one ułożone od N-końca w następującym porządku: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-G2-B3-C1-C2-CK [4, 7, 8]. W kolejnych etapach biosyntezy monomer ulega dimeryzacji, sulfonowaniu, glikozylacji i multimeryzacji. Powstawanie dimerów w reticulum endoplazmatycznym rozpoczyna się od uwolnienia peptydu sygnałowego. Monomery łączą się między sobą wiązaniami dwusiarczkowymi powstającymi pomiędzy C-końcami cząsteczki (reszty 1908–2050), tworząc pro-dimery. Pro-dimery są transportowane do aparatu Golgiego, gdzie podlegają dalszej modyfikacji. Kolejnym etapem jest powstawanie multimetrów. W procesie multimeryzacji biorą udział domeny D1 i D3 (propeptyd [VWFpp]), D' i D3 od N-końca monomeru VWF. W aparacie Golgiego propeptyd ulega odłączeniu (proteoliza w pozycji 763) przez furynę, związaną z błonami endoprotezę zależną od jonów Ca [4]. Wolny VWFpp tworzy niekwalencyjny kompleks z VWF, który dysocjuje po uwolnieniu do krążenia. Część powstających w komórkach śródbłonna multimetrów jest stale uwalniana do krążenia, część natomiast zostaje zmagazynowana w ziarnistościach α płytek krwi lub ciałkach Weibel-Palade komórek śródbłonna, skąd może być uwalniana do krwioobiegu pod wpływem fizjologicznych i patologicznych bodźców [3, 7]. Masa cząsteczkowa osoczowego VWF wynosi od 500 kDa do około 10 000 kDa, natomiast zmagazynowanego w ziarnistościach komórek śródbłonna i płytkach krwi (UVWF, VWF *ultra large*) jest znacznie większa i wynosi powyżej 10 000 kDa. W osoczu występują trzy główne frakcje multimetrów: o największej masie HMWM (*high molecular weight multimers*), o masie pośredniej (IMWM, *intermediate molecular weight multimers*) i o niskim ciężarze cząsteczkowym (LMWM, *low molecular weight*). Najważniejszą rolę

Tabela 1. Klasyfikacja choroby von Willebranda (VWD)**Table 1.** Classification of von Willebrand disease (VWD)

Typ VWD	Charakterystyka laboratoryjna choroby von Willebranda
Typ 1	Defekt ilościowy. Dziedziczenie autosomalne dominujące rzadziej recesywnie. Częściowy niedobór aktywności i antygenu VWF. Upośledzona agregacja z rystocetyną. Iloraz VWF:RCo/VWF:Ag $\geq 0,7$. Prawidłowa struktura multimerów VWF. Liczba krwinek płytkowych krwi prawidłowa.
Typ 2A	Defekt jakościowy spowodowany defektem uwalniania lub nadmierną proteolizą VWF. Dziedziczenie autosomalne dominujące rzadziej recesywnie. Upośledzona agregacja z rystocetyną. Obniżona aktywność VWF:RCo. Iloraz VWF:RCo/VWF:Ag $< 0,7$. Selektywny niedobór HMWM lub HMWM i IMWM VWF. Liczba krwinek płytkowych prawidłowa.
Typ 2B	Defekt jakościowy spowodowany zwiększonym powinowactwem VWF do płytkowej glikoproteiny Ib α . Dziedziczenie autosomalne dominujące rzadziej recesywnie. Obniżona aktywność VWF:RCo. Zwiększona agregacja z rystocetyną (0,5–0,7 mg/ml). Iloraz VWF:RCo/VWF:Ag $< 0,7$. Selektywny niedobór HMWM VWF. Liczba krwinek płytkowych prawidłowa lub obniżona. Prawidłowa dystrybucja multimerów VWF w płytkach krwi.
Typ 2M	Defekt jakościowy. Dziedziczenie autosomalne dominujące rzadziej recesywnie. Obniżona aktywność VWF:RCo. Upośledzona agregacja z rystocetyną. Prawidłowa struktura multimerów. Iloraz VWF:RCo/VWF:Ag $< 0,7$. Liczba krwinek płytkowych prawidłowa.
Typ 2N	Defekt jakościowy. Upośledzenie wiązania VWF z FVIII. Dziedziczenie autosomalne dominujące rzadziej recesywnie. Iloraz VWF:RCo/VWF:Ag $\geq 0,7$. Iloraz FVIII/VWF:Ag $< 0,7$. Zmniejszone wiązanie cz. VIII. Prawidłowa struktura multimerów. Liczba krwinek płytkowych prawidłowa.
Typ 3	Defekt ilościowy. Dziedziczenie recesywnie. Całkowity niedobór antygenu VWF. Liczba krwinek płytkowych prawidłowa.

FVIII (*VIII factor*) — czynnik VIII; HMWM (*high molecular weight methacrylate*) — multimery wielkocząsteczkowe; IMWM (*intermediate molecular weight multimer*) — multimery o średniej masie cząsteczkowej; VWF (*Von Willebrand factor*) — czynnik von Willebranda; VWF:Ag (*Von Willebrand factor antigen*) — antygen czynnika von Willebranda; VWF:RCo (*Von Willebrand factor ristocetin cofactor*) — kofaktor rystocetyny

w zapewnieniu prawidłowej hemostazy (adhezji i agregacji płytek krwi) w naczyniach o wysokiej sile ścinania odgrywają HMWM. Wielkość krążących we krwi multimerów jest regulowana przez syntetyzowaną w komórkach wątroby metaloproteazę ADAMTS13 (*A Disintegrin And Metaloprotease with ThromboSpondin* — 1 motyw). Proteolizie ulega wiązanie Tyr1605 — Met1606 w regionie A2 VWF, przez co powstają cząsteczki VWF o mniejszej masie i mniejszym potencjale hemostatycznym. Zwiększona proteoliza VWF przez ADAMTS13 powoduje niedobory HMWM odpowiedzialnych za adhezję i agregację płytek krwi (typ 2A VWD), prowadząc do skazy krwotocznej [3, 4, 6, 7]. Wrażliwość VWF na proteolizę przez ADAMTS13 zależy od grupy krwi ($0 \geq B < A \geq AB$) i typu defektu cząsteczki VWF ($2A > 2B > 2M$) [9, 10].

Fakt, że stężenie VWF, jego wielkość i konformacja zależą od wielu czynników genetycznych, fizjopatologicznych oraz środowiskowych, znacznie utrudnia diagnostykę VWD. Jak wykazali Gill i wsp. [11], stężenie antygenu VWF (VWF:Ag, *Von Willebrand factor antigen*) zależy od grupy krwi ($0 < A < B < AB$). Najniższe średnie stężenie VWF:Ag występuje u osób z grupą krwi 0 (74,8%; 35,6–157%), a najwyższe — z grupą krwi AB (123,3%; 63,8–238,2%).

Czynnik von Willebranda wzrasta w stanach zapalnych, po niektórych lekach, po wysiłku fizycznym, a także w ciąży [12, 13]. U kobiet zdrowych stężenie VWF wzrasta stopniowo w całym okresie ciąży (najwyższy wzrost przypada na III trymestr), osiągając w czasie porodu powyżej 100 j./dl. Kobiety z VWD i VWF powyżej 30 j./dl VWF mogą osiągać w 33–37. tygodniu ciąży prawidłowe stężenie VWF. U kobiet z VWF mniejszym niż 20 j./dl wzrost stężenia VWF jest nieznaczny i najczęściej wymagają one odpowiedniej profilaktyki. W typie 2 VWD (VWF:RCo/VWF:Ag $< 0,7$) obniżone stężenie VWF ($< 50\%$) utrzymuje się przez cały okres ciąży. Po porodzie VWF wraca do wartości wyjściowych zazwyczaj w ciągu 7–21 dni [12, 13].

Rola choroby von Willebranda w hemostazie

Fizjologicznie VWF występuje w osoczu, na powierzchni i w ziarnistościach Weibel-Palade komórek śródbłonna, w megakariocytach i w ziarnistościach α płytek krwi. Zmagazynowany w ziarnistościach wewnątrzkomórkowych VWF jest uwalniany do osocza po stymulacji epinefryną, trombiną, histaminą, fibryną, a także po podaniu desmopresyny — 1-deamino-8-D-argininowazo-

presyny (DDAVP). Jego stężenie w osoczu wynosi 5–10 $\mu\text{g/ml}$ osocza, a czas półtrwania — 8–12 godzin. W procesie hemostazy czynnik VWF odgrywa dwie ważne role. Z jednej strony bierze udział w adhezji płytek do podśródbłonowego kolagenu i wzajemnej interakcji płytek (hemostaza pierwotna), a z drugiej — w krzepnięciu krwi (hemostaza wtórna) [3, 7, 8].

W warunkach fizjologicznych cząsteczka obecna w osoczu VWF ma postać kulistą, a jej powinowactwo do płytkowego receptora GP Ib-IX-V jest bardzo niskie. W chwili uszkodzenia naczynia VWF wiąże się z podśródbłonkowym kolagenem przez domenę A3 (910–1111). Wiązanie z kolagenem, wysokie siły ścinania, a także *in vitro* odłączenie kwasu sjałowego, rystocetyna i botrocetyna powodują ekspozycję miejsca wiązania płytkowej integryny GPIIb α w domenie A1 VWF (Val449-Lys728), indukują adhezję płytek i ich aktywację [4, 7, 8, 14]. Wiązanie dwusiarczkowe między Cys509 i Cys695 VWF, tworzące strukturę pętli, jest krytyczne dla tworzenia wiązań VWF–płytki krwi. Płytki zmieniają kształt i uwalniają zawartość ziarnistości α . Na powierzchni płytek pojawiają się aktywne kompleksy glikoprotein GPIIb-IIIa, które poprzez sekwencję RGD (Arg-Gly-Asp) wiążą się poprzez domenę C1 VWF z podśródbłonkowym kolagenem w miejscu uszkodzenia naczynia, a także tworzą wiązania między sąsiadującymi płytkami. Wiązanie VWF z receptorem GPIIb-IIIa jest konieczne dla agregacji i stabilnej adhezji płytek krwi w naczyniach o wysokich siłach ścinania. Inną, mało znaną funkcją VWF jest jego udział w megakariopoezie [14, 15]. W naczyniach o wysokiej sile ścinania ($> 1000 \text{ s}^{-1}$) czynnik VWF bierze udział w translokacji megakariocytów (MK) i końcowej fazie megakariopoezy, wiążąc się z receptorem GPIIb-IX-V (MK). Potwierdził to w swoich badaniach Dunois-Larde [14], który wykazał, że translokacja MK, powstawanie proplatek i uwalnianie płytek są całkowicie hamowane przez przeciwciała skierowane do glikokalicyny lub domeny VWF wiążącej GP Ib-IX-V.

W hemostazie wtórnej VWF pełni funkcję nośnika dla czynnika VIII układu krzepnięcia krwi, chroniąc go w ten sposób przed proteolizą przez aktywne białko C. Wiązanie cz VIII z VWF przebiega z udziałem N-końca VWF (D' VWF; 272 reszt aminokwasowych) i N-końca łańcucha lekkiego cz VIII (reszty aminokwasowe Val 670-Glu 684).

W procesie hemostazy śladowe ilości trombinu degradują kompleks VWF-VIII, uwalniając od N-końca cz VIII polipeptyd zawierający miejsce wiązania z VWF; powstaje VIIIa, który wiąże się

z ujemnie naładowanymi fosfolipidami i bierze udział w procesie krzepnięcia krwi. U chorych z VWD niedobór czynnika VIII jest wtórny do niedoboru VWF w osoczu. W kompleksie z VWF-VIII czas półtrwania cz VIII w krążeniu wynosi około 8–12 godzin, natomiast poza kompleksem — zaledwie 1–3 godzin.

Typ 2B choroby von Willebranda

Choroba von Willebranda typu 2B to skaza krwotoczna spowodowana mutacjami w eksonie 28 genu czynnika von Willebranda [6, 16]. Po raz pierwszy została opisana przez Ruggeri i wsp. w 1980 roku [17]. Pacjenci z VWD 2B stanowią około 5–8% wszystkich chorych na wrodzoną VWD. Dziedziczny się autosomalnie dominująco, rzadziej recesywnie. Mutacje zachodzące w domenie A1 VWF powodują wzrost powinowactwa VWF do receptora płytkowego GP Ib-IX-V i brak wielkocząsteczkowych multimetrów VWF (HMWM-VWF, *high molecular weight multimers Von Willebrand disease*) w osoczu. U wszystkich chorych na VWD 2B występuje zwiększona podatność ($2A > 2B > 2M$) na proteolizę przez ADAMTS13 (*disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs-13*) [3, 10]. Powstające w wyniku proteolizy produkty charakteryzują się upośledzoną aktywnością adhezyjną i nie tylko nie zapewniają prawidłowej hemostazy, ale też — wiążąc się z GPIIb płytek krwi — hamują wiązanie płytek do VWF w miejscu uszkodzenia naczynia [7, 18]. Zwiększona degradacja HMWM VWF przez ADAMTS13 powoduje brak HMWM w osoczu i nasilenia skazy krwotocznej. Czas półtrwania VWF 2B jest znacznie skrócony: u chorych, u których nie ma HMWM VWF, wynosi $4,47 \pm 0,41$ godz.; u chorych z prawidłową strukturą multimetrów VWF — $4,87 \pm 0,9$ godz.; natomiast w krążeniu dawcy — $15,53 \pm 2,17$ godz. [19].

Kliniczny i laboratoryjny obraz VWD 2B jest bardzo heterogeny [8, 18, 20, 21]. Skaza krwotoczna jest łagodna, umiarkowana lub ciężka. Może być spowodowana brakiem wielkocząsteczkowych multimetrów VWF (HMWM), małopłytkowością i/lub trombocytopatią [22, 23]. Nasilenie skazy krwotocznej u chorych VWD 2B i trombocytopatią nie zawsze koreluje z kofaktorem rystocetyny (VWF:RCo, *Von Willebrand factor ristocetin cofactor*) i ciężkością małopłytkowości. Najprawdopodobniej jest to wynikiem interakcji z czynnikami genetycznymi i środowiskowymi niezwiązanymi z VWF.

U chorych mogą się pojawiać krwawienia skórno-śluzówkowe, wybroczyny, krwotoczne

miesiączki, krwawienia z przewodu pokarmowego. Czynniki wyzwalającymi krwawienia są najczęściej uraz, zabiegi chirurgiczne, usunięcie zęba, poród. Według Federiciego i wsp. [22] ryzyko wystąpienia krwawień jest około 8-krotnie wyższe u chorych z liczbą płytek poniżej 140 G/l. W przebadanej przez nich grupie 67 chorych z VWD 2B (WBC < 140 G/L) u 43% wystąpił przynajmniej jeden epizod krwotoczny w ciągu 24 miesięcy. U 53% były to krwawienia z nosa; u 32% — krwawienia z przewodu pokarmowego; u 10% — krwotoczne miesiączki; u 3% — krwawienia z dziąseł.

U około 30–57% chorych na VWD 2B występuje łagodna lub umiarkowana małopłytkowość, która może się nasilać w sytuacjach zwiększonego uwalniania zmutowanego VWF przez komórki śródbłonna. U części chorych małopłytkowość oraz brak HMWM obserwuje się jedynie okresowo: po zabiegach chirurgicznych, w przebiegu infekcji, stresu, ciąży, po podaniu DDAVP. Istnieje jednak grupa chorych z prawidłowymi multimerami VWF, u których małopłytkowość nigdy nie występuje [20, 22].

Przyczyną małopłytkowości u chorych na VWD 2B mogą być: agregacja płytek przez zmutowany VWF, usuwanie agregatów płytkowych przez układ siateczkowo-śródbłonkowy i/lub upośledzenie megakariopoezy [22–25]. W tworzeniu agregatów największy udział mają multimery wielkocząsteczkowe z największą liczbą miejsc wiążących receptor płytkowy GPIIb/IX/V. Powstawanie agregatów jest sygnałem do zwiększonego ich usuwania z krążenia przez makrofagi wątroby i śledziona. Udział makrofagów w powstawaniu małopłytkowości w VWD 2B potwierdzają wyniki badań Casari i wsp. [24]. Autorzy ci wykazali na modelu mysim, że chemiczne zablokowanie endocytozy makrofagów dwukrotnie wydłuża czas przeżycia płytek w krążeniu.

Defekt megakariopoezy u chorych z VWD 2B jest wynikiem interakcji zmutowanego VWF z GP IIb-IX-V [20, 23]. U tych chorych upośledzone mogą być morfologia i translokacja MK, wszystkie etapy powstawania proplatek w warunkach wysokiej siły ścinania; może występować zwiększenie ich akumulacji i znaczne zmniejszenie produkcji płytek [14, 15].

Trombocytopatia jest trzecią obok małopłytkowości i niedoboru HMWM przyczyną skazy krwotocznej u chorych z VWD 2B. Płytki krwi tych chorych charakteryzują się upośledzonym przekazywaniem sygnałów wewnątrzkomórkowych i co za tym idzie — defektem aktywacji, sekrecji i zmiany kształtu płytek krwi [26–28].

Upośledzona funkcja płytkowego receptora GP IIb/IIIa odpowiedzialnego za stabilizowanie adhezji i reakcji międzypłytkowych w warunkach wysokich sił ścinania prowadzi do powstawania niestabilnego, zredukowanego skrzepu. W rozmazie krwi obwodowej mogą występować płytki olbrzymie i zlepy płytkowe. Stężenie VWF w płytkach krwi może być prawidłowe przy równoczesnym obniżeniu w osoczu VWF:RCo i wiązania VWF do kolagenu (VWF:CB, *Von Willebrand factor collagen binding*), braku HMWM, prawidłowym/zmniejszonym stężeniu VWF:Ag i cz VIII, ilorazem VWF:RCo/VWF:Ag < 0,7 i VWF:CB/VWF:Ag < 0,7.

U kobiet ciężarnych z typem 2B małopłytkowość może pojawiać się lub nasilać szczególnie w ostatnim trymestrze ciąży, a po porodzie wracać do wartości wyjściowych [29, 30]. Nasilenie małopłytkowości jest bardzo różne. W czasie porodu liczba płytek krwi może spadać nawet do 10–20 G/l. Ciężką trombocytopenię wymagającą toczenia koncentratów płytkowych obserwowano u kobiet ciężarnych z mutacją VWD 2B R1306W. Dramatyczne niekiedy obniżenie liczby płytek krwi jest wypadkową zwiększonej produkcji zmutowanego VWF prowadzącej do powstawania agregatów płytkowych, szybkości usuwania ich z krążenia i wydajności megakariopoezy.

Obraz laboratoryjny VWD 2B u kobiet w trzecim trymestrze ciąży, charakteryzuje się obniżonym VWF:RCo (cz VIII i VWF:Ag mogą być prawidłowe), brakiem, prawidłowym lub obniżonym stężeniem HMWM, spontaniczną agregacją płytek krwi. Rozpoznanie VWD 2B u kobiet w ciąży powinno być poparte analizą DNA, ponieważ przy bardzo niskiej liczbie płytek paradoksalnie stężenie HMWM może być prawidłowe [31]. Test agregacji płytek indukowanych rystocetyną (RIPA, *ristocetin induced platelet aggregation*) w większości przypadków u kobiet w ciąży nie ma zastosowania, ponieważ w tym okresie fizjologicznie wzrasta aktywność i adhezyność płytek krwi. Należy pamiętać, że VWD 2B powinna być zawsze brana pod uwagę u kobiet w ciąży z małopłytkowością.

Podłoże genetyczne choroby von Willebranda typu 2B

Podłożem skazy krwotocznej, małopłytkowości, braku HMWM i trombocytopatii są mutacje sprawcze, zlokalizowane w 5'-końcu eksonu 28 genu VWF (tab. 2). Kodują one domenę A1 VWF (najczęściej występują między kodonami 1266–

Tabela 2. Wybrane mutacje czynnika von Willebranda (VWF) a obraz kliniczny i laboratoryjny choroby von Willebranda typu 2B (VWD 2B)**Table 2.** Selected Von Willebrand factor (VWF) mutations and their association with clinical and laboratory picture

Mutacja	Parametry kliniczne i laboratoryjne	Piśmiennictwo
V1316M V1308C S1310F	Silna tendencja do krwawień, małopłytkowość nasilana przez stres	[2, 4, 22, 33, 34]
V1316M	Ciężki defekt aktywacji płytek (zmiany kształtu, uwalniania) skorelowany z upośledzeniem aktywacji, obecność małych i dużych agregatów płytkowych, małopłytkowość, ciężka skaza krwotoczna	[2, 22, 28]
P1266Q/L R1308L P1337L	Prawidłowy rozmaz krwi obwodowej, bez małopłytkowości przed i po DDAVP, niska tendencja do krwawień, prawidłowa struktura multimerów, prawidłowa morfologia płytek	[2, 4, 22, 33, 34]
H1268D R1306W R1308C I1309V V1316M R1341Q/W	Małopłytkowość, nasilenie w trakcie infekcji	[2, 22, 33, 34]
P1266Q R1308L	Małopłytkowość, nie występuje lub występuje bardzo rzadko, struktura multimerów prawidłowa, łagodna tendencja do krwawień	[2, 22]
R1308P	Nieprawidłowa megakariocytopoeza, ciężka małopłytkowość, obecność agregatów płytkowych, spontaniczna <i>aglutynacja in vitro</i>	[2, 22, 23]

Tabela 3. Struktura multimerów czynnika von Willebranda (VWF) a wybrane mutacje sprawcze w chorobie von Willebranda typu 2B (VWD 2B)**Table 3.** Multimer profile and their association with type 2B Von Willebrand disease (2B VWD) mutations

Struktura multimerów VWF	Mutacja	Piśmiennictwo
Prawidłowa	P1266L/Q R1308L	[2, 22]
Częściowy brak HMWM	H1260D I1309V P1337L	
Całkowity brak HMWM	R1306W R1341Q/W	
Całkowity brak HMWM i IMWM	R1308C V1316M	

HMWM (*high molecular weight methacrylate*) — multimery wielkocząsteczkowe; IMWM (*intermediate molecular weight multimer*) — multimery o średniej masie cząsteczkowej

Tabela 4. Morfologia krwi obwodowej a wybrane mutacje sprawcze choroby von Willebranda typu 2B (VWD 2B)**Table 4.** Blood morphology and their association with type 2B Von Willebrand disease (2B VWD) mutations

Parametry	Mutacja	Piśmiennictwo
Prawidłowa morfologia	P1266Q/L R1308L P1337L	[22]
Obecność olbrzymich płytek krwi w rozmazie krwi obwodowej; brak agregatów płytkowych	H11268D R1306W R1341Q	
Obecność płytek olbrzymich; obecność małych lub dużych agregatów płytkowych	R1308C I1309V V1316M R1341W	

Cys1461) biorącą udział w reakcji z płytkowym receptorem GP Iba i w adhezji płytek do kolagenu [4, 8]. Opisano około 25 mutacji odpowiedzialnych za VWD 2B [6, 16, 32]. W około 90% są to mutacje typu *missense*: R1306W, R1308C, V1316M, R1341Q [2]. Obecność mutacji sprawczych w typie 2B

zwiększa powinowactwo VWF do GPIIb α poprzez stabilizowanie konformacji wiązań w domenie A1 VWF [3]. Istnieje korelacja pomiędzy obrazem klinicznym a typem mutacji (tab. 2–4). U chorych z mutacjami V1316M, V1308C, S1310F, R1306W występuje ciężka skaza krwotoczna; u osób

z mutacją P1266Q/L i R1308L skaza krwotoczna jest łagodna, rozmaz krwi — prawidłowy, struktura multimetrów VWF — również prawidłowa, a u większości chorych małopłytkowość nie występuje nawet po podaniu DDAVP [4, 22, 31, 33, 34]. Nasilenie skazy krwotocznej u pacjentów z mutacją V1216M może być związane z upośledzoną agregacją, uwalnianiem i zmianą kształtu spowodowaną zahamowaniem receptora płytkowego GPIIb-IIIa. U chorych z obecnością płytek olbrzymich, ale bez płytkowych agregatów, występują mutacje H1268D, R1306W, R1341Q z obecnością małych lub dużych agregatów płytkowych: R1308C, I1309V, V1316M, R1341W [22]. U pacjentów z trombocytopenią najczęściej występują mutacje: H1268D, R1306W, R1308C, I1309V, V1316M i R1341Q/W, natomiast u osób z prawidłową liczbą płytek i prawidłową strukturą multimetrów: P1266Q/L i R1308L [4, 22, 23, 33, 34].

Warianty choroby von Willebranda typu 2B

Oprócz najczęściej występującego „klasycznego” VWD 2B opisano szereg wariantów, których jedyną niekiedy wspólną cechą jest zwiększone powinowactwo do GP Ib α (upośledzony test L-RIPA) i dziedziczenie autosomalne dominujące. Nurden i wsp. [23] opisali 2 chorych na VWD 2B spowodowanym mutacją R1308P w domenie A1 VWD, u których występowała ciężka trombocytopenia (< 25G/l), w krążeniu stwierdzano obecność aglutynatów płytkowych, nie było HMWM, a iloraz VWF:RCo/VWF : Ag miał wartość większą niż 0,7 (VWF:Ag = 75–100% u jednego chorego i 40–46% u drugiego; VWF : RCo — odpowiednio 100–115% i 46–55%).

Typ Tampa IIB [35] został opisany u 4 chorych z jednej rodziny, z nadmiernymi krwawieniami po urazach, zabiegach chirurgicznych, skaleczeniach. U wszystkich występowała przewlekła małopłytkowość, w krążeniu były obecne płytki olbrzymie i aglutynaty płytkowe, liczba płytek u 3 chorych wynosiła 9–46 G/l, a u czwartego — 100–108 G/l. Czasy PT i APTT oraz stężenie fibrynogenu były w normie. Stężenie VIII:C w osoczu chorych wynosiło 44–60%; VWF:Ag — 30–50%; VWF:RCo — 24–46%; czas krwawienia — powyżej 30 min. Analiza multimetrów wykazała brak frakcji HMWM VWF. Płytki chorych agregowały prawidłowo z ADP, kolagenem, epinefryną i kwasem arachidonowym; test L-RIPA był dodatni.

Zespół Montreal [36] był początkowo rozpoznany jako wrodzona małopłytkowość, a dopiero później — jako VWD 2B. U chorych występuje skłonność do siniaczenia i krwawienia z nosa, pojawiają się ciężkie krwawienia pooperacyjne oraz

krwawienia z przewodu pokarmowego spowodowane angiodyspazją. Mutacją sprawczą jest substytucja V1316M w domenie A1 VWF spowodowana tranzycją G > A w nukleotydzie 3946. Badania laboratoryjne u chorych z zespołem Montreal wykazały: makrotrombocytopenię (liczba płytek 20–30 G/L); obecność płytek olbrzymich i zlepów płytkowych w rozmazie; zwiększoną agregację z rystocetyną; wydłużoną okluzję skrzepu; czas krwawienia — ponad 20 minut, VWF:Ag — 43–75%; VWF:RCo — 16–29%; brak HMWM w osoczu (prawidłowe HMWM w płytkach).

W typie VWD 2B Malmö/New [37, 38] nie występuje małopłytkowość (również po stresie i DDAVP), struktura multimetrów VWF jest prawidłowa; agregacja z rystocetyną — 0,5–0,7 mg/ml z niskimi stężeniami rystocetyny jest podwyższona, choć w niektórych przypadkach może być prawidłowa. Skaza krwotoczna jest łagodna lub VWD przebiega bezobjawowo. Początkowo defekt ten był opisany jako typ 1 VWD. Mutacją sprawczą jest 3797C > T (P1266L). U części chorych z tą mutacją opisano podwyższony L-RIPA; u kilku osób natomiast — prawidłowy.

W 1999 roku [39] opisano wariant 2B „Hiroshima” charakteryzujący się przewlekłą małopłytkowością i prawidłową liczbą multimetrów. W 2005 roku Baronciani i wsp. [40] przedstawili przypadek 2B VWF z mutacją R1308L (G3923T), w którym iloraz VWF:RCo / VWF:Ag wynosił 0,7/0,6, natomiast VWF:CB/VWF:Ag — 0,47–0,48; osoczowe multimetry i liczba płytek krwi były prawidłowe, a leczenie DDAVP nie powodowało małopłytkowości.

Kolejny wariant VWD 2B opisali w roku 2007 Casonato i wsp. [41]. Mutacją sprawczą okazała się substytucja I1372S (T4115G w eksonie 28 VWD). Obraz laboratoryjny charakteryzował się prawidłowymi stężeniami czynnika VIII, VWF:Ag; VWF:RCo i VWF:CB, i płytkowego VWF:Ag; prawidłową strukturą multimetrów; prawidłową liczbą płytek; obecnością w rozmazie zlepów płytkowych; spontaniczną agregacją płytek krwi; i ich zwiększoną agregacją pod wpływem niskich dawek rystocetyny.

Wrodzona choroba von Willebranda typu 2B powikłana obecnością przeciwciał anti-2B VWD

We wrodzonej VWD przeciwciała anti-VWF pojawiają się stosunkowo rzadko, bo u 3–6% chorych, głównie z typem ciężkim (typ 3). Alloprzeciwciała występują przede wszystkim u pacjentów z dużymi delecjami, przesunięciem ramki odczytu i mutacjami typu *nonsense* [42].

W 2015 roku po raz pierwszy opisano pojawienie się alloprzeciwciał anti-VWF u pacjentki z wrodzonym VWD 2B [43]. Był to przypadek 35-letniej kobiety z mutacją R1308C (3922C > T) w eksonie 28 kodującym domenę A1 VWF. Pojawiające się u niej krwawienia były leczone desmopresyną i kwasem traneksamowym; w dzieciństwie jeden raz otrzymała krioprecypitat. Po cięciu cesarskim z powodu atonii macicy z odklejeniem łożyska chora otrzymała koncentrat VIII/VWF. Podczas podawania koncentratu wystąpiła reakcja alergiczna pod postacią obrzęku i rumienia wędrującego. Reakcja alergiczna i krwawienia ustąpiły po dożylnym, równoczesnym podaniu leków antyhistaminowych i koncentratu VIII/VWF. Kiedy w 5 tygodni później, podczas kolejnego epizodu krwotocznego, chora otrzymała koncentrat VIII/VWF i leki antyhistaminowe, reakcja alergiczna nie wystąpiła. Badania laboratoryjne wykazały brak wzrostu stężenia cz VIII i VWF po 1 godzinie i 24 godzinach od podania preparatu. Krwawienia ustąpiły po leczeniu desmopresyną i kwasem traneksamowym w 3 tygodnie od wykonania zabiegu łyżeczkowania łożyska. W przeciwieństwie do koncentratu VIII/VWF — po podaniu desmopresyny wzrastała aktywność VWF:RCo i spadała liczba płytek krwi, co zdaniem autorów sugeruje, że przeciwciała były skierowane do egzogennie podanego VWF.

Nabyta choroba von Willebranda typu 2B

Nabyta choroba von Willebranda (AVWS, *acquired von Willebrand syndrome*) charakteryzuje się obrazem klinicznym i laboratoryjnym podobnym do wrodzonej VWD, brakiem wywiadu rodzinnego i chorobowego skazy krwotocznej oraz skróconym czasem półtrwania VWF w krążeniu. Dotychczas opisano około 300 przypadków AVWS, ale tylko cztery z nich to AVWS typu 2B [44–47]. Pierwszego pacjenta z AVWS 2B opisali Droubin i wsp. w roku 1989 [44]. U wszystkich skaza krwotoczna pojawiała się w przebiegu gammapatii monoklonalnej o nieznanym etiologii (MGUS, *monoclonal gammopathy of undetermined significance*); jej przebieg był znacznie cięższy niż w wypadku wrodzonej VWD 2B, a leczenie samymi koncentratami VWF okazało się niewystarczające (konieczne było toczenie koncentratu VIIa i/lub immunoglobuliny). Przyczyną AVWS u tych chorych były najprawdopodobniej przeciwciała poliklonalne klasy IgG — wiążące się z VWF, tworzące z nim szybko usuwane z krążenia kompleksy. Jednak w żadnej ze wspomnianych prac [44–47] nie udało się ani wyizolować, ani scharakteryzować przeciw-

ciał anti-VWF. Oznaczanie aktywności VWF:RCo w mieszaninie osocza chorych z osoczem dawcy wykazywało brak hamowania VWF:RCo, a jedynie badania immunoelektroforetyczne potwierdziły obecność kompleksów immunologicznych. Udało się natomiast opracować laboratoryjny model AVWS 2B spowodowanej obecnością przeciwciał. Otrzymano dwa przeciwciała monoklonalne indukujące wiązanie HMWM VWF do GPIb płytek i zwiększające powinowactwo VWF do G1b α [48, 49].

Choroba von Willebranda typu płytkowego

Choroba von Willebranda typu płytkowego (PT-VWD, *platelet type von Willebrand disease*), zwana też rzekomą VWD, to wrodzona trombocytopenia charakteryzująca się łagodną skazą krwotoczną i obrazem laboratoryjnym podobnym do VWD 2B (tab. 5) [50, 51]. Występuje 10 razy rzadziej niż VWD 2B i dziedziczny się autosomalnie dominująco. Podłożem skazy krwotocznej jest mutacja genu glikoproteiny Ib α , znajdującego się na chromosomie 17, powodująca zwiększenie powinowactwa płytek do VWF. U chorych występują krwawienia skórno-śluzówkowe, krwawienia z nosa, po ekstrakcji zębów, urazach i zabiegach chirurgicznych. Nasilone krwawienia mogą pojawić się w przebiegu ciąży, na skutek przyjmowania aspiryny i leków hamujących funkcje płytek krwi. Lecniczo u chorych z PT-VWD stosuje się transfuzje płytek krwi. Z tego też powodu przeciwskazana jest desmopresyna, która — uwalniając VWF ze śródbłonna naczyń — powoduje nasilenie małopłytkowości [51].

Diagnostyka laboratoryjna choroby von Willebranda typu 2B

Diagnostyka VWD powinna opierać się o zalecenia Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów opracowane w 2008 roku [52]. Badania laboratoryjne w VWD zawsze musi poprzedzać etap kliniczny: badanie przedmiotowe, wywiad rodzinny i wywiad chorobowy. Diagnostyka VWD powinna być przeprowadzona przy uwzględnieniu czynników, które mogłyby mieć wpływ na stężenie VWF, takich jak grupa krwi (w grupie O jest najniższe stężenie VWF), wiek (noworodki mają podwyższone stężenie VWF, które normalizuje się w ciągu 6 miesięcy, u osób starszych stężenie VWF jest z reguły wyższe, wzrasta z wiekiem około 10 j./dL⁻¹ na dekadę), stany zapalne (VWF jest białkiem ostrej fazy), ćwiczenia fizyczne (przed pobraniem

Tabela 5. Różnicowanie PT-VWD i VWD 2B**Table 5.** Differentiation between PT-VWD and VWD 2B

Oceniane parametry	VWD 2B	PT-VWD
Dziedziczenie autosomalne dominujące	+	+
Zwiększone powinowactwo VWF do płytkowego receptora GPIIb α	+	-
Mutacje sprawcze w eksonie 28 genu VWF (<i>International Society on Thrombosis and Haemostasis</i> [VWD] database [39])	+	-
Zwiększone powinowactwo glikoproteiny płytkowej Ib α do VWF	-	+
Mutacje sprawcze w genie <i>Gbα</i>	-	+
Obniżone VWF:RCo i VWF:CB, prawidłowy lub obniżony VWF:Ag	+	+
Iloraz VWF:RCo/VWF:Ag i VWF:CB/VWF:Ag < 0,7	+	+
Brak lub częściowy niedobór HMWM VWF	+/-	+/-
Obecność w rozmazie agregatów płytkowych	+/-	+/-
Agregacja płytek w osoczu bogatopłytkowym (PRP) pod wpływem krioprecypitatu	-	+
Leczenie PT-VWD: 1/ Transfuzja koncentratów krwinek płytkowych		
Leczenie VWD 2B: 1/ Transfuzja koncentratu VWF		
DDAVP u większości chorych z typem 2B VWD jest przeciwwskazana, gdyż może powodować/nasilać małopłytkowość		

DDAVP — 1-deamino-8-D-argininowazopresyna; HMWM (*high molecular weight methacrylate*) — multimery wielkocząsteczkowe; PRP (*platelet rich plasma*) — osocze bogatopłytkowe; PT-VWD (*platelet type von Willebrand disease*) — choroba von Willebranda typu płytkowego; VWD 2B (*type 2B von Willebrand disease*) — choroba von Willebranda typu 2B; VWF (*Von Willebrand factor*) — czynnik von Willebranda; VWF:Ag (*Von Willebrand factor antigen*) — antygen czynnika von Willebranda; VWF:CB (*Von Willebrand factor collagen binding*) — czynnik von Willebranda do kolagenu; VWF:RCo (*Von Willebrand factor ristocetin cofactor*) — kofaktor rystocetyny

krwi zaleca się 15–30 min odpoczynku), ciąża (u kobiet w ciąży największy wzrost VWF jest w 3. trymestrze), choroby tarczycy (w niedoczynności tarczycy VWF jest obniżony, natomiast w nadczynności wzrasta) [53].

Dwa pierwsze etapy diagnostyki laboratoryjnej VWD 2B są wspólne dla wszystkich typów VWD [54]. Etap pierwszy obejmuje badania przesiewowe (tab. 6 i 7): czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT, *activated partial thromboplastin time*), czas protrombinowy (PT, *prothrombin time*), czas trombinowy (TT, *thrombin time*), liczbę i wielkość płytek krwi, czas okluzji w aparacie PFA-100 (CT, *closure time*) [54]. Etap drugi charakteryzuje typ VWD (tab. 6 i 8). Identyfikacja VWD 2B i różnicowanie z innymi defektami o podobnym obrazie klinicznym i laboratoryjnym jest wykonywane dopiero w etapie trzecim, przy użyciu wysokospecjalistycznych metod (tab. 6 i 9). Podstawowym, najważniejszym parametrem diagnostycznym różnicującym VWD 2B z innymi typami VWD (1, 2A, 2N, 2M), małopłytkowością i PT-VWD jest ocena powinowactwa VWF do glikoproteiny płytkowej Ib α oraz obecność mutacji w eksonie 28 genu VWF. Wszystkie pozostałe parametry: VWF:RCo, VWF:Ag czy VWF:CB, a nawet VWF:RCo/VWF:Ag mogą być upośledzone (w klasycznej formie) lub prawidłowe (warianty).

Test L-RIPA (Low ristocetin induced platelet aggregation)

W wykrywaniu i różnicowaniu VWD 2B bardzo przydatna okazała się rystocetyna — antybiotyk otrzymywany ze szczepu bakterii *Nocardia Lurida* [55–57]. W diagnostyce zaburzeń hemostazy została ona zastosowana po raz pierwszy w latach 70. XX wieku. Ristocetyna powoduje allosteryczne zmiany w cząsteczce VWF indukujące interakcję VWF z receptorem płytkowym GPIIb-IX-V z VWF w nieobecności aktywatorów fizjologicznych VWF, takich jak siły ścinania czy związanie z kolagenem. W obrębie domeny A1 VWF znajdują się dwa miejsca wiązania rystocetyny — Cys1237-Pro1251 i Glu1463-Asp1472. Obecnie agregacja płytek krwi pod wpływem rystocetyny jest wykonywana rutynowo u chorych z podejrzeniem VWD 2B, PT-VWD, a także w trombocytopatii Bernarda-Souliera. U osób zdrowych agregacja pod wpływem rystocetyny o stężeniu 1,25 mg/ml wynosi od 60–80%; u chorych na typ 1, 2A, 2B, 2M i 2N może być prawidłowa lub obniżona. W celu zidentyfikowania typu 2B VWD wykonujemy agregację (tzw. test L-RIPA) przy stężeniu rystocetyny 0,5–0,7 mg/ml, pamiętając, że na przykład agregacja w obecności VWF (P1266L) zachodzi przy wyższych stężeniach rystocetyny (> 0,5), natomiast z VWF (V1316M) — przy niższych (nawet 0,3 mg/ml).

Tabela 6. Diagnostyka laboratoryjna choroby von Willebranda (VWD)**Table 6.** Laboratory diagnostics of Von Willebrand disease (VWD)

Badania przesiewowe	Typ VWD	Podtyp VWD
Czas protrombinowy (PT)	Kofaktor rystocetyny (VWF:RCo)	L-RIPA (agregacja przy niskich stężeniach rystocetyny)
Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT)	Antygen VWF (VWF:Ag)	Test wiązania VIII:C*
Liczba krwinek płytkowych	Wiązanie kolagenu (VWF:CB)	Multimery czynnika von Willebranda (VWF)
Obecność płytek olbrzymich	Czynnik VIII (VIII:C)	L-RIPA „mieszany”
Czas okluzji (CT, PFA-100)	Iloraz VWF:RCo/VWF:Ag	Agregacja w obecności krioprecypitatu/ /koncentratu VWF
		Badania genetyczne

*Badanie jest wykonywane, jeżeli VIII:C/VWF:Ag < 0,6; VIII:C < 20%

Tabela 7. Wyniki badań przesiewowych w diagnostyce choroby von Willebranda (VWD)**Table 7.** Laboratory screening pattern in Von Willebrand disease (VWD) diagnosis

Badanie	Typ VWD					
	1	2A	2B	2N	2M	3
Czas protrombinowy (PT)	N	N	N	N	N	N
Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT)*	↑/N	↑/N	↑/N	↑/N	↑/N	↑↑
Czas trombinowy (TT)	N	N	N	N	N	N
Liczba krwinek płytkowych	N	N	↓/N	N	N	N
Obecność płytek olbrzymich	—	—	+/-	—	—	—
PFA-100	—	—	+/-	—	—	—
CT/EPI**	↑/N	↑	↑	N	↑	↑↑↑
CT/ADP***						↑↑↑

*Wydłużenie czasu APTT jest wynikiem wtórnego niedoboru czynnika VIII:C

**Prawidłowy test CT/EPI wyklucza ciężki typ VWD, a także ciężką małopłytkowość i ciężkie zaburzenia funkcji płytek krwi

*** Ciężkie defekty VWF powodują wydłużenie zarówno CT/EPI, jak i CT/ADP

Wynik testu uznajemy za pozytywny, jeżeli w 3 minuty po dodaniu rystocetyny 0,5–0,6 mg/ml uzyskujemy co najmniej 30-procentową amplitudę agregacji [16]. Agregacja pod wpływem 0,5–0,6 mg/ml rystocetyny nie zachodzi u osób zdrowych i chorych z VWD — z wyjątkiem typu 2B i PT-VWD. U chorych z typem 2B VWD i PT-VWD agregacja pod wpływem 0,5–0,6 mg/ml jest podwyższona i zachodzi w podobnym stopniu jak z rystocetyną 1,25 mg/ml. Dodatni wynik testu L-RIPA (zwiększona agregacja) może świadczyć zarówno o typie 2B VWD, charakteryzującym się zwiększonym powinowactwem VWF do płytek krwi spowodowanym mutacjami genu VWF w eksonie 28, jak i PT-VWD, w którym zwiększone powinowactwo płytek krwi do VWF jest spowodowane mutacjami genu płytkowego receptora G1b α . Brak podwyższonej agregacji w teście L-RIPA nie wyklucza jednak całkowicie VWD 2B. W piśmiennictwie są opisane warianty

typu 2B VWD potwierdzone badaniami genetycznymi z ujemnym testem L-RIPA, z podwyższonym L-RIPA dopiero po podaniu DDAVP lub przy wyższych niż standardowe stężeniach rystocetyny [2]. Różnicowanie VWD 2B i PT-VWD jest możliwe na podstawie testu „mieszanego” RIPA lub w badaniu agregacji, w którym rystocetyna jest zastąpiona przez krioprecypitat.

Test „mieszany” RIPA [55, 57]

Jeżeli agregacja płytek krwi pacjenta zachodzi pod wpływem niskich stężeń rystocetyny, wówczas mamy dwie możliwości: albo jest to VWD 2B, albo PT-VWD. Kolejnym etapem diagnostyki musi być zatem zróżnicowanie tych typów. Różnicowania VWD typu 2B i PT-VWD można wykonać metodami molekularnymi, badając aglutynację płytek w obecności krioprecypitatu, lub w testach mieszanych RIPA.

Tabela 8. Charakterystyka laboratoryjna typów i podtypów choroby von Willebranda (VWD)**Table 8.** Laboratory evaluation of Von Willebrand disease (VWD) types and subtypes

Badanie	Typ VWD					
	1	2A	2B	2N	2M	3
VIII:C*	N/↓	N/↓	N/↓	↓↓	N/↓	↓↓↓ ($< 20\%$)
VWF:Ag	↓/↓↓ ($< 50\%$)	↓/N	↓/N	N/↓	↓/N	↓↓↓ ($< 5\%$)
VWF:RCo	↓/↓↓	↓/↓↓ ($< 30\%$)	↓↓	↓/N	↓	↓↓↓ ($< 5\%$)
VWF:CB	↓	↓ ($< 15\%$)	↓ ($< 40\%$)	N/↓	N/↓	↓↓↓ ($< 5\%$)
VWF:RCO/VWF:Ag	($> 0,7$)	($< 0,7$)	($< 0,7$)	($> 0,7$)	($< 0,7$)	nie dotyczy
VWF:CB/VWF:Ag	($> 0,7$)	($< 0,7$)	($< 0,7$)	($> 0,7$)	($< 0,7$)	nie dotyczy
VIII:C/VWF:Ag	($> 0,7$)	($> 0,7$)	($> 0,7$)	($< 0,7$)	($> 0,7$)	nie dotyczy

*Jeżeli VIII:C wynosi $< 20\%$ (zestaw Diagnostica Stago), konieczne jest określenie zdolności VWF do wiązania egzogenego VIII:C w celu wykluczenia hemofilii A i potwierdzenia typu 2N VWD

Test „mieszany” RIPA polega na pomiarze agregacji płytek krwi pod wpływem rystocetyny 0,5–0,6 mg/ml w dwóch mieszaninach:

- zawiesiny płytek krwi [osocza bogatopłytkowego (PRP, *platelet rich plasma*)] chorego (250–300 G/l) z osoczem ubogopłytkowym (PPP, *platelet-poor plasma*) dawcy — w stosunku 1:1;
- PRP dawcy z PPP chorego — w stosunku 1:1.

W wypadku PT-VWD płytki PRP — w przeciwieństwie do VWD 2B — agregują w obecności osocza dawcy i niskiego stężenia rystocetyny. Test ten nie daje, co prawda, fałszywych wyników, ale ze względu na stopień trudności jest stosowany w niewielu laboratoriach.

Agregacja w obecności krioprecypitatu [55, 57]

Wykonuje się agregację płytek krwi (osocze bogatopłytkowe lub myte płytki) pacjenta pod wpływem krioprecypitatu (stężenie końcowe cz VIII 200 j/ml) lub koncentratu VWF. Obecność agregacji wskazuje na PT-VWD, natomiast jej brak — na VWD 2B. Należy jednak podkreślić, że test ten może dawać około 10% wyników fałszywie pozytywnych.

Analiza multimetrów czynnika von Willebranda [53, 57]

Jest to badanie służące do różnicowania typów i podtypów VWD na podstawie struktury multimetrów VWF. Badanie jest wieloetapowe i obejmuje elektroforezę w nieredukującym żelu

agarozowym w obecności siarczanu sodowego do-decyłu, immunobloting, detekcję rozdziału metodą chemiluminescencji, analizę densytometryczną. U ludzi zdrowych obecne są trzy frakcje multimetrów: wysokocząsteczkowa (HMWM, *high molecular weight methacrylate*), średnicząsteczkowa (IMWM, *intermediate molecular weight multim*) i niskocząsteczkowa (LMWM, *low molecular weight methacrylate*). Charakterystyczny dla typu 2B jest brak HMWM, odpowiedzialnej za prawidłową pierwotną hemostazę.

Diagnostyka molekularna [2, 4, 6, 34, 55]

Badania genetyczne pozwalają na różnicowanie VWD 2B z PT-VWD. Wykrycie mutacji w eksonie 28 genu kodującego domenę A1 VWF potwierdza rozpoznanie VWD 2B i także może być czynnikiem predykcyjnym obrazu klinicznego/laboratoryjnego choroby (tab. 2–4). Należy jednak pamiętać, że brak mutacji nie wyklucza rozpoznania VWD 2B. Wykrycie mutacji w genie płytkowej glikoproteiny GPIIb α potwierdza rozpoznanie PT-VWD.

Spontaniczna agregacja

W badaniu określa się procent spontanicznej agregacji zachodzącej w mieszanym w agregometrze PRP, bez dodania rystocetyny. Czas wykonania badania wynosi około 20 minut w 37°C. Spontaniczna agregacja zachodzi u części chorych na VWD 2B.

Tabela 9. Laboratoryjne kryteria rozpoznania choroby von Willebranda typu 2B (VWD 2B)**Table 9.** Laboratory pattern of type 2B Von Willebrand disease (2B VWD) evaluation

Badanie	Ocena laboratoryjna
Liczba krwinek płytkowych	Łagodna małopłytkowość lub prawidłowa liczba płytek Nasilanie się małopłytkowości w ciąży (szczególnie w 3. trymestrze) Małopłytkowość nie występuje — VWF P1266Q/L, VWF R1308L, VWF P1337L Nasilenie się małopłytkowości po podaniu DDAVP
Agregacja	Agregacja płytek krwi przy stężeniu rystocetyny 0,5–0,7 mg/ml (L-RIPA \geq 30%) Brak agregacji w obecności krioprecypitatu Agregacja w teście „mieszanym” RIPA wskazująca na typ 2B U części chorych — spontaniczna agregacja
Analiza multimerów	Brak frakcji HMWM (Malmo/New York, Hiroshima — prawidłowa struktura multimerów)
VWF:IbCo ELISA	Metoda nowa, w trakcie badań Brak/obniżona wartość HMWM Wynik [j/dl] jest znacznie wyższy dla 2B VWD niż dla VWD 1, 2A, 2M, PT-VWD
Badanie genetyczne	Mutacja w eksonie 28 powodująca zamianę aminokwasów w domenie A1 VWF (brak mutacji nie wyklucza 2B VWD) Brak mutacji w genie płytkowej glikoproteiny GPIb wyklucza PT-VWD

DDAVP — 1-deamino-8-D-argininowazopresyna; HMWM (*high molecular weight methacrylate*) — multimery wielkocząsteczkowe; RIPA (*ristocetin-induced platelet agregatio*) — agregacja płytek indukowanych rystocetyną; VWF (*Von Willebrand factor*) — czynnik von Willebranda

Test VWF:IbCo ELISA [58]

W 2011 roku opisano nowy test immunoenzymatyczny VWF:IbCo ELISA, którego zasadą jest ocena wiązania VWF badanego osocza ze związaną na powierzchni mikrocząstki, odpowiednio zmutowaną glikoproteiną GPIb (*gain-of-function*) przy braku rystocetyny. Jak wykazały badania Flood i wsp [58], przeprowadzone na dużych grupach chorych, test ten umożliwia różnicowanie VWF 2B zarówno z typem 2A, jak i PT-VWD. Niestety, test ten znajduje się wciąż na etapie badań i nie ma jego handlowych odpowiedników.

Podsumowanie

Diagnostyka VWD 2B stanowi duże wyzwanie dla każdego laboratorium. Znacznym utrudnieniem jest zmienność stężenia VWF w zależności od czynników patofizjologicznych, genetycznych, środowiskowych, a także kliniczne i laboratoryjne podobieństwo do PT-VWD. U każdego chorego z podejrzeniem VWD 2B konieczne jest wykonanie dodatkowych badań różnicujących VWD 2B i PT-VWD. Jest to bardzo ważny etap diagnostyki, ponieważ postępowanie lecznicze w tych dwóch jednostkach chorobowych jest różne.

W leczeniu krwawień występujących u chorych z VWD 2B z dobrym efektem stosuje się koncentraty cz VIII/VWF. Mało skuteczne są transfuzje koncentratów krwinek płytkowych, gdyż pod wpływem zmutowanego VWF płytki agregują. Rozpoznanie typu 2B jest w większości przypadków przeciwwskazaniem do stosowania DDAVP, ponieważ może ona powodować okresowy spadek liczby krwinek płytkowych i nasilenie krwawienia.

Piśmiennictwo

- Łopaciuk S. Rozpoznawanie i leczenie choroby von Willebranda. *Acta Haematol. Pol.* 2003; 34 (supl. 1): 62–70.
- Federici A.B., Canciani M.T. Clinical and laboratory versus molecular markers for a correct classification of von Willebrand disease. *Haematol.* 2009; 94: 610–615.
- 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.
- Goodeve A.C. The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Reviews* 2010; 24: 23–134.
- 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. *Biochemistry* 1991; 30: 253–269.

6. Bogusz M., Lewandowski K. Choroba von Willebranda od struktury genu do zaburzeń cząsteczki białkowej. *Acta Haemat. Pol.* 2005; 36: 33–43.
7. Luo G-P., Ni B., Yang X., Wu Y-Z. Von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta Haematol.* 2012; 128: 158–169.
8. Szanto T., Joutsu-Korhonen L., Deckmyn H., Lassila R. New insights into von Willebrand disease and platelet function. *Semin. Thromb. Hemost.* 2012; 38: 55–63.
9. Bowen D.J. An influence of ABO blood group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS13. *J. Thromb. Haemost.* 2002; 1: 33–40.
10. Rayes J., Hommais A., Legendre P. i wsp. Effect of von Willebrand disease type 2B and type 2M mutations on the susceptibility of von Willebrand factor to ADAMTS-13. *J. Thromb. Haemost.* 2006; 5: 321–328.
11. Gill C.J., Endres-Brooks J., Bauer P.J., Marks W.J., Montgomery R.R. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987; 69: 1691–1695.
12. Castaman G. Changes of von Willebrand factor during pregnancy in women with and without von Willebrand disease. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2013; 5: e2013052.
13. Pacheco L.D., Costantine M.M., Saade G.R., Mucowski S., Hankins G.D.V., Sciscione A.C. Von Willebrand disease and pregnancy: a practical approach for the diagnosis and treatment. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2010; 203: 194–200.
14. Dunois-Larde C., Capron C., Fichelson S., Bauer T., Cramer-Borde E., Baruch D. Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood* 2009; 114: 1875–1883.
15. Poirault-Chassac S., Nguyen K.A., Pietrzyk A. i wsp. Terminal platelet production is regulated by von Willebrand factor. *Plos One* 2013; 8: e63810.
16. Castaman G., Federici A.B. Type 2B von Willebrand disease: A matter of plasma plus platelet abnormality. *Semin. Thromb. Hemost.* 2016; Epub ahead of print.
17. Ruggeri Z.M., Pareti F.J., Mannucci P.M., Ciavarella N., Zimmerman T.S. Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand disease. *N. Engl. J. Med.* 1980; 302: 1047–1051.
18. Ruggeri Z.M. Type IIB von Willebrand disease: a paradox explains how von Willebrand factor works. *J. Thromb. Haemost.* 2004; 2: 2–6.
19. Casonato A., Gallinaro L., Cattini M.G. i wsp. Reduced survival of type 2B von Willebrand factor, irrespective of large multimer representation or thrombocytopenia. *Haematol.* 2010; 95: 1366–1372.
20. Castaman G. 2B or not 2B: when vWF is not a good platelet friend. *Blood* 2013; 122: 2772–2773.
21. Tosoletto A., Castaman G. How I treat type 2 variant forms of von Willebrand disease. *Blood* 2015; 125: 907–914.
22. Federici A.B., Mannucci P.M., Castaman G. i wsp. Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: A cohort study of 67 patients. *Blood* 2009; 113: 526–534.
23. Nurden P., Debili N., Vainchenker W. i wsp. Impaired megakaryocytopoiesis in type 2B von Willebrand disease with severe thrombocytopenia. *Blood* 2006; 108: 2587–2595.
24. Casari C., Du V., Wu Y-P. i wsp. Accelerated uptake of vWF/platelet complexes in macrophages contribute to VWD type 2B-associated thrombocytopenia. *Blood* 2013; 122: 2893–2902.
25. Nurden P., Gobbi G., Nurden A. i wsp. Abnormal VWF modifies megakaryocytopoiesis: studies of platelets and megakaryocyte cultures from patients with von Willebrand disease type 2B. *Blood* 2010; 115: 2649–2656.
26. Ware J. Thrombocytopathy and type 2B von Willebrand disease. *J. Clin. Invest.* 2013; 123: 5004–5006.
27. Langer F., Obser T., Oyen F. Characterisation of the p.A1461D mutation causing von Willebrand disease type 2B with severe thrombocytopenia, circulating giant platelets, and defective α -granule secretion. *Thromb. Haemost.* 2014; 111: 777–779.
28. Casari C., Berrou E., Lebret M. i wsp. Von Willebrand factor mutation promotes thrombocytopathy by inhibiting integrin α IIb β 3. *J. Clin. Invest.* 2013; 123: 5071–5081.
29. Kujovich J.L. Von Willebrand disease and pregnancy. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3: 246–253.
30. Sanchez-Luceros A., Farias C.E., Amaral M.M. i wsp. Von Willebrand factor — cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal nonpregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb. Haemost.* 2004; 92: 1320–1326.
31. Ozeki M., Kunishima S., Kkasahara K. i wsp. A family having type 2B von Willebrand disease with an R1306W mutation: severe thrombocytopenia leads to the normalization of high molecular weight multimers. *Thromb. Res.* 2010; 125: e17–e22.
32. Othman M., Favaloro E.J. Genetics of type 2B von Willebrand disease: “true 2B”, “ticky 2B” or “not 2B”. What are the modifiers of the phenotype. *Semin. Thromb. Hemost.* 2008; 34: 520–531.
33. Lillicrap D. Genotype/phenotype association in von Willebrand disease: is the glass half full or empty? *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7 (supl. 1): 65–70.
34. Lillicrap D. Translational medicine advances in von Willebrand disease. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 11 (supl. 1): 75–83.
35. Saba H.I., Saba S.R., Dent J., Ruggeri Z.M., Zimmerman T.S. Type IIB Tampa: A variant of von Willebrand disease with chronic thrombocytopenia, circulating platelet aggregates, and spontaneous platelet aggregation. *Blood* 1985; 66: 282–286.
36. Jackson S.C., Sinclair G.D., Cloutier S., Duan Z., Rand M.L., Poon M.-C. The Montreal platelet syndrome kindred has type 2B von Willebrand disease with the vWF V1316M mutation. *Blood* 2009; 113: 3348–3351.
37. 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.
38. Weiss H.J., Sussman I.I. A new von Willebrand variant (type I, New York) increased ristocetin-induced platelet aggregation and plasma von Willebrand factor containing the full range of multimers. *Blood* 1986; 68: 149–156.
39. Takimoto Y., Imanaka F. Type 2B Hiroshima: a variant of von Willebrand disease characterized by chronic thrombocytopenia and the presence of all von Willebrand factor multimers in plasma. *Int. J. Hematol.* 1999; 70: 127–131.
40. Baronciani L., Federici A.B., Beretta M., Cozzi G., Canciani M.T., Mannucci P.M. Expression studies on a novel type 2B variant of the von Willebrand factor gene (R1308L) characterized by defective collagen binding. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3: 2689–2694.
41. Casonato A., Sartorello F., Pontara E. i wsp. A novel von Willebrand factor mutation (I1372S) associated with type 2B-like von Willebrand disease: an elusive phenotype and a difficult diagnosis. *Thromb. Haemost.* 2007; 98: 1182–1187.

42. James P.D., Lillicrap D., Mannucci P.M. Alloantibodies in von Willebrand disease. *Blood* 2013; 122: 636–640.
43. Baaij M., van Galen K.P.M., Urbanus R.T., Nigten J., Eikenboom J.H.C., Schutgens R.E.G. First report of inhibitory von Willebrand factor alloantibodies in type 2B von Willebrand disease. *Brit. J. Haematol.* 2015; 171: 424–439.
44. Drouin J., Lillicrap D.P., Izaguirre C.A. Absence of a bleeding tendency in severe acquired von Willebrand's disease. The role of platelet von Willebrand factor in maintaining normal haemostasis. *Am. J. Clin. Pathol.* 1989; 92: 471–478.
45. Shigekiyo T., Sekimoto E., Shirakami A. i wsp. Type 2B-like acquired von Willebrand syndrome. *Int. J. Hematol.* 2011; 94: 410–412.
46. Karger R., Weippert-Kretschmer M., Budde U., Kretschmer V. Diagnosis and therapeutic management in a patient with type 2B-like acquired von Willebrand syndrome. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2011; 22: 144–147.
47. Scepansky E., Othman M., Smith H. Acquired von Willebrand Syndrome with a type 2B phenotype: Diagnostic and therapeutic dilemmas. *Acta Haematol.* 2014; 131: 213–217.
48. Ulrichs H., Harsfalvi J., Bene L. i wsp. A monoclonal antibody directed against human von Willebrand factor induces type 2B-like alterations. *J. Thromb. Haemost.* 2004; 2: 1622–1628.
49. Depraetere H., Aizenberg N., Girma J.P. i wsp. Platelet aggregation induced by a monoclonal antibody to the A1 domain of von Willebrand factor. *Blood* 1998; 91: 3792–3799.
50. Hamilton A., Ozelo M., Leggo J. i wsp. Frequency of platelet type versus type 2B von Willebrand disease. An International registry-based study. *Thromb. Haemost.* 2011; 105: 501–508.
51. Othman M. Platelet-type von Willebrand disease: A rare, often misdiagnosed and underdiagnosed bleeding disorder. *Semin. Thromb. Hemost.* 2011; 37: 464–469.
52. Zdziarska J., Chojnowski K., Klukowska A. i wsp. Postępowanie w chorobie von Willebranda. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów 2008. *Med. Prakt.* 2008; 12: 1–24.
53. Laffan N., Brown S.A., Collins P.W. i wsp. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors Organization. *Haemophilia* 2004; 10: 199–217.
54. Favalaro E.J., Laboratory identification of von Willebrand disease: Technical and Scientific Perspectives. *Semin. Thromb. Hemost.* 2006; 32: 456–471.
55. Enayat M.S., Guilliatt A.M., Lester W., Wilde J.T., Williams M.D., Hill F.G.H. Distinguishing between type 2B and pseudo-von Willebrand disease and its clinical importance. *Br. J. Haematol.* 2006; 133: 664–666.
56. Frontrath J.P., Hepner M., Sciuccati G., Torres A.F., Pieroni G., Bonduel M. Prospective study of low-dose ristocetin-induced platelet aggregation to identify type 2B von Willebrand disease (VWD) and platelet type vWD in children. *Thromb. Haemost.* 2010; 104: 1158–1165.
57. Favalaro E.J. Phenotypic identification of platelet-type von Willebrand disease and its discrimination from type 2B von Willebrand disease: A Question of 2B or not 2B? A story of nonidentical twins? Or two sides of a multidominational or multifaceted primary- hemostasis coin? *Semin. Thromb. Hemost.* 2008; 34: 113–127.
58. Flood V.H., Gill J.C., Morateck P.A. i wsp. Gain of function GPIb ELISA assay for VWF activity in the Zimmerman Program for the Molecular and Clinical Biology of VWD. *Blood* 2011; 117: 74.