

Choroba von Willebranda typu płytkowego (PT-VWD) — epidemiologia, podłoże molekularne, diagnostyka

Platelet-type von Willebrand disease (PT-VWD) — epidemiology, molecular basis, diagnosis

Ksenia Bykowska¹, Bernardeta Ceglarek²

¹Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

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

Streszczenie

Choroba von Willebranda typu płytkowego (PT-VWD) dziedziczy się autosomalnie dominująco. Jest ona spowodowana mutacjami genu glikoproteiny GP Iba, receptora dla czynnika von Willebranda na płytkach krwi. Paradoksalnie mutacje genu GPIbα w PT-VWD zwiększają, a nie zmniejszają powinowactwo GPIbα do czynnika von Willebranda (VWF). Podczas gdy choroba von Willebranda (VWD) jest najczęściej występującą skazą krwotoczną i dotyczy około 1% ogólnej populacji, to płytkowa choroba von Willebranda (PT-VWD, pseudo VWD) występuje sporadycznie. Opisano dotąd 55 osób z tym defektem. U chorych z PT-VWD skaza krwotoczna jest zróżnicowana od łagodnej do umiarkowanej, niezależnie od płci i wieku pacjenta. Zagrożające życiu krwawienia mogą się pojawić w przebiegu infekcji, ciąży, po zabiegach chirurgicznych. Fenotypowo PT-VWD przypomina chorobę VWD typu 2B, ale etiologia tych dwóch chorób jest różna. W każdym przypadku rozpoznania VWD 2B konieczne jest wykonanie dodatkowych badań różnicujących VWD 2B i PT-VWD, aby potwierdzić rozpoznanie i wybrać właściwy sposób leczenia.

Słowa kluczowe: płytkowa choroba von Willebranda, czynnik von Willebranda, glikoproteina Iba, obraz fenotypowy, ocena laboratoryjna

J. Transf. Med. 2017; 10: 138–148

Summary

Platelet type von Willebrand disease (PT-VWD) is an autosomal dominant bleeding disorder that results from a glycoprotein GPIbα gene mutations, platelet von Willebrand factor receptor. Paradoxically, GPIbα mutations in PT-VWD do not decrease but significantly increase affinity of abnormal platelet GPIbα to von Willebrand factor (VWF).

While the von Willebrand disease (VWD) is a common bleeding disorder with a prevalence of approximately 1% in the general population, platelet type von Willebrand disease (PT-VWD, pseudo VWD) appears sporadically and up to date only 55 such cases have been described. Patients with PT-VWD present mild to moderate bleeding, regardless of age and gender. Life threatening bleedings can appear in stressful conditions such as infection, pregnancy or surgi-

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, e-mail: kbykowska@ihit.waw.pl

cal procedures. PT-VWD phenotype resembles VWD 2B but their etiology differs.

So each case of VWD 2B diagnosis requires comprehensive laboratory discrimination between VWD 2B and PT-VWD for confirmation and introduction of adequate treatment.

Key words: platelet type von Willebrand disorder, von Willebrand factor, glycoprotein Iba, phenotypic profiles, laboratory assessment

J. Transf. Med. 2017; 10: 138–148

Wstęp

Fizjologiczną ochronę przed krwawieniami zapewnia adhezja płytek krwi do miejsca uszkodzenia naczyń i utworzenie czopu płytkowego hamującego wypływ krwi. W adhezji, obok białek receptorowych płytek krwi (GPIb-IX-V, GPIa/IIa, GP VI), biorą udział białka osocza (głównie czynnik von Willebranda) i ściany naczyniowej, takie jak: kolagen, laminina, fibronektyna, trombospondyna, witronektyna. W naczyniach o niskim gradiencie szybkości najważniejszą rolę odgrywają receptory płytkowe GPIa/IIa i GP VI bezpośrednio wiążące płytki do podśródbłonkowego kolagenu.

W naczyniach o wysokim gradiencie szybkości przepływu krwi, takich jak: tętnice, drobne naczynia czy też zwężone chorobowo naczynia, najważniejszą rolę odgrywa interakcja VWF i płytkowego receptora GP Iba-Ibβ-IX-V [1–6].

Czynnik von Willebranda

Czynnik von Willebranda (VWF, *von Willebrand factor*) odgrywa kluczową rolę w hemostazie pierwotnej i w krzepnięciu krwi [2–5]. W hemostazie pierwotnej bierze on udział w adhezji i agregacji płytek krwi. W procesie krzepnięcia wiąże on i stabilizuje czynnik VIII, chroniąc go przed proteolityczną degradacją.

Czynnik von Willebranda jest adhezyjną glikoproteiną o strukturze multimerycznej i ciężarze cząsteczkowym wynoszącym 500–10 000 kDa. W osoczu występują multimery niskocząsteczkowe o ciężarze 500–2500 kDa (LMWM, *low molecular weight multimers*), średnicząsteczkowe — 3000–5000 kDa (IMWM, *intermediate molecular weight multimers*), wielkocząsteczkowe — 5500–10 000 kDa (HMWM, *high molecular weight multimer*). W ciałkach Weibel-Palade i ziarnistościach α są magazynowane tak zwane ultra duże multimery VWF (ULVWF, *ultra large von Willebrand factor*) o masie > 20 000 kDa, bardzo trombogenne, o wysokim powinowactwie do GP Iba, niewystępujące w krążeniu w warunkach fizjologicznych [7, 8].

W procesie krzepnięcia krwi (funkcja nośnika dla czynnika VIII) biorą udział wszystkie multimery

(LMWM, IMWM i HMWM), natomiast w hemostazie pierwotnej (adhezja i agregacja płytek krwi) głównie IMWM i HMWM, przy czym HMWM wykazuje znacznie większe powinowactwo do płytek krwi niż IMWM [6–9]. Mała aktywność adhezyjna LMWM jest spowodowana tym, że w multimerach o małej masie cząsteczkowej znacznie trudniej niż w multimerach wielkocząsteczkowych dochodzi do zmian konformacyjnych cząsteczki pod wpływem sił ścinania i w związku z tym są one bardziej odporne na odsłanianie miejsc wiązania receptorów płytkowych [8]. Redukcja lub brak HMWM spowodowane defektem multimeryzacji lub zwiększoną aktywnością metaloproteazy ADAMTS13 (*A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 motif, member 13*), degradującej VWF do mniejszych fragmentów, może być przyczyną choroby von Willebranda (VWD 2A) [7, 10, 11].

Synteza VWF odbywa się w komórkach śródbłonka i megakariocytach [12, 13] pod kontrolą genu (180 kb) zbudowanego z 52 eksonów, znajdującego się na krótkim ramieniu chromosomu 12 [14]. Prekursorowy VWF (pre-pro-VWF, 2813 aminokwasów) jest zbudowany z peptydu sygnałowego (pre-, 22 aminokwasów), propeptydu (pro-, 741 aminokwasów) i monomeru VWF o masie 2050 aminokwasów, zbudowanego z wielu domen D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK, z których każda odgrywa ważną rolę w hemostazie. Po odrzuceniu peptydu sygnałowego w retikulum endoplazmatycznym monomery wiążą się głowa do głowy „head to head” wiązaniami disiarczkowymi, tworząc dimery (500 kDa). W kolejnym etapie, w aparacie Golgiego — dimery ulegają multimeryzacji, wiążąc się koniec do końca („tail to tail”). Następnie od multimetrów zostaje odłączony propeptyd (pro-, VWFpp) kierujący procesem multimeryzacji. Po proteolizie VWFpp pozostaje związany niekwalencyjnie z VWF i razem są one magazynowane w ziarnistościach α megakariocytów/płytek i ciałkach Weibel-Palade komórek śródbłonka. Dotychczas uważano, że po uwolnieniu z ziarnistości w warunkach fizjologicznego pH, kompleks VWF-VWFpp dysocjuje i pojawia się w krążeniu w stechiometrycznym stosunku 1:1.

Obecnie Madabhushi i wsp. [15] wykazali, że frakcja VWF i VWFpp również w krążeniu tworzy kompleks (VWFpp-D-D3-VWF), a interakcja VWFpp i domeny D'D3 VWF jest ważnym mechanizmem regulującym proces hemostazy. Redukuje ona dostępność domeny A1 VWF dla płytkowej GPIIb α i ogranicza proteolizę VWF przez ADAMTS13.

W poszczególnych domenach monomeru VWF znajdują się miejsca odpowiedzialne za wiązanie się czynnika VWF do kolagenu i receptorów płytkowych, a także innych komponent macierzy pozakomórkowej, takich jak: heparany, sulfatydy, proteoglikany. W domenie A1 znajduje się miejsce wiązania GPIIb α , heparyny, w domenie A1 i A3 — kolagenu. Domena C1 zawiera sekwencje Arg-Gly-Asp (RGD) odpowiedzialną za wiązanie VWF z płytkową integryną IIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$) [16].

Część syntetyzowanego w komórkach śródbłonna VWF jest w sposób ciągły uwalniana do krążenia (LMWM, IMWM i HMWM), a część jest magazynowana w ziarnistościach Weibel-Palade komórek śródbłonna (ULVWF). Czynniki von Willebranda syntetyzowane w megakariocytach jest w całości magazynowany w ziarnistościach α płytek krwi (ULVWF). Uwalnianie ULVWF do krwioobiegu może następować po fizjologicznej lub patologicznej stymulacji [17, 18]. Aktywowane komórki śródbłonna uwalniają ULVWF i na swojej powierzchni eksponują P-selektynę. ULVWF wiąże się z P-selektyną i na powierzchni śródbłonna tworzą strukturę wyciągniętego włókna. Zmiana konformacji VWF powoduje odsłonięcie domeny A1 VWF wiążącej receptor płytkowy GPIIb α i domeny A2 — miejsca degradacji VWF przez metaloproteazę ADAMTS13. Wiązanie ULVWF z P-selektyną potwierdzają badania Padilla i wsp. [19], którzy udowodnili, że przeciwciała skierowane przeciwko P-selektynie, a także rozpuszczona P-selektyna hamują powstawanie długich włókien ULVWF. ULVWF są bardzo trombogene i uwalniane bezpośrednio do osocza mogą spontanicznie agregować płytki krwi, powodując zakrzepicę [20–22]. Tworzeniu się zakrzepów zapobiega proteoliza uwalnianego ULVWF przez metaloproteazę ADAMTS13 do fragmentów o mniejszej cząsteczce i mniejszym potencjale trombogenicnym [23]. Miejsce degradacji VWF przez ADAMTS13 w domenie A2 jest niedostępne w warunkach fizjologicznych, a jego ekspozycja jest regulowana przez szybkość przepływu krwi i interakcję z płytkami [24, 25]. Fragmenty ULVWF powstające po degradacji przez ADAMTS13 są uwalniane do osocza. Ponieważ nie podlegają one już tak silnym napięciom, ponownie tworzą strukturę, w której miejsce degradacji przez

ADAMTS13 jest mało dostępne, co ogranicza ich dalszą proteolizę. Niedobór ADAMTS13, powodując wzrost stężenia wielocząsteczkowych multimetrów, może być podłożem zakrzepowej plamicy małopłytkowej (TTP) [26, 27].

W warunkach fizjologicznych osoczowy czynnik VWF występuje w postaci nieaktywnej. Jego cząsteczka ma wygląd luźno zwiniętego kłęбка wełny [28]. Domena VWF-A1 jest niedostępna, zasłonięta przez domenę VWF D'D3 [29, 30]. W takiej formie VWF może wiązać czynnik VIII (VIII:C), nie wykazując jednocześnie zwiększonego powinowactwa do płytek krwi. W momencie związania VWF (domena A3) z podśródbłonkowym kolagenem uszkodzonego naczynia, pod wpływem wysokich sił ścinania ($500\text{--}800\text{ s}^{-1}$) a *in vitro* pod wpływem aktywacji przez rystocetynę czy botrocetynę, następują zmiany konformacyjne w cząsteczce VWF. Globularne multimery zmieniają się do formy fibrylarnej („stretched”), tworząc długie włókna i odsłaniając domenę A1 — miejsce wiązania z GPIIb α [25, 31–33] i domenę A2 – w której znajduje się wiązanie Tyr1605-Met1606 degradowane przez metaloproteazę ADAMTS13. Degradacja przez ADAMTS13 powoduje pojawianie się w krążeniu multimetrów o masie do 10 000 kDa i mniejszym powinowactwie do GPIIb α . Proteoliza VWF przez ADAMTS 13 jest regulowana przez siły ścinania [18, 34, 35], czynnik VIII, płytki [34, 35], a także przez trombospondynę-1 (TSP-1) [7, 36]. Wrodzone lub nabyte niedobory ADAMTS13 są przyczyną zakrzepowej plamicy małopłytkowej [26].

Receptor GPIIb-IX-V

Receptor płytkowy GP Ib-GPIX-GPV występuje na płytkach „spoczynkowych”. W interakcji z VWF uczestniczy w inicjacji adhezji i agregacji płytek w naczyniach o wysokim gradiencie szybkości przepływu krwi [37, 38]. Wiąże się nie tylko z VWF, ale także z Mac-1 na neutrofilach i P-selektyną na komórkach śródbłonna i aktywowanych płytkach krwi. Ligandami dla receptora GP Ib-GPIX-GPV są również czynniki krzepnięcia (α -trombina, czynniki XI, XIIa) i wysokocząsteczkowy kininogen [37].

Receptor GPIIb-GPIX-GPV jest zbudowany z czterech niezależnych przezbłonowych podjednostek: GPIIb α -GPIIb β -GPIX-GPV, należących do rodziny białek bogatych w leucynę, występujących w stosunku stechiometrycznym 2:4:2:1 [39–41]. W skład GPIIb wchodzi dwie podjednostki α i 4 β syntetyzowane pod kontrolą dwóch różnych genów [37, 40–42]. Każda podjednostka GP Ib α wiąże 2 podjednostki GPIIb β wiązaniem disiarczkowym,

natomiast podjednostki GPV i IX są związane z GP Ib wiązaniem niekowalencyjnym. Na płytce znajduje się około 25 000 kopii GPIb-IX i około 12 000 GPV. GP V łączy się z GPIb-IX przez łańcuch GPIb(α). Miejsce wiązania VWF znajduje się w podjednostce GPIb α .

Glikoproteina GPIb α

Synteza GP Ib α odbywa się pod kontrolą genu znajdującego się na chromosomie 17. W 1987 roku został on sklonowany przez Lopeza i wsp [43]. Glikoproteina Ib α jest największą komponentą (610 aminokwasów, 135 kDa) receptora GPIb α -GPIb β -IX-V. Jest ona zbudowana z czterech funkcjonalnych obszarów: w N-końcu z domeny o masie 45 kDa wiążącej VWF zbudowanej z około 300 aminokwasów, makropeptydu oddzielającego domenę wiążącą VWF od błony osoczowej, domeny transbłonowej i zbudowanej z 97 aminokwasów domeny cytoplazmatycznej, wiążącej kompleks GPIb-IX-V do cytoszkieletu. W GPIb α znajdują się trzy domeny odpowiedzialne z interakcją z VWF. Są to: N-końcowa pętla disiarczkowa i sąsiadujące z nią podjednostki bogate w leucynę (His1-Ala 200), C-końcowy obszar disiarczkowy (Phe201-Gly268) i anionowa sekwencja z sulfonowaną tyroziną, Asp269-Glu282. Wiązanie VWF do GPIb α aktywuje płytki krwi, indukuje ich degranulację, uwalnianie płytkowych agonistów, takich jak: ADP, powoduje wzrost stężenia Ca²⁺ w cytosolu i reorganizację białek cytoszkieletu. Wiązanie GPIb α -VWF ma szczególne znaczenie w naczyniach z wysokim gradientem przepływu większym niż 500-800s⁻¹. Albowiem tylko takie wiązanie jest w stanie w tych warunkach inicjować proces adhezji.

Łańcuch GPIb α zawiera miejsca wiązania P-selektyny, Mac-1, czynników krzepnięcia (α trombiny, czynnika XI i XII) oraz wysokocząsteczkowego kininogenu. Łącząc się z VWF-A1, glikoproteina Ib α aktywuje jednocześnie receptor GPIIb-IIIa (α Ib β 3) biorący udział w agregacji płytek krwi [44].

Interakcja GPIb α i VWF

W warunkach fizjologicznych istnieją mechanizmy zapobiegające adhezji płytek do ściany naczynia. Krążący we krwi VWF ma formę globularną i dzięki interakcji domen A1-D'D3 nie ma zdolności wiązania GPIb α . Gdy zostaje przerwana ciągłość naczyń w wyniku urazu, zabiegu chirurgicznego lub zmian chorobowych, w miejscu uszkodzenia naczynia dochodzi do kontaktu płytek z białkami podścieliska naczynia, takimi jak: kolagen, fibronektyna, trombospondyna, laminina czy witronektyna. Wiązanie liganda powoduje aktywację płytek,

odsłonięcie innych receptorów, również wiążących VWF i kolagen, wzmacniając w ten sposób proces adhezji i stymulując agregację płytek z udziałem receptora GPIIb-IIIa i fibrynogenu. Aktywowane płytki odsłaniają na swej powierzchni fosfolipidy biorące udział w procesie krzepnięcia, takie jak fosfatydyloseryna i fosfatydyloetanolamina, i uruchamiają kaskadę krzepnięcia krwi, tworząc stabilny czop płytkowy.

Adhezja płytek krwi do podścieliskowego kolagenu w naczyniach o niskim gradiencie przebiega z udziałem przede wszystkim receptorów bezpośrednich, takich jak glikoproteina VI (GP VI) i receptor α 2 β 1 (GPIa-IIa), natomiast udział receptora GPIb-IX-V jest znacznie mniejszy [40]. W naczyniach o wysokim gradiencie prędkości jedynie interakcja kolagenu — VWF-A1 — GP Ib α jest wystarczająco silna, aby inicjować adhezję płytek krwi [39, 40].

Wiążąc się z kolagenem, w warunkach wysokiej siły jonowej, VWF ulega zmianom konformacyjnym. Zostaje odsłonięta w cząsteczce VWF domena A1, przez którą VWF wiąże się z receptorem płytkowym GP Ib α . Wiązanie to ulega na przemian asocjacji i dysocjacji, powodując zwolnione, skokowe przemieszczanie się płytek wzdłuż włókien VWF [40, 45–47]. Stabilne wiązanie (adhezja) płytek wymaga wytworzenia wiązań między podścieliskowym kolagenem i płytkowymi receptorami bezpośrednimi: glikoproteiną VI (GPVI) i integryną GPIa/IIa (α 2 β 1). Integryna GPVI jest białkiem rodziny immunoglobulin odsłanianym jedynie na płytkach i megakariocytach. Jest białkiem sygnałowym aktywacji α 2 β 1 i α Ib β 3. Integryna α 2 β 1 (GPIa/IIa) występuje na płytkach w ilości 2000–4000 kopii i jest bezpośrednim receptorem dla kolagenu [48].

Kontrola wiązania pomiędzy VWF i płytkowym receptorem glikoproteiną GP Ib α jest kluczowym elementem układu regulującego zarówno hemostazę, jak i patologiczną zakrzepicę.

Choroba pseudo-von Willebranda (PT-VWD)

Płytkowa choroba von Willebranda jest chorobą uwarunkowaną genetycznie, spowodowaną mutacjami w genie receptora płytkowego GPI α [49–53]. Początkowo nazywano ją rzekomą chorobą von Willebranda (*pseudo-von Willebrand's disease*) [54], a następnie płytkową chorobą von Willebranda (PT-VWD, *platelet-type von Willebrand's disease*) [49].

Chociaż pacjentów identycznych fenotypowo z PT-VWD opisywano już w latach 1980/1981 (Takahashi i wsp.) [55, 56], to za pierwsze publikacje definiujące tę chorobę uznaje się publikację Weissa

i wsp. z 1982 roku [54]. Najpierw Weiss i wsp. [54], a następnie Miller i Castella [49] opisali pacjentów pochodzących z dwóch rodzin, u których rozpoznano PT-VWD. Klinicznie choroba objawiała się łagodną skazą krwotoczną, natomiast laboratoryjnie: umiarkowaną małopłytkowością, obniżeniem aktywności czynnika VIII (VIII:C), obniżeniem antygeny VWF w osoczu i prawidłowym VWF w płytkach krwi, brakiem wielkocząsteczkowych multimetrów (HMWM/VWF) i wzmożoną aglutynacją pod wpływem niskich stężeń rystocetyny (test RIPA, *platelet induced ristocetin agglutination*). Klinicznie i laboratoryjnie PT-VWD przypominała chorobę VWD typu 2B.

Pierwsze międzynarodowe badania nad PT-VWD zostały podjęte w 2007 roku pod egidą *Scientific and Standardization Committee of International Society on Thrombosis and Haemostasis* (VWF-SSC-ISTH) [57, 58]. Zaproponowano wówczas stworzenie międzynarodowego projektu dotyczącego PT-VWD z centrum w Kanadzie. Projekt ten miał na celu stworzenie rejestru chorych i wdrożenie badań nad tą chorobą. Miał odpowiedzieć na pytanie, czy PT-VWD jest to choroba rzadka, w jakim stopniu jest źle diagnozowana i jak często jest mylona z VWD 2B. Projekt został zakończony w 2010 roku, a jego wyniki zostały opublikowane w 2011 roku. Rejestr chorych z PT-VWD dostępny na stronie www.pt-vwd.org obejmował w 2016 roku — 55 osób, w tym 17 mężczyzn i 38 kobiet [57].

Częstość występowania

Podczas gdy VWD jest najczęściej występującą skazą krwotoczną i dotyczy około 1% ogólnej populacji [59, 60], PT-VWD występuje bardzo rzadko [61]. W piśmiennictwie światowym opisano dotychczas zaledwie 55 osób z tym defektem. Tak mała liczba zdiagnozowanych chorych może być spowodowana również tym, że PT-VWD jest często mylona z VWD 2B. Podobieństwo obrazu klinicznego i laboratoryjnego VWD 2B i PT-VWD, a także trudności w ich różnicowaniu spowodowane koniecznością zastosowania metod możliwych do wykonania jedynie w wysokospecjalistycznych laboratoriach powodują, że PT-VWD jest często mylona z VWD 2B. Na podstawie badań wykazano, że VWD 2B występuje u około 5–10% ogółu chorych z VWD, a PT-VWD stanowi około 15% przypadków rozpoznawanych jako VWD 2B [59–61]. Zróżnicowanie PT-VWD i VWD 2B ma ogromne znaczenie kliniczne, ponieważ postępowanie lecznicze jest inne w PT-VWD i w VWD 2B [62–64].

Podłoże genetyczne

PT-VWD, podobnie jak VWD 2B, dziedziczy się autosomalnie dominująco. Jednak w przeciwieństwie do VWD 2B, w której defekt dotyczy genu czynnika von Willebranda, PT-VWD jest spowodowana mutacjami punktowymi genu glikoproteiny płytkowej GP Iba. Podobnie jak w VWD 2B, mutacje sprawcze w PT-VWD są mutacjami „gain of function”, powodującymi zwiększenie wiązania GPIba z VWF i zwiększenie agregacji płytek krwi pod wpływem niskich stężeń rystocetyny (test L-RIPA). Powstające w krążeniu kompleksy płytki-GPIba-VWF są usuwane z krążenia przez układ siateczkowo-śródbłonkowy, powodując skazę krwotoczną.

Pierwszy defekt genetyczny odpowiedzialny za PT-VWD scharakteryzowano w 1991 roku [65], 4 lata po sklonowaniu GPIba [43]. Była to mutacja Gly233Val opisana najpierw w 1991 roku przez Millera i wsp. [65], a następnie w 1997 roku przez Russella i Rotha [66]. Wszystkie opisane w PT-VWD mutacje [30, 54, 65, 67–78], z wyjątkiem delecji 27-bp [79] znajdują się w obszarze makropeptydu GPIba, wiążącym VWF-A1 (tab. 1).

Objawy kliniczne

Fenotypowo choroba PT-VWD przypomina chorobę von Willebranda typu 2B. Utrudnia to jej zdiagnozowanie, od którego zależy wdrożenie prawidłowego leczenia. Choroba von Willebranda typu płytkowego może być mylona nie tylko z VWD 2B, ale także z małopłytkowością samoistną, alloimmunologiczną małopłytkowością noworodków, a także małopłytkowością ciężarnych o nieznannej etiologii [78]. Jak sugeruje Sanchez-Luceros i wsp. [79], PT-VWD powinna być brana pod uwagę u dzieci poniżej 1. roku życia, nawet wtedy gdy rodzice są prawidłowi fenotypowo. U chorych z PT-VWD płytki są hiperaktywne, spontanicznie wiążą HMWM VWF i w kompleksie z VWF są one usuwane z krążenia, powodując trombocytopenię i skazę krwotoczną. Krwawienia nasilają się po podaniu aspiryny lub innych leków przeciwplateletowych. Podobnie jak u chorych z VWD 2B, małopłytkowość może się nasilać w warunkach zwiększonego uwalniania VWF (ciąża, poród, stres, infekcje) [50].

Podobnie jak w typie VWD 2B, u pacjentów z PT-VWD występuje skaza krwotoczna o różnym nasileniu, zazwyczaj od łagodnej do umiarkowanej [80–84] (tab. 2). Na podstawie badań retrospekcyjnych przeprowadzonych u chorych z PT-VWD i VWD 2B, Kaur i wsp. [81] wykazali, że skaza krwotoczna w PT-VWD w porównaniu z VWD 2B

Tabela 1. Podłoże genetyczne PT-VWD (www.pt-vwd.org)**Table 1.** Genetic basis of PT-VWD (www.pt-vwd.org)

| | Defekt genetyczny | | Publikacja |
|----------|--------------------|--------------------------------|--|
| | Zamiana nukleotydu | Zamiana aminokwasu | |
| Mutacje | G > T 3805 | Trp246Leu (Trp230Leu) | Woods i wsp. [70] |
| | | G > T 746 | Gly 249 Val (Gly233Val) |
| | G > T 793 | Asp 251 Tyr (Asp235 Tyr) | Enayat i wsp. [75] |
| | A > G 763 | Met 255 Val (Met 239 Val) | Russell, Roth [66] Weiss i wsp. [54] Takahashi i wsp. [76] Giannini i wsp. [77] *Acharya S. (2014) |
| | G > A 765 | Met 255Ile | Lavenu-Bombled i wsp. [71] |
| DELECCJA | 1306 del 27 | 436-444 del 9 (420_428 del) | Othman i wsp. [78] |

W nawiasach podano starą nomenklaturę, *tylko zgłoszona do rejestru

Tabela 2. Objawy kliniczne w PT-VWD i VWD 2B [79–84]**Table 2.** Clinical symptoms In PT-VWD and VWD 2B [79–84]

| Objawy kliniczne | PT-VWD | VWD 2B |
|---|--------|--------|
| Łagodna lub umiarkowana skaza krwotoczna | + | + |
| Krwawienia skórno-śluzówkowe | + | + |
| Krwawienia z nosa | + | + |
| Krwawienia po ekstrakcji zębów | + | + |
| Krwawienia po wycięciu migdałków podniebiennych | + | + |
| Ciężkie krwawienia miesięczne | + | + |
| Ryzyko zagrażających życiu krwawień po zabiegach chirurgicznych i/lub po porodzie | + | + |
| Nasilenie skazy krwotocznej po lekach przeciwplatekcyjnych | + | + |

jest w większości przypadków łagodniejsza, a indeks krwotoczny (BS, *bleeding score*) niższy.

U chorych z PT-VWD zagrażające życiu krwawienia pojawiają się rzadko [70], najczęściej po zabiegach chirurgicznych czy po porodzie [79, 82, 83]. Ciężką skazę krwotoczną u pacjenta z PT-VWD opisała Woods i wsp. [70]. Był to chory z mutacją G > T (W246L) w nukleotydzie 3805 genu GPIIb α , z małopłytkowością, z obecnością wielkich płytek wykazujących spontaniczną agregację, u którego badania laboratoryjne wykazały: dodatni test L-RIPA (rystocetyna 0,3–0,4 mg/ml);

iloraz VWF:RC₀/VWF:Ag < 0,2; prawidłowy iloraz VWFpp/VWF:Ag; dodatni wynik testu „RIPA w mieszaninie” i dodatni wynik testu z krioprecypitatem.

Charakterystyka laboratoryjna

Diagnostyka PT-VWD i jej różnicowanie z VWD 2B jest trudne, wieloetapowe i możliwe do wykonania jedynie w wysokospecjalistycznych laboratoriach. Rozpoznanie PT-VWD utrudnia jej fenotypowe podobieństwo do typu 2B VWD, z którym jest często mylona (tab. 3). Obie choroby,

Tabela 3. Wyniki badań laboratoryjnych w PT-VWD i VWD 2B**Table 3.** Laboratory results in PT-VWD and VWD 2B

| | PT-VWD | VWD 2B |
|---|--------|--------|
| Dziedziczenie autosomalne dominujące | + | + |
| Podłoże: mutacje „gain of function” | + | + |
| Mutacje genu GP Iba | + | - |
| Mutacje genu VWF ekson 28 | - | + |
| Łagodna, rzadko ciężka małopłytkowość, obecność wielkich płytek (macrocytoza), zlepy płytkowe w rozmazie, przedłużony czas krwawienia | + | + |
| Nasilanie się małopłytkowości w warunkach zwiększonego uwalniania endogennego VWF (ciąża, stres, infekcja) | + | + |
| Niedobór HMWM | + | + |
| Obniżony/nieznacznie obniżony/często prawidłowy czynnik VIII (VIII:C) | + | + |
| Obniżony/nieznacznie obniżony/często prawidłowy antygen VWF (VWF:Ag) | + | + |
| Niska aktywność kofaktora rystocetyny (VWF:RCo) | + | + |
| VWF:RCo/VWF:Ag < 0,6 | + | + |
| Zwiększona agregacja pod wpływem rystocetyny 0,5–0,7 mg/ml | + | + |
| Agregacja w obecności krioprecypitatu | + | - |

PT-VWD i VWD 2B, są także często mylone z idiopatyczną małopłytkowością (ITP). Pomimo fenotypowego podobieństwa, PT-VWD i VWD 2B różnią się podłożem molekularnym. W PT-VWD skaza krwotoczna jest spowodowana mutacjami genu płytkowej glikoproteiny Iba, natomiast w VWD 2B — mutacjami w eksonie 28 genu VWF. Zarówno mutacje cząsteczki GPIb, jak i VWF powodują paradoksalnie nie obniżenie, ale wzrost powinowactwa płytki — czynnik VWF, co powoduje, że agregacja płytek zachodzi pod wpływem podprogowych stężeń agonistów (L-RIPA) lub nawet spontanicznie bez żadnej stymulacji. Powstające kompleksy PT-VWD-płytki i VWD 2B-płytki są szybko usuwane z krążenia, powodując małopłytkowość. Może się ona nasilać w warunkach zwiększonego uwalniania VWF, takich jak ciąża, stres czy infekcje [50, powodując krwawienia. Należy jednak pamiętać, że brak małopłytkowości nie wyklucza ani PT-VWD ani VWD 2B [75]. Wyniki badań laboratoryjnych w PT-VWD i VWD 2B przedstawiono w tabeli 3.

Mechanizm pojawiania się krwawień w PT-VWD może być nieco inny w PT-VWD niż w VWD 2B. Sugerują to badania Woods i wsp. [70], którzy po raz pierwszy oznaczyli stężenie propeptydu VWF (VWFpp) u pacjenta z PT-VWD (Try246Leu). Okazało się, że w przeciwieństwie do chorych z VWD 2B (skrócony czas przeżycia, podwyższone stężenie VWFpp i iloraz VWFpp/VWF:Ag) u pacjenta z PT-VWD stężenie VWFpp i iloraz VWFpp/VWF były prawidłowe.

Testy diagnostyczne różnicujące PT-VWD i VWD 2B

Opracowano wiele testów pozwalających na różnicowanie PT-VWD i VWD 2B:

- **Agregacja płytek pod wpływem niskich stężeń rystocetyny, L-RIPA** [84, 85]. Badanie wykonuje się w osoczu bogatopłytkowym, stymulując agregację niskimi stężeniami rystocetyny (0,3–0,7 mg/ml, w zależności od laboratorium);
- **Agregacja z krioprecypitatem** [73, 84, 86, 87]. Badanie opracowano w 1984 roku [57]. Polega ono na wykonaniu agregacji płytek krwi po dodaniu krioprecypitatu. Obecność agregacji oznacza PT-VWD, natomiast brak agregacji — VWD 2B. Jak wykazał Favalaro [84], różnicowanie 2B VWD i PT VWD za pomocą testu z krioprecypitatem daje około 10% fałszywych wyników;
- **Test RIPA w mieszaninie** [50, 84, 86]. Po raz pierwszy test ten został opisany przez Favalaro i wsp. [84] w 2008 roku. Badanie wykonuje się w mieszaninach osocza ubogopłytkowego (PPP) pacjenta lub dawcy i zawiesiny płytek chorego lub dawcy w kilku kombinacjach: płytki pacjenta/osocze pacjenta, płytki pacjenta/osocze dawcy, płytki dawcy/osocze dawcy, płytki dawcy/osocze pacjenta. Przemyte płytki PT-VWD (w przeciwieństwie do VWD 2B) agregują przy niskim stężeniu rystocetyny w mieszaninie z osoczem prawidłowym,

natomiast przemyte płytki dawcy agregują w mieszaninie z osoczem 2B VWD (lecz nie PT-VWD);

- **Cytometria przepływowa** [78]. Wiązanie VWF do płytek krwi pod wpływem rystocetyny wykonywano na świeżych autologicznych lub formalizowanych płytkach krwi dawców przy użyciu markerów fluorescencyjnych;

Analiza genetyczna — złotym standardem w diagnostyce PT-VWD są badania DNA, ale niestety są one mało dostępne. Analizując dane molekularne, należy także pamiętać, że brak mutacji nie wyklucza ani VWD 2B ani PT-VWD. Jak wynika z międzynarodowych badań u 24% chorych, u których zdiagnozowano VWD 2B, nie wykryto mutacji ani w genie GPIb α ani w genie czynnika von Willebranda [53, 61, 73].

Leczenie

Leczenie chorych z PT-VWD polega przede wszystkim na podawaniu koncentratów płytkowych [78, 80]. Generalnie PT-VWD jest przeciwwskazaniem do stosowania DDAVP, ponieważ powoduje ona uwalnianie największych multimerów VWF z komórek śródbłonna i może pogłębiać małopłytkowość. Jednak Sanchez i wsp. [79] opisali przypadki pacjentów z PT-VWD, u których z powodzeniem podawano zarówno niskie dawki VWF, jak i DDAVP w połączeniu z kwasem traneksamowym, a także rekombinowany aktywny czynnik VII (rVIIa). Być może sposób i skuteczność leczenia pacjentów z PT-VWD zależy, podobnie jak w VWD 2B, od typu mutacji sprawczej.

Podsumowanie

Typ płytkowy choroby von Willebranda (PT-VWD) występuje bardzo rzadko. W Polsce nie opisano dotychczas przypadku tej skazy krwotocznej. Objawy kliniczne i obraz laboratoryjny PT-VWD jest podobny do VWD 2B, z którym jest często mylona, natomiast podłoże genetyczne PT-VWD i VWD 2B są odmienne. Ustalenie prawidłowego rozpoznania warunkuje skuteczność leczenia tej rzadkiej choroby.

Piśmiennictwo

1. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res.* 2004; 114(5-6): 447–453, doi: 10.1016/j.thromres.2004.07.020, indexed in Pubmed: 15507277.
2. Ruggeri Z. Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 2001; 14(2): 257–279, doi: 10.1053/beh.2001.0133.
3. Ruggeri ZM. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res.* 2007; 120 Suppl 1: S5–S9, doi: 10.1016/j.thromres.2007.03.011, indexed in Pubmed: 17493665.
4. Reininger AJ. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia.* 2008; 14 Suppl 5: 11–26, doi: 10.1111/j.1365-2516.2008.01848.x, indexed in Pubmed: 18786007.
5. López JA, Dong Jf. Shear stress and the role of high molecular weight von Willebrand factor multimers in thrombus formation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005; 16 Suppl 1: S11–S16, indexed in Pubmed: 15849521.
6. Reininger AJ. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia.* 2008; 14 Suppl 5: 11–26, doi: 10.1111/j.1365-2516.2008.01848.x, indexed in Pubmed: 18786007.
7. Stocksclaeder M, Schneppenheim R, Budde U. Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2014; 25(3): 206–216, doi: 10.1097/MBC.000000000000065, indexed in Pubmed: 24448155.
8. Lippok S, Obser T, Müller JP, et al. Exponential size distribution of von Willebrand factor. *Biophys J.* 2013; 105(5): 1208–1216, doi: 10.1016/j.bpj.2013.07.037, indexed in Pubmed: 24010664.
9. Federici AB, Bader R, Pagani S, et al. Binding of von Willebrand factor to glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex: affinity is related to multimeric size. *Br J Haematol.* 1989; 73(1): 93–99, indexed in Pubmed: 2803984.
10. Dong Jf, Moake JL, Nolasco L, et al. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood.* 2002; 100(12): 4033–4039, doi: 10.1182/blood-2002-05-1401, indexed in Pubmed: 12393397.
11. Dong JF. Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(8): 1710–1716, doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01360.x, indexed in Pubmed: 16102037.
12. Wagner DD, Marder VJ. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization. *J Cell Biol.* 1984; 99(6): 2123–2130, indexed in Pubmed: 6334089.
13. Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, et al. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest.* 1985; 76(3): 1102–1106, doi: 10.1172/JCI112064, indexed in Pubmed: 2413071.
14. Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, et al. Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science.* 1985; 228(4706): 1401–1406, indexed in Pubmed: 3874428.
15. Madabhushi SR, Shang C, Dayananda KM, et al. von Willebrand factor (VWF) propeptide binding to VWF D'D3 domain attenuates platelet activation and adhesion. *Blood.* 2012; 119(20): 4769–4778, doi: 10.1182/blood-2011-10-387548, indexed in Pubmed: 22452980.
16. Szántó T, Joutsu-Korhonen L, Deckmyn H, et al. New insights into von Willebrand disease and platelet function. *Semin Thromb Hemost.* 2012; 38(1): 55–63, doi: 10.1055/s-0031-1300952, indexed in Pubmed: 22314604.
17. de Wit TR, van Mourik JA. Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001; 14(2): 241–255, indexed in Pubmed: 11686098.
18. Baldauf C, Schneppenheim R, Stacklies W, et al. Shear-induced unfolding activates von Willebrand factor A2 domain for

- proteolysis. *J Thromb Haemost.* 2009; 7(12): 2096–2105, doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03640.x, indexed in Pubmed: 19817991.
19. Padilla A, Moake JL, Bernardo A, et al. P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood.* 2004; 103(6): 2150–2156, doi: 10.1182/blood-2003-08-2956, indexed in Pubmed: 14630802.
 20. Arya M, Anvari B, Romo GM, et al. Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. *Blood.* 2002; 99(11): 3971–3977, doi: 10.1182/blood-2001-11-0060, indexed in Pubmed: 12010796.
 21. Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, et al. Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *J Clin Invest.* 1986; 78(6): 1456–1461, doi: 10.1172/JCI112736, indexed in Pubmed: 3491092.
 22. Moake JL, Rudy CK, Troll JH, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1982; 307(23): 1432–1435, doi: 10.1056/NEJM198212023072306, indexed in Pubmed: 6813740.
 23. Turner N, Nolasco L, Moake J. Generation and Breakdown of Soluble Ultralarge von Willebrand Factor Multimers. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* 2012; 38(01): 38–46, doi: 10.1055/s-0031-1300950.
 24. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Interaction of von Willebrand factor with platelets and the vessel wall. *Hamostaseologie.* 2015; 35(3): 211–224, doi: 10.5482/HAMO-14-12-0081, indexed in Pubmed: 25612915.
 25. Ulrichs H, Udvardy M, Lenting PJ, et al. Shielding of the A1 domain by the D'D3 domains of von Willebrand factor modulates its interaction with platelet glycoprotein Ib-IX-V. *J Biol Chem.* 2006; 281(8): 4699–4707, doi: 10.1074/jbc.M513314200, indexed in Pubmed: 16373331.
 26. Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med.* 2002; 347(8): 589–600, doi: 10.1056/NEJMra020528, indexed in Pubmed: 12192020.
 27. Reiter RA, Knöbl P, Varadi K, et al. Changes in von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity after infusion of desmopressin. *Blood.* 2003; 101(3): 946–948, doi: 10.1182/blood-2002-03-0814, indexed in Pubmed: 12393734.
 28. Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A, et al. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(19): 7899–7903, doi: 10.1073/pnas.0608422104, indexed in Pubmed: 17470810.
 29. Fischer BE, Kramer G, Mitterer A, et al. Effect of multimerization of human and recombinant von Willebrand factor on platelet aggregation, binding to collagen and binding of coagulation factor VIII. *Thromb Res.* 1996; 84(1): 55–66, indexed in Pubmed: 8885147.
 30. Whalley IN, Perry DJ. 2B or not 2B? Differential identification of Type 2B, versus pseudo-, von Willebrand disease. *Br J Haematol.* 2007; 136(2): 345; author reply 345–6, doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06411.x, indexed in Pubmed: 17233824.
 31. Lisman T, Raynal N, Groeneveld D, et al. A single high-affinity binding site for von Willebrand factor in collagen III, identified using synthetic triple-helical peptides. *Blood.* 2006; 108(12): 3753–3756, doi: 10.1182/blood-2006-03-011965, indexed in Pubmed: 16912226.
 32. Löf A, Müller JP, Brehm MA. A biophysical view on von Willebrand factor activation. *J Cell Physiol.* 2017 [Epub ahead of print], doi: 10.1002/jcp.25887, indexed in Pubmed: 28256724.
 33. Casa LDC, Ku DN. Thrombus Formation at High Shear Rates. *Annu Rev Biomed Eng.* 2017; 19: 415–433, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044539, indexed in Pubmed: 28441034.
 34. Skipwith CG, Cao W, Zheng XL. Factor VIII and platelets synergistically accelerate cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13 under fluid shear stress. *J Biol Chem.* 2010; 285(37): 28596–28603, doi: 10.1074/jbc.M110.131227, indexed in Pubmed: 20605782.
 35. Shim K, Anderson PJ, Tuley EA, et al. Platelet-VWF complexes are preferred substrates of ADAMTS13 under fluid shear stress. *Blood.* 2008; 111(2): 651–657, doi: 10.1182/blood-2007-05-093021, indexed in Pubmed: 17901248.
 36. Xie L, Chesterman CN, Hogg PJ. Control of von Willebrand factor multimer size by thrombospondin-1. *J Exp Med.* 2001; 193(12): 1341–1349, indexed in Pubmed: 11413189.
 37. Kumar RA, Dong Jf, Thaggard JA, et al. Kinetics of GPIIb/IIIa-vWF-A1 tether bond under flow: effect of GPIIb/IIIa mutations on the association and dissociation rates. *Biophys J.* 2003; 85(6): 4099–4109, doi: 10.1016/S0006-3495(03)74822-X, indexed in Pubmed: 14645097.
 38. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, et al. Glycoprotein Ib-IX-V. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2003; 35(8): 1170–1174, doi: 10.1016/s1357-2725(02)00280-7.
 39. Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RAP, et al. Structures of glycoprotein Iba and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science.* 2002; 297(5584): 1176–1179, doi: 10.1126/science.107355, indexed in Pubmed: 12183630.
 40. Nuytens BP, Thijs T, Deckmyn H, et al. Platelet adhesion to collagen. *Thromb Res.* 2011; 127 Suppl 2: S26–S29, doi: 10.1016/S0049-3848(10)70151-1, indexed in Pubmed: 21193111.
 41. Luo SZ, Mo Xi, Afshar-Kharghan V, et al. Glycoprotein Iba forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ibbeta subunits in the resting platelet. *Blood.* 2007; 109(2): 603–609, doi: 10.1182/blood-2006-05-024091, indexed in Pubmed: 17008541.
 42. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, et al. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature.* 1985; 318(6045): 470–472, indexed in Pubmed: 2933589.
 43. Lopez JA, Chung DW, Fujikawa K, et al. Cloning of the alpha chain of human platelet glycoprotein Ib: a transmembrane protein with homology to leucine-rich alpha 2-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1987; 84(16): 5615–5619, doi: 10.1073/pnas.84.16.5615.
 44. Kasirer-Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, et al. Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors. *Blood.* 2004; 103(9): 3403–3411, doi: 10.1182/blood-2003-10-3664, indexed in Pubmed: 14726383.
 45. Andrews RK, Berndt MC. Platelet adhesion: a game of catch and release. *J Clin Invest.* 2008; 118(9): 3009–3011, doi: 10.1172/JCI36883, indexed in Pubmed: 18725992.
 46. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res.* 2007; 100(12): 1673–1685, doi: 10.1161/01.RES.0000267878.97021.ab, indexed in Pubmed: 17585075.
 47. De Ceunynck K, Rocha S, Feys HB, et al. Local elongation of endothelial cell-anchored von Willebrand factor strings precedes ADAMTS13 protein-mediated proteolysis. *J Biol Chem.* 2011; 286(42): 36361–36367, doi: 10.1074/jbc.M111.271890, indexed in Pubmed: 21896483.

48. Murata M, Russell SR, Ruggeri ZM, et al. Expression of the phenotypic abnormality of platelet-type von Willebrand disease in a recombinant glycoprotein Ib alpha fragment. *J Clin Invest.* 1993; 91(5): 2133–2137, doi: 10.1172/JCI116438, indexed in Pubmed: 8486780.
49. Miller JL, Castella A. Platelet-type von Willebrand's disease: characterization of a new bleeding disorder. *Blood.* 1982; 60(3): 790–794, indexed in Pubmed: 6286015.
50. Othman M. Platelet-type Von Willebrand disease: three decades in the life of a rare bleeding disorder. *Blood Rev.* 2011; 25(4): 147–153, doi: 10.1016/j.blre.2011.03.003, indexed in Pubmed: 21497427.
51. Othman M. Differential identification of PT-VWD from type 2B VWD and GPIBA nomenclature issues. *Br J Haematol.* 2008; 142(2): 312–4; author reply 314, doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07171.x, indexed in Pubmed: 18492106.
52. Othman M, Kaur H, Emsley J. Platelet-type von Willebrand disease: new insights into the molecular pathophysiology of a unique platelet defect. *Semin Thromb Hemost.* 2013; 39(6): 663–673, doi: 10.1055/s-0033-1353442, indexed in Pubmed: 23934752.
53. Othman M, Lopez JA, Ware J. Platelet-type von Willebrand disease update: the disease, the molecule and the animal model. *Expert Rev Hematol.* 2011; 4(5): 475–477, doi: 10.1586/ehm.11.45, indexed in Pubmed: 21939413.
54. Weiss HJ, Meyer D, Rabinowitz R, et al. Pseudo-von Willebrand's disease. An intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high-molecular-weight multimers. *N Engl J Med.* 1982; 306(6): 326–333, doi: 10.1056/NEJM198202113060603, indexed in Pubmed: 6798442.
55. Takahashi H, Nagayama R, Hattori A, et al. Von Willebrand disease associated with familial thrombocytopenia and increased ristocetin-induced platelet aggregation. *Am J Hematol.* 1981; 10(1): 89–99, indexed in Pubmed: 6789673.
56. Takahashi H, Oda E, Hattori A, et al. Von Willebrand disease with an increased ristocetin-induced platelet aggregation and a qualitative abnormality of the factor VIII protein. *Am J Hematol.* 1980; 8(3): 299–308, indexed in Pubmed: 6774612.
57. Othman M, Kaur H, Favaloro EJ, et al. Platelet type von Willebrand disease and registry report: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2016; 14(2): 411–414, doi: 10.1111/jth.13204.
58. Othman M, Hamilton A. Platelet-type von Willebrand disease: results of a worldwide survey from the Canadian PT-VWD project. *Acta Haematol.* 2010; 123(2): 126–128, doi: 10.1159/000275926, indexed in Pubmed: 20090310.
59. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood.* 1987; 69(2): 454–459, indexed in Pubmed: 3492222.
60. Favaloro EJ. Von Willebrand disease: local diagnosis and management of a globally distributed bleeding disorder. *Semin Thromb Hemost.* 2011; 37(5): 440–455, doi: 10.1055/s-0031-1281028, indexed in Pubmed: 22102186.
61. Hamilton A, Ozelo M, Leggo J, et al. Frequency of platelet type versus type 2B von Willebrand disease. An international registry-based study. *Thromb Haemost.* 2011; 105(3): 501–508, doi: 10.1160/TH10-08-0523, indexed in Pubmed: 21301777.
62. Othman M, Emsley J. Platelet-type von Willebrand disease: toward an improved understanding of the. *Semin Thromb Hemost.* 2014; 40(2): 146–150, doi: 10.1055/s-0033-1364182, indexed in Pubmed: 24497122.
63. Othman M, Lillicrap D. Distinguishing between non-identical twins: platelet type and type 2B von Willebrand disease. *Br J Haematol.* 2007; 138(5): 665–666, doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06690.x, indexed in Pubmed: 17608761.
64. Othman M. Platelet-Type Von Willebrand Disease: A Rare, Often Misdiagnosed and Underdiagnosed Bleeding Disorder. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* 2011; 37(05): 464–469, doi: 10.1055/s-0031-1281030.
65. Miller JL, Cunningham D, Lyle VA, et al. Mutation in the gene encoding the alpha chain of platelet glycoprotein Ib in platelet-type von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(11): 4761–4765, indexed in Pubmed: 2052556.
66. Russel SD, Roth GJ. Pseudo-von Willebrand disease: a mutation in the platelet glycoprotein Ib alpha gene associated with a hyperactive surface receptor. *Blood.* 1993; 81: 1787–1791.
67. Moriki T, Murata M, Kitaguchi T, et al. Expression and functional characterization of an abnormal platelet membrane glycoprotein Ib alpha (Met239 --> Val) reported in patients with platelet-type von Willebrand disease. *Blood.* 1997; 90(2): 698–705, indexed in Pubmed: 9226170.
68. Doggett TA, Girdhar G, Lawshe A, et al. Alterations in the intrinsic properties of the GPIIb/IIIa-VWF tether bond define the kinetics of the platelet-type von Willebrand disease mutation, Gly233Val. *Blood.* 2003; 102(1): 152–160, doi: 10.1182/blood-2003-01-0072, indexed in Pubmed: 12637314.
69. Matsubara Y, Murata M, Sugita K, et al. Identification of a novel point mutation in platelet glycoprotein Ib alpha, Gly to Ser at residue 233, in a Japanese family with platelet-type von Willebrand disease. *J Thromb Haemost.* 2003; 1(10): 2198–2205, indexed in Pubmed: 14521605.
70. Woods AI, Sanchez-Luceros A, Bermejo E, et al. Identification of p.W246L as a novel mutation in the GPIBA gene responsible for platelet-type von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost.* 2014; 40(2): 151–160, doi: 10.1055/s-0033-1364183, indexed in Pubmed: 24474090.
71. Lavenu-Bombled C, Guitton C, Dupuis A, et al. A novel platelet-type von Willebrand disease mutation (GPIBA p.Met255Ile) associated with type 2B. *Thromb Haemost.* 2016; 116(6): 1070–1078, doi: 10.1160/TH16-06-0438, indexed in Pubmed: 27683759.
72. Enayat MS, Guilliat AM, Lester W, et al. Distinguishing between type 2B and pseudo-von Willebrand disease and its clinical importance. *Br J Haematol.* 2006; 133(6): 664–666, doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06078.x, indexed in Pubmed: 16704444.
73. Nurden P, Lanza F, Bonnafous-Faurie C, et al. A second report of platelet-type von Willebrand disease with a Gly233Ser mutation in the GPIBA gene. *Thromb Haemost.* 2007; 97(2): 319–321, indexed in Pubmed: 17264965.
74. Favaloro EJ, Patterson D, Denholm A, et al. Differential identification of a rare form of platelet-type (pseudo-) von Willebrand disease (VWD) from Type 2B VWD using a simplified ristocetin-induced-platelet-agglutination mixing assay and confirmed by genetic analysis. *Br J Haematol.* 2007; 139(4): 623–626, doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06850.x, indexed in Pubmed: 17916098.
75. Enayat S, Ravanbod S, Rassoulzadegan M, et al. A novel D235Y mutation in the GPIBA gene enhances platelet interaction with von Willebrand factor in an Iranian family with platelet-type von Willebrand disease. *Thromb Haemost.* 2012; 108(5): 946–954, doi: 10.1160/TH12-04-0189, indexed in Pubmed: 23014764.

76. Takahashi H, Murata M, Moriki T, et al. Substitution of Val for Met at residue 239 of platelet glycoprotein Ib alpha in Japanese patients with platelet-type von Willebrand disease. *Blood*. 1995; 85(3): 727–733, indexed in Pubmed: 7833477.
77. Giannini S, Cecchetti L, Mezzasoma AM, et al. Diagnosis of platelet-type von Willebrand disease by flow cytometry. *Haematologica*. 2010; 95(6): 1021–1024, doi: 10.3324/haematol.2009.015990, indexed in Pubmed: 19951970.
78. Othman M, Notley C, Lavender FL, et al. Identification and functional characterization of a novel 27-bp deletion in the macroglycopeptide-coding region of the GPIBA gene resulting in platelet-type von Willebrand disease. *Blood*. 2005; 105(11): 4330–4336, doi: 10.1182/blood-2002-09-2942, indexed in Pubmed: 15705799.
79. Sánchez-Luceros A, Woods AI, Bermejo E, et al. PT-VWD posing diagnostic and therapeutic challenges - small case series. *Platelets*. 2017; 28(5): 484–490, doi: 10.1080/09537104.2016.1237625, indexed in Pubmed: 27819553.
80. Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Clinical, laboratory and therapeutic aspects of platelet-type von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol*. 2008; 30(2): 91–94, doi: 10.1111/j.1751-553X.2007.00978.x, indexed in Pubmed: 18333841.
81. Kaur H, Ozelo M, Scovil S, et al. Systematic analysis of bleeding phenotype in PT-VWD compared to type 2B VWD using an electronic bleeding questionnaire. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2014; 20(8): 765–771, doi: 10.1177/1076029614543825, indexed in Pubmed: 25063765.
82. O'Connor D, Lester W, Willoughby S, et al. Pregnancy in platelet-type VWD: a case series. *Thromb Haemost*. 2011; 106(2): 386–387, doi: 10.1160/TH11-02-0108, indexed in Pubmed: 21614417.
83. Grover N, Boama V, Chou MR. Pseudo (platelet-type) von Willebrand disease in pregnancy: a case report. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2013; 13: 16, doi: 10.1186/1471-2393-13-16, indexed in Pubmed: 23327637.
84. Favaloro EJ. 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 multidimensional or multifaceted primary-hemostasis coin? *Semin Thromb Hemost*. 2008; 34(1): 113–127, doi: 10.1055/s-2008-1066019, indexed in Pubmed: 18393148.
85. Frontroth JP, Favaloro EJ. Ristocetin-Induced Platelet Aggregation (RIPA) and RIPA Mixing Studies. *Methods Mol Biol*. 2017; 1646: 473–494, doi: 10.1007/978-1-4939-7196-1_35, indexed in Pubmed: 28804849.
86. Favaloro E, Bonar R, Meiring M, et al. 2B or not 2B? Disparate discrimination of functional VWF discordance using different assay panels or methodologies may lead to success or failure in the early identification of type 2B VWD. *Thrombosis and Haemostasis*. 2007, doi: 10.1160/th06-12-0693.
87. Favaloro EJ. 2B or not 2B? Differential identification of type 2B, versus pseudo-von Willebrand disease. *Br J Haematol*. 2006; 135(1): 141–2; author reply 143, doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06249.x, indexed in Pubmed: 16911565.