

# Choroba von Willebranda typu 2N — epidemiologia, diagnostyka fenotypowo-molekularna

## Von Willebrand Disease type 2N — epidemiology, phenotypic-molecular diagnostic

Ksenia Bykowska<sup>1</sup>, Bernadeta Ceglarek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Choroby von Willebranda, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

<sup>2</sup>Klinika Zaburzeń Hemostazy i Chorób Metabolicznych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

### Streszczenie

Choroba von Willebranda (VWD) typu 2N jest to skaza krwotoczna, która dziedziczy się autosomalnie recesywnie i jest klinicznie podobna do łagodnej hemofilii A. W typie 2N VWD zmniejszone powinowactwo czynnika von Willebranda (VWF) do czynnika VIII (FVIII) jest spowodowane mutacjami w miejscu wiązania FVIII lub zmianami konformacyjnymi cząsteczki VWF, upośledzającymi interakcję VWF-FVIII. Laboratoryjnie typ 2N VWD charakteryzuje się nieproporcjonalnie obniżonym FVIII do antygeny VWF i w efekcie zredukowanym ilorazem FVIII/VWF:Ag. U większości pacjentów z 2N VWD stężenie i struktura multimetrów VWF są prawidłowe. Rozpoznanie VWD 2N opiera się głównie na oznaczeniu obniżonego wiązania FVIII do VWF lub zidentyfikowaniu mutacji sprawczych w domenie genu VWF, odpowiedzialnej za wiązanie FVIII. Typ 2N VWD powinien być zawsze brany pod uwagę u pacjentów z niskim stężeniem FVIII.

**Słowa kluczowe:** choroba von Willebranda typu 2N, patofizjologia, podłoże genetyczne, diagnostyka fenotypowa i laboratoryjna

*J. Transf. Med. 2018; 11: 52–62*

### Summary

Type 2N von Willebrand disease (VWD) is an autosomal recessive inherited bleeding disorder, clinically similar to mild haemophilia A. The affinity of VWF for FVIII is reduced because of mutations in the FVIII binding site or conformational changes that impair the VWF-FVIII interaction. The characteristic laboratory feature is disproportionate decrease in the FVIII level to the VWF level with the resultant reduction in the FVIII/VWF:Ag ratio. The majority of patients with VWF type 2N have normal level and normal multimer structure of VWF. Definitive diagnosis of VWD 2N requires evidence of reduced FVIII binding to VWF or identification of causative mutations in the FVIII binding region of the VWF gene. Type 2N VWD is an important consideration in the differential diagnosis in individuals who present with low FVIII levels.

**Key words:** von Willebrand disease type 2N, pathophysiology, genetic basis, phenotypic and laboratory diagnosis

*J. Transf. Med. 2018; 11: 52–62*

**Adres do korespondencji:** prof. dr hab. n. med. Ksenia Bykowska, Pracownia Choroby von Willebranda, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa

## Wstęp

Badania nad chorobą von Willebranda rozpoczęły się w 1926 roku, kiedy to fiński lekarz, dr Eric von Willebrand [1], opublikował pracę opisującą skazę krwotoczną w rodzinie rybaków zamieszkujących małą wyspę Föglö, położoną w archipelagu Wysp Alandzkich, u wejścia do Zatoki Botnickiej, między Szwecją a Finlandią. Jego pierwszą pacjentką była 5-letnia dziewczynka, Hjördis, przyjęta do Diakonihospital w Helsinkach z powodu ciężkich krwotoków z nosa, dziąseł, warg i po ekstrakcji zębów. Dziewczynka pochodziła z dużej, 58-osobowej rodziny, w której aż u 22 osób wykryto skazę krwotoczną. Spośród 12 rodzeństwa tylko dwoje dzieci było zdrowych. Cztery siostry zmarły między 2. a 4. rokiem życia z powodu niekontrolowanych krwawień z nosa, ran, krwawień z przewodu pokarmowego. Oboje rodzice, Oskar i Augusta, w młodości cierpieli z powodu ciężkich krwawień z nosa. U Augusty i jej sióstr występowały obfite krwawienia miesięczne. W wieku 3 lat Hjördis po urazie wargi krwawiła przez 3 dni. Dziewczynka zmarła w wieku 14 lat z powodu krwotoku — w trakcie czwartej miesiączki [2].

Skazę krwotoczną opisaną u rodziny z Föglö nazwano, od nazwiska jej pierwszego badacza, chorobą von Willebranda (VWD, *von Willebrand disease*), a powodującą ją nieprawidłowe białko — czynnikiem von Willebranda (VWF, *von Willebrand factor*).

## Choroba von Willebranda

Choroba von Willebranda jest to skaza krwotoczna dziedziczona autosomalnie dominująco, rzadziej recesywnie. Jest ona spowodowana niedoborem/brakiem osoczkowego białka — VWF [3–5]. Występuje u około 1–2% ogólnej populacji i jest najczęściej występującą skazą krwotoczną [6].

Charakterystycznymi objawami VWD są krwawienia skórno-słuzówkowe, przedłużone krwawienia po ekstrakcji zębów, krwawienia z nosa i dziąseł, po zranieniach, urazach, zabiegach chirurgicznych. U kobiet najczęstszym objawem są przedłużone, krwotoczne miesiączki. W typie 3 (ciężkim) VWD mogą występować, podobnie jak w hemofilii, krwawienia do mięśni, stawów, centralnego układu nerwowego i z przewodu pokarmowego. Objawy skazy krwotocznej są bardzo heterogenne i w obrębie jednej rodziny z tą samą mutacją obraz kliniczny choroby może być różny [3–5]. Stężenie VWF w osoczu chorych, a także nasilenie skazy

krwotocznej zależą od wielu czynników — zarówno genetycznych, jak i środowiskowych. Rozpoznawanie VWD i różnicowanie jego wariantów jest skomplikowane i opiera się na wieloetapowej diagnostyce laboratoryjnej. Dodatkową trudnością jest to, że łagodna skaza krwotoczna (przedłużone krwawienia miesięczne u kobiet, krwawienia z nosa) może występować równie często u ludzi zdrowych, jak i u osób chorych z VWD.

Początkowo VWD diagnozowano na podstawie natężenia skazy krwotocznej i wyników badań biochemicznych oceniających ilościowe, jakościowe, strukturalne i funkcjonalne defekty VWF [7]. Wkrótce okazało się jednak, że metodologia biochemiczna nie jest wystarczająca do różnicowania VWD. Pojawiały się coraz to nowsze prace dokumentujące różne warianty VWD. Rozwój technik biologii molekularnej poszerzył możliwości diagnostyki tej choroby. Od 1985 roku, kiedy to cztery niezależne zespoły [8–11] sklonowały i zbadały sekwencję genu VWF, warianty VWD zaczęto klasyfikować na podstawie analizy fenotypowo-genetycznej [12–15]. Opisano mutacje sprawcze odpowiedzialne za dysfunkcje VWF, prowadzące do skazy krwotocznej; delecje, insercje, mutacje miejsc składania (*splice-site*), mutacje nonsensowne oraz typu *missense* [12, 14–16]. Wykazano, że mutacje VWF występują na całej długości genu VWF od promotora do eksonu 52 i w większości (75%) są mutacjami typu *missense* [16]. Najczęściej mutacje wykrywane są w typie 2 i 3 VWD, natomiast znacznie rzadziej — w typie 1.

W 1994 roku Sadler [17] opublikowała nową klasyfikację VWD. Klasyfikacja ta wyróżnia trzy główne typy tej choroby: dwa ilościowe (typ 1 i typ 3) i jeden jakościowy (typ 2). W typie 1 VWD obniżona jest synteza VWF; typ 3 VWD charakteryzuje się całkowitym brakiem antygeny czynnika von Willebranda (VWF:Ag, *von Willebrand factor antigen*) i bardzo niskim stężeniem czynnika VIII (FVIII, *factor VIII*). Typ 2 VWD podzielono na cztery podtypy: 2A VWD, charakteryzujący się upośledzoną funkcją VWF:RCo połączoną z niedoborem wysokocząsteczkowych multimetrów VWF; typ 2B VWD — o zwiększonym powinowactwie do płytkowej glikoproteiny Ib; typ 2M VWD, charakteryzujący się upośledzoną aktywnością przy prawidłowym obrazie multimetrów; oraz typ 2N VWD — z upośledzonym wiązaniem FVIII. Klasyfikacja z 1994 roku [17] już wkrótce okazała się także niewystarczająca, szczególnie jeśli chodzi o typ 1, i w związku z tym została zmodyfikowana w 2006 roku [18].

## Czynnik von Willebranda

Przyczyną choroby von Willebranda jest defekt/niedobór VWF — glikoproteiny osoczowej, syntetyzowanej w komórkach śródbłonna i megakariocytach. Synteza odbywa się pod kontrolą genu znajdującego się na końcu krótkiego ramienia chromosomu 12. Gen VWF ma wielkość 178 kb i zawiera 52 eksony [19, 20]. W osoczu VWF pojawia się w formie multimerów o masie cząsteczkowej 0,5–10 tys. kDa. Każdy multimer jest zbudowany z dimerów połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi. Podstawową jednostką VWF jest monomer o ciężarze 250 kDa. Dwa monomery połączone wiązaniem dwusiarczkowym tworzą dimer. Monomer jest zbudowany z powtarzających się domen (A, B, C, D) zawierających sekwencje odpowiedzialne za funkcje biologiczne VWF. W domenie A1 znajduje się miejsce wiązania z kolagenem i glikoproteiną GPIb płytek krwi; w domenie A3 — wiązanie z kolagenem; w domenie C1 — wiązanie z płytkową glikoproteiną GPIIb-IIIa; w domenie D'D3 — miejsce wiązania z FVIII.

Domeny VWF są ułożone od N-końca cząsteczki w następującym porządku: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK [3, 4, 6]. Syntetyzowane w komórkach śródbłonna i megakariocytach multimery VWF są uwalniane do osocza lub magazynowane w ciałkach Weibel-Palede komórek śródbłonna i ziarnistościach  $\alpha$ -płytek krwi, skąd mogą być uwalniane do krążenia przez stymulację czynnikami fizjopatologicznymi. Znajdujące się w osoczu multimery mają wielkość od 0,5 (dimer) do 10 tys. kDa, natomiast magazynowane w ziarnistościach śródbłonna i płytkach krwi — ponad 10 tys. kDa [są to tzw. ultrawielkie multimery (UL-HMWM, *ultra large high molecular weight multimers*)]. W osoczu występują multimery niskocząsteczkowe (LMWM, *low molecular weight multimers*) o ciężarze 0,5–2,5 tys. kDa, multimery średnicząsteczkowe (IMWM, *intermediate molecular weight multimers*) o ciężarze 3–5 tys. kDa oraz multimery wielkocząsteczkowe (HMWM, *high molecular weight multimers*) — 5,5–10 tys. kDa [21, 22]. W procesie krzepnięcia krwi (funkcja nośnika dla FVIII) 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 [21, 22].

## Czynnik VIII krzepnięcia krwi

W procesie krzepnięcia krwi, aktywny FVIII (FVIIIa) pełni funkcję kofaktora czynnika IXa w ak-

tywacji czynnika X, w obecności fosfolipidów i jonów wapnia [23]. Stężenie FVIII w osoczu wynosi 0,1 mg/l. Synteza FVIII przebiega głównie w wątrobie (choć nie tylko) pod kontrolą genu znajdującego się na chromosomie X (Xq28). Gen czynnika VIII ma masę 186 kb i zawiera 26 eksonów. Syntetyzowany w komórkach FVIII ma masę około 300 kDa (2332 reszt) i jest jednołańcuchową glikoproteiną zbudowaną z pojedynczego łańcucha polipeptydowego (NH<sub>2</sub>) A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2 (COOH). Po proteolizie przez furynę FVIII pojawia się w osoczu jako nieaktywny zymogen (heterodimer) o ciężarze około 300 kDa, zbudowany z dwóch łańcuchów polipeptydowych: ciężkiego i lekkiego, połączonych wiązaniem niekowalencyjnym zależnym od jonów Cu i Ca. Łańcuch ciężki (A1-A2-B) ma masę około 200 kDa, natomiast łańcuch lekki (a3-A3-C1-C2) — 80 kDa [24]. W krążeniu FVIII tworzy niekowalencyjny kompleks z VWF (Kd — ok. 0,3 nM), chroniący FVIII przed proteolityczną degradacją. Czas półtrwania FVIII w kompleksie z czynnikiem VWF wynosi 12 godzin, natomiast bez czynnika VWF — poniżej 1 godziny.

## Interakcja czynnika VIII z czynnikiem von Willebranda

Czynnik VWF odgrywa podwójną rolę w procesie hemostazy. Z jednej strony wiąże się z receptorami płytkowymi GPIb-IX-V i GPIIb-IIIa, biorąc udział w adhezji i agregacji płytek krwi w naczyniach o wysokiej sile ścinania (hemostaza pierwotna); z drugiej zaś tworzy kompleks z FVIII, chroniąc FVIII przed proteolityczną degradacją pod wpływem aktywnego białka C [25, 26]. Każdy monomer VWF ma jedno miejsce wiązania FVIII zlokalizowane w domenie D' (pierwsze 272 aminokwasy), przy czym z FVIII wiąże się jedynie z 1–2% monomerów VWF (1–2 cząsteczki FVIII: 100 monomerów VWF) [23]. Interakcja VWF z łańcuchem lekkim FVIII zwiększa asocjację łańcucha lekkiego i ciężkiego FVIII, powodując jednocześnie, że znajdujące się w łańcuchu lekkim wiązania podatne na proteolizę są niedostępne. Związany z VWF czynnik VIII jest nieaktywny, nie wiąże się z fosfolipidami i nie reaguje z komponentami kompleksu tenazy.

W miejscu uszkodzenia naczynia związany z VWF FVIII ulega proteolitycznej aktywacji pod wpływem trombiny, dysocjuje od VWF, wiąże się z powierzchnią aktywowanych płytek i bierze udział w krzepnięciu krwi [23, 24, 27–29]. Krytyczna dla aktywacji jest proteoliza wiązań w obu łańcuchach FVIII. Degradacji ulegają wią-

zania w łańcuchu ciężkim w pozycji Arg (A1-A2) i Arg740 (A2-B) oraz w łańcuchu lekkim w pozycji Arg1689 blisko końca NH<sub>2</sub>. Czas półtrwania FVIII w kompleksie z VWF wynosi 12 godzin, a przy jego całkowitym braku — poniżej 1 godziny; w typie 3 VWD — poniżej 3 godzin. Niedobór FVIII jest więc zjawiskiem wtórnym do defektu/niedoboru VWF. Jakakolwiek zmiana w stężeniu VWF powoduje zmianę w stężeniu FVIII.

### Choroba von Willebranda typu 2N

Typ 2N VWD dziedziczy się autosomalnie recesywnie. Charakteryzuje się on utratą/obniżeniem przez VWF zdolności wiązania z FVIII.

U większości chorych z 2N VWD, podobnie jak w hemofilii A, przy obniżonej aktywności FVIII (5–40 IU/dl) stężenie antygeny VWF jest prawidłowe lub nieznacznie obniżone [30], a hemostaza pierwotna (płytkowa), w przeciwieństwie do innych typów VWD — prawidłowa.

Pierwsze przypadki defektu wiązania VWF-FVIII opisano w latach 1989–1990 u chorych z obrazem klinicznym łagodnej VWD i łagodnej hemofilii A [31–33]. W roku 1990 zidentyfikowano u tych chorych defekt w strukturze białkowej VWF i zaproponowano zaklasyfikowanie tej skazy krwotocznej jako VWD typ Normandy (2N), od nazwy regionu Francji, z którego pochodził pierwszy pacjent [33]. Od tego czasu opisano wiele przypadków 2N VWD na całym świecie. Badania epidemiologiczne pokazują, że typ 2N VWD występuje stosunkowo rzadko i stanowi 1–2% wszystkich chorych z VWD [34, 35]. Fenotypowo 2N VWD może przypominać łagodną lub umiarkowaną hemofilię A, różni się jednak od niej sposobem dziedziczenia [32, 33, 36]. Dziedziczenie hemofilii A jest sprzężone z płcią, natomiast 2N VWD — autosomalne recesywne. Uważa się, że rozpoznanie typu 2N VWD powinno być brane pod uwagę u każdego chorego z niedoborem FVIII, u którego dziedziczenie nie jest związane z chromosomem X. Ponieważ stosunek stechiometryczny FVIII do VWF wynosi 1 : 50 (1 cząsteczka FVIII do 50 monomerów VWF), a w związku z tym w multimerze VWF jest nadmiar miejsc wiążących FVIII, fenotyp 2N VWD przejawia się głównie u homozygot defektu wiązania, złożonych heterozygot defektu wiązania z allelem *null* lub z dodatkowym defektem hemostazy [36–38].

### Charakterystyka fenotypowa

Przyczyną skazy krwotocznej u pacjentów z typem 2N VWD jest wtórny niedobór FVIII spowodowany upośledzeniem/brakiem wiązania VWF z FVIII. Stężenie FVIII u chorych z typem 2N wynosi zazwyczaj 5–40%, choć zdarzają się także pacjenci ze stężeniem FVIII poniżej 2% [30, 39–44]. Krwawienia pojawiają się głównie po urazach i zabiegach chirurgicznych i są podobne do objawów skazy krwotocznej w łagodnej/umiarkowanej hemofilii A [36, 37, 42–46].

U chorych z 2N VWD mogą występować wybroczyny, krwawienia z nosa, łatwość siniaczenia, krwawienia po usunięciu migdałków, po ekstrakcji zębów, po zabiegach chirurgicznych i urazach. U chorych z FVIII poniżej 10% mogą wystąpić wylewy do mięśni, stawów i krwawienia do przewodu pokarmowego [31, 32]. Krwawienia z błon śluzowych, charakterystyczne dla zaburzeń hemostazy płytkowej, pojawiają się zazwyczaj u chorych z niskim stężeniem VWF, defektem multimeryzacji i przedłużonym czasem krwawienia [47].

Charakter krwawień i ich nasilenie są związane z rodzajem mutacji oraz z wystąpieniem dodatkowego defektu hemostazy [39, 48–51]. Łagodna skaza krwotoczna występuje najczęściej u chorych z homozygotyczną mutacją R854Q [37], natomiast bardzo ciężka — z mutacjami E787K, T791M i R816W [37].

Równoczesne występowanie defektu wiązania FVIII z nieprawidłową strukturą multimerów VWF jest wynikiem tego, że większość mutacji powodujących fenotyp 2N VWD zachodzi w domenie D', w której znajdują się wiązania dwusiarczkowe odgrywające ważną rolę w N-końcowej multimeryzacji VWF [52–54].

Pontara i wsp. [55] opisali chorego z mutacją R854Q i trombastenią Glanzmanna, u którego występowały wylewy do stawów i artropatia. Ciężki obraz kliniczny opisano także u pacjentów z typem 2N VWD, hemofilią A i nosicielstwem hemofilii A [40, 41, 56].

Bardzo mało jest doniesień dotyczących przebiegu ciąży u kobiet z genotypem 2N [57, 58]. Denis i wsp. [58] opisali przebieg ciąży u kobiety z homozygotyczną mutacją R854Q (poprzednie oznaczenie: R91Q), u której przez cały okres ciąży FVIII nie przekraczał 48% i która w związku z tym otrzymywała koncentraty FVIII. Z kolei Castaman i wsp [57] przedstawili dwa przypadki ciąży: jeden u homozygoty, drugi u heterozygoty mutacji

R854Q, u których wzrost aktywności VIII:C był wystarczający do zapewnienia prawidłowej hemostazy.

### Podłoże genetyczne

Podłożem niedoboru FVIII u pacjentów z typem 2N są mutacje typu missense genu VWF powodujące zmiany aminokwasowe w domenie D'D3 VWF, odpowiedzialnej za wiązanie VIII:C lub w jej najbliższym sąsiedztwie, w wyniku czego dochodzi do upośledzenia tworzenia kompleksów VWF-FVIII i wtórnego niedoboru FVIII.

Mutacje te są zlokalizowane w obszarze pierwszych 272 aminokwasów monomeru VWF w domenach D'D3 [35, 48], przy czym mutacje w eksonach 18–20 kodujących domenę D' VWF stanowią około 85% wszystkich opisanych mutacji typu 2N, natomiast pozostałe 15% zachodzi w eksonach 17 i 21–27 [37, 45, 47].

Heterozygotyczna, pojedyncza mutacja w jednym allelu bardzo rzadko powoduje takie obniżenie FVIII, by powstała skaza krwotoczna. Dopiero wystąpienie mutacji w obydwu allelach skutkuje bardzo dużym upośledzeniem wiązania FVIII.

Pacjenci z typem 2N VWD są zazwyczaj albo homozygotami defektu, albo heterozygotami z allelem *null* lub złożonymi heterozygotami z innymi mutacjami VWF [52–54] bądź z mutacjami innych białek biorących udział w hemostazie [40, 41, 55, 56].

Pierwszą opisaną mutacją typu 2N VWD była mutacja T791M [33]. Od tego czasu zarejestrowano 31 mutacji typu *missense* odpowiedzialnych za typ 2N VWD (tab. 1). Najczęściej występującą mutacją w populacji europejskiej jest R854Q. Występuje ona u 73% wszystkich opisanych dotychczas pacjentów z typem 2N VWD [35, 61]. Badania Casonato i wsp. [35] wykazały, że mutacja R854Q jest jedyną mutacją typu 2N VWD występującą we Włoszech. Opisana również we Włoszech mutacja R763C, kodowana przez ekson 17, dziedziczy się autosomalnie dominująco [45] i interferuje w miejscu degradacji propeptydu przez furynę, powodując jedynie pośrednio upośledzenie wiązania monomeru VWF z FVIII. Casonato i wsp. [35] na podstawie wyników badań przeprowadzonych we Włoszech uważają, że w przypadku R854Q występuje tak zwany efekt założyciela (*funder effect*). Oznacza to, że pacjenci obciążeni tą mutacją pochodzą od wspólnego przodka żyjącego około 10–40 tys. lat temu, a częstość jej występowania w różnych obszarach geograficznych jest związana z migracją ludności. Mutacja ta występuje bardzo rzadko w populacji Afroamerykanów (0,1%), natomiast częściej u Amerykanów pochodzenia kaukaskiego (1,2%).

Częstość występowania mutacji R854Q w populacji VWD wynosi we Włoszech i w Australii około 2,5% [37, 62, 63], w Indiach — 3,6%, natomiast w Meksyku — 10% [64, 65].

### Diagnostyka laboratoryjna choroby von Willebranda typu 2N

Badania przesiewowe i badania typu VWD są wspólne dla diagnostyki wszystkich typów VWD i zostały opisane we wcześniejszej pracy [66].

Wstępny etap diagnostyki 2N VWD obejmuje określenie niedoboru VIII:C, stężenia antygeny VWF:Ag i wyznaczenie ilorazu FVIII/VWF:Ag. U większości chorych FVIII wynosi 5–40 IU/dl, chociaż opisano ciężkie przypadki 2N VWD z VIII:C wynoszącym 1–2 IU/dl. Stężenie VIII:C rzędu  $8,4 \pm \pm 5,2$  IU/dl jest skorelowane najczęściej z całkowitym brakiem wiązania VWF-FVIII, natomiast  $21 \pm 5,4$  IU/dl — z częściowym. Stężenie antygeny VWF u chorych z typem 2N może być prawidłowe lub obniżone w zależności od grupy krwi czy nosicielstwa allelu *null* VWF. Iloraz FVIII/VWF poniżej 0,6 może sugerować typ 2N VWD [49].

**Rozpoznawanie typu 2N VWD opiera się głównie na ocenie wiązania VWF-FVIII (VWF:VIII B) wykonywanego metodą ELISA [49, 67–69], a w wysokospecjalistycznych laboratoriach również na określeniu mutacji sprawczych w domenach D'D3 VWF odpowiedzialnych za wiązanie FVIII. Należy jednak pamiętać, że brak mutacji w domenach, w których zachodzi wiązanie VWF-FVIII, nie wyklucza 2N VWD.**

Test wiązania (VWF:VIII B, chromogeny test ELISA) osoczonego VWF z egzogennym FVIII jest jak dotychczas jedynym testem pozwalającym na różnicowanie 2N VWD (znacznie upośledzony) z hemofilią A (prawidłowy). Składa się on z kilku etapów: 1) związanie osoczonego VWF z opłaszczonymi na mikropłytkce przeciwciałami anti-VWF; 2) odmycie endogennego FVIII; 3) związanie oczyszczonego egzogennego FVIII; 4) określenie ilości zwiazanego z VWF egzogennego FVIII. Wynik VWF:VIII B wyraża się w procentach prawidłowego osocza. Wynik większy lub równy 80% oznacza prawidłowe wiązanie; 30–65% umiarkowane wiązanie; poniżej 15% — głębokie upośledzenie wiązania. U pacjentów z umiarkowanie obniżonym lub prawidłowym VWF:VIII B powinny być wykonane badania molekularne w kierunku hemofilii A [49].

Klasyczny typ 2N VWD charakteryzuje się: obniżonym stężeniem antygeny i aktywności FVIII w osoczu spowodowanym defektem wiązania FVIII z VWF; prawidłową strukturą multimetrów VWF,

**Tabela 1.** Mutacje typu *missense* w chorobie von Willebranda typu 2N [58]**Table 1.** Missense type mutations in von Willebrand Disease type 2N [58]

Mutacja	Domena	Ekson	Dziedziczenie	Defekt
Arg854Gln	D'	20	Homozygota/złożona heterozygota (c.2430 delC; C.2546 + 3G > C; Arg760Cys; Arg763Gly; Cys788Tyr; Thr791Met; Tyr795Cys; Cys804Phe; Arg816Trp; Arg858Phe; Asp879Glu; Gln895His; Cys1060Arg; Glu1078Lys; Val842*; Asn900*; <i>null</i> )	Prawidłowy rozkład multimetrów
Arg854Glu	D'	20	Homozygotz/złożona heterozygota (Val842*)	
Arg854Trp	D'	20	Homozygota	Brak HMWM i IMWM; brak tripletów; upośledzone uwalnianie
Cys858Phe	D'	20	Złożona heterozygota (Arg854Gln)	Brak HMWM i IMWM; upośledzone uwalnianie
Asp879Glu	D3	20	Złożona heterozygota (Arg854Gln)	
Asp879Asn	D3	20	Złożona heterozygota (Arg1659*)	Niedobór HMWM; upośledzone uwalnianie
Cys887Arg	D3	20		
Arg924Gln	D3	21	Homozygota/złożona heterozygota (Cys1060AArg)	Prawidłowe multimery; pacjent heterozygotyczny opisany jako typ 1
Gln1053His	D3	24	Heterozygota	Prawidłowe multimery; umiarkowanie obniżone wiązanie FVIII; heterozygota i nosiciel hemofilii A
Cys1060Arg	D3	24	Homozygota/złożona heterozygota (Tyr757*; Arg854Gln; Arg924Gln; <i>null</i> )	Niedobór HMWM multimerów
Cys1060Tyr	D3	24	Homozygota	Brak HMW VWF; pacjent heterozygotyczny opisany jako hemofilia A
Glu1078Lys	D3	25	Złożona heterozygota (Arg854Gln)	Prawidłowe multimery, degradacja wiązania dwusiarczkowego w pozycji Cys1060
C1225Gly	D3	28	Homozygota	Brak HMWM; mutacja opisana jako typ 2A VWD; upośledzone uwalnianie VWF
Arg760Cys	D2	17	Heterozygota/heterozygota podwójna (Arg854Gln)	Brak HMWM i IMWM, upośledzone uwalnianie VWF, defekt degradacji przez furynę, upośledzone wiązanie FVIII
Arg763Gly	D2	18	Heterozygota/podwójna heterozygota (Arg854Gln)	Multimery wędrujące wolniej. upośledzone uwalnianie VWF, defekt degradacji przez furynę, upośledzone wiązanie FVIII
Arg763Ser	D2	18	Heterozygota	Złożony fenotyp 2A/2M i umiarkowany 2N
Arg768Gln	D'	18	—	Heterozygotyczni chorzy opisani jako typ 1
Gly785Glu	D'	18	Złożona heterozygota (druga mutacja nieokreślona)	Prawidłowe multimery, prawidłowe uwalnianie
Glu787Lys	D'	18	Złożona heterozygota (c.2430del C; c.2435del C)	Prawidłowe multimery
Cys788Arg	D'	18	Homozygota	Brak HMWM i IMWM; upośledzone uwalnianie. Opisywana także jako 2A VWD
Cys788Tyr	D'	18	Złożona heterozygota (Arg854Gln; Asp93*)	Niedobór HMWM i IMWM, wzór rozmyty; upośledzone uwalnianie, mutacja niszczy wiązanie Cys799-Cys788
Thr789Pro	D'	18	Homozygota	
Thr791Met	D'	18	Homozygota/złożona heterozygota (c.2430 delC; Arg854Gln; <i>null</i> ; <i>splice site</i> )	Prawidłowa struktura multimerów

→

**Tabela 1 cd.** Mutacje typu *missense* w chorobie von Willebranda typu 2N [58]**Table 1 cont.** Missense type mutations in von Willebrand Disease type 2N [58]

Mutacja	Domena	Ekson	Dziedziczenie	Defekt
Tyr795Cys	D'	18	Złożona heterozygota (Arg854Gln; Arg1566*)	Ultra duże multimery, wzór multimetrów rozmyty
Met800Val	D'	18	—	
Cys804Phe	D'	18	Złożona heterozygota (Arg854Gln)	Brak HMWM
Leu809Pro	D'	18		
Pro812Leu	D'	18	Heterozygota	
Arg816Gln	D'	19		Prawidłowe multimetry
Arg816Trp	D'	19	Homozygota; złożona heterozygota (c1911 delC; Arg34Asp)	Prawidłowa struktura multimetrów
His 817Gln	D'	19	Homozygota	Zwiększony klirens po DDAVP

Objaśnienie skrótów: DDAVP — desmopresyna, 1-deamino-8D-argininowazopresyna; FVIII (*VIII factor*) — czynnik VIII; HMWM (*high molecular weight multimer*) — multimery wielkocząsteczkowe; IMWM (*intermediate molecular weight multimer*) — multimery o średniej masie cząsteczkowej; VWD (*von Willebrand disease*) — choroba von Willebranda; VWF (*von Willebrand factor*) — czynnik von Willebranda.

**Tabela 2.** Charakterystyka laboratoryjna klasycznego podtypu 2N choroby von Willebranda (VWD) [70, 71]**Table 2.** Laboratory characteristics of classic 2N von Willebrand disease (VWD) type [70, 71]

Rodzaj badania	Wynik badania		
Dziedziczenie	Autosomalne recesywne		
<b>Testy przesiewowe</b>			
Czas protrombinowy (PT)	Prawidłowy		
Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT)	Prawidłowy/wydłużony		
Liczba płytek	Prawidłowy		
Czas okluzji skrzepu (CT) (PFA-100) N	Prawidłowy		
Czas krwawienia	Prawidłowy		
<b>Rozpoznawanie typu 2n vwd</b>			
Czynnik VIII (FVIII)	Najczęściej 5–40 IU/dl		
Antygen VWF (VWF:Ag)	Prawidłowy/nieznacznie obniżony		
Kofaktor rystocetyny (VWF:RCo)	Prawidłowy/nieznacznie obniżony		
Wiązanie kolagenu (VWF:CB)	Prawidłowy/nieznacznie obniżony		
Multimery VWF	Prawidłowe		
Iloraz VWF:RCo/VWF:Ag	> 0,7		
Iloraz VWF:CB/VWF:Ag	> 0,7		
Iloraz FVIII/VWF:Ag	< 0,6/0,5		
VWF:VIII B	< 80%		
Test RIPA	Rystocetyna		
	0,5 mg/ml	Brak agregacji	
	Rystocetyna	1,0 mg/ml	Prawidłowa
	Rystocetyna	1,5 mg/ml	Prawidłowa

prawidłowym ilorazem VWF:RCo/VWF:Ag, obniżonym ilorazem FVIII/VWF:Ag, obniżonym wiązaniem VWF-FVIII (VWF:FVIII B), prawidłowym czasem krwawienia oraz prawidłową agregacją pod wpływem rystocetyny 1,0 i 1,5 mg/ml (tab. 2) [70, 71].

U złożonych heterozygot obraz laboratoryjny (a także obraz kliniczny) może się różnić od klasycznej postaci 2N VWD [37, 46, 59]. Część mutacji sprawczych może być skorelowana z nieprawidłową strukturą multimetrów VWF, brakiem HMWM,

obecnością UL-HMWM, nieprawidłową strukturą tripletów. U homozygot lub heterozygot mutacji C788, C1225G, czy D879N występuje nie tylko dramatycznie upośledzone wiązanie FVIII-VWF, ale także nieprawidłowa multimeryzacja i uwalnianie VWF, obniżona HMWM, brak tripletów, a czas krwawienia jest przedłużony podobnie jak w ciężkiej postaci VWD 2E/N. U pacjentów z mutacjami Y795C i R763G występuje natomiast nie tylko defekt wiązania FVIII; obecne są także UL-VWF, obraz elektroforetyczny jest zaś rozmyty (tab. 1).

**Ponieważ VWD 2N fenotypowo przypomina hemofilię A, a różni się od niej sposobem dziedziczenia, w każdym przypadku podejrzenia VWD 2N konieczne jest określenie sposobu dziedziczenia choroby.**

**Prawidłowe rozpoznanie typu 2N i wykluczenie hemofilii A jest konieczne dla zapewnienia prawidłowego leczenia. Typ 2N powinien być rozważany u wszystkich chorych z wrodzonym niedoborem FVIII niezwiązanym z chromosomem X.**

## Leczenie

U chorych z 2N VWD stosuje się koncentraty VWF/FVIII bądź DDAVP (desmopresyna, 1-deamino-8D-argininowazopresyna) — syntetyczną pochodną hormonu antydiuretycznego, tj. wazopresyny [72–75]. Federici i wsp. [75] wykazali, że reakcja na DDAVP zależy od typu mutacji sprawczej i wyjściowego stężenia FVIII. U chorych z 2N VWD po iniekcji DDAVP — FVIII może wzrastać 3–20 razy. Zazwyczaj dobra odpowiedź na DDAVP następuje u chorych z mutacją R854Q i aktywnością FVIII większą lub równą 30 IU/dl. U osób z aktywnością poniżej 10 IU/dl odpowiedź na DDAVP jest niewystarczająca dla zapewnienia prawidłowej hemostazy; najczęściej jest bardzo słaba lub jej nie ma.

**U chorych z typem 2N VWD wzrost FVIII po podaniu DDAVP jest krótkotrwały, a czas przeżycia FVIII znacznie skrócony (2,4–4,4 godz.) [49].**

U pacjentów, którzy nie reagują na DDAVP lub u których istnieją przeciwwskazania do stosowania tego leku, stosuje się koncentraty VWF zawierające FVIII. Koncentraty FVIII niezawierające VWF mogą być niewystarczające, ponieważ czas półtrwania przetaczanego FVIII jest skrócony [49].

## Podsumowanie

Choroba von Willebranda typu 2N występuje stosunkowo rzadko. Jest dziedziczona autosomalnie

recesywnie. Skaza krwotoczna występuje głównie u homozygot, natomiast większość heterozygot jest bezobjawowa. Fenotypowo VWD 2N przypomina hemofilię A, lecz różni się od niej sposobem dziedziczenia. Rozpoznawanie laboratoryjne VWD 2N opiera się głównie na stwierdzeniu obniżenia aktywności VIII:C nieproporcjonalnie do stężenia antygeny VWF (VIII:C/VWF:Ag < 0,6), upośledzeniu wiązania VWF-FVIII (VWF:VIII B) i autosomalnie recesywnym sposobie dziedziczenia defektu. Obecność mutacji w domenach D'D3 VWF potwierdza 2N VWD, ale brak mutacji jej nie wyklucza.

## Piśmiennictwo

1. Von Willebrand E.A. Hereditär pseudohemophili. Finska Lakarskapskapets Handlingar 1926; 57: 87–112.
2. Nilsson IM. The history of von Willebrand disease. Haemophilia. 1999; 5 Suppl 2: 7–11, indexed in Pubmed: [23401894](#).
3. Keeney S, Cumming AM. The molecular biology of von Willebrand disease. Clin Lab Haematol. 2001; 23(4): 209–230, indexed in Pubmed: [11683782](#).
4. 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](#).
5. Ruggeri ZM, Zarpellon A, Roberts JR, et al. Working Party on von Willebrand Disease Classification. Structure and function of von Willebrand factor. Thromb Haemost. 1999; 82(2): 576–584, indexed in Pubmed: [10605754](#).
6. 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](#).
7. Zimmerman TS, Ratnoff OD, Powell AE. Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor 8 deficiency) and von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. J Clin Invest. 1971; 50(1): 244–254, doi: [10.1172/JCI106480](#), indexed in Pubmed: [5543879](#).
8. 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](#).
9. Lynch DC, Zimmerman TS, Collins CJ, et al. Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor: authentication by a new method. Cell. 1985; 41(1): 49–56, indexed in Pubmed: [3873280](#).
10. Sadler JE, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, et al. Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985; 82(19): 6394–6398, indexed in Pubmed: [2864688](#).
11. Verweij CL, de Vries CJ, Distel B, et al. Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene. Nucleic Acids Res. 1985; 13(13): 4699–4717, indexed in Pubmed: [3875078](#).
12. Schneppenheim R, Budde U. von Willebrand factor: the complex molecular genetics of a multidomain and multifunctional protein. J Thromb Haemost. 2011; 9 Suppl 1: 209–215, doi: [10.1111/j.1538-7836.2011.04324.x](#), indexed in Pubmed: [21781257](#).



13. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67: 395–424, doi: [10.1146/annurev.biochem.67.1.395](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.395), indexed in Pubmed: [9759493](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9759493/).
14. Holmberg L, Nilsson IM, Holmberg L, et al. Genetic variants of von Willebrand's disease. *Br Med J.* 1972; 3(5822): 317–320, indexed in Pubmed: [4537952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4537952/).
15. Goodeve AC. The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Rev.* 2010; 24(3): 123–134, doi: [10.1016/j.blre.2010.03.003](https://doi.org/10.1016/j.blre.2010.03.003), indexed in Pubmed: [20409624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20409624/).
16. Goodeve A. Diagnosing von Willebrand disease: genetic analysis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016; 2016(1): 678–682, doi: [10.1182/asheducation-2016.1.678](https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.678), indexed in Pubmed: [27913546](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27913546/).
17. Sadler JEA. revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on osis and asis. *Thromb Haemost.* 1994; 71: 520–525.
18. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JCJ, et al. Working Party on von Willebrand Disease Classification. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost.* 2006; 4(10): 2103–2114, doi: [10.1111/j.1538-7836.2006.02146.x](https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02146.x), indexed in Pubmed: [16889557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16889557/).
19. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, et al. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1989; 264(33): 19514–19527, indexed in Pubmed: [2584182](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2584182/).
20. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, et al. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry.* 1991; 30(1): 253–269, indexed in Pubmed: [1988024](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1988024/).
21. 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](https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01848.x), indexed in Pubmed: [18786007](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18786007/).
22. 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.0000000000000065](https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000065), indexed in Pubmed: [24448155](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24448155/).
23. Fay PJ. Factor VIII structure and function. *Int J Hematol.* 2006; 83(2): 103–108, doi: [10.1532/IJH97.05113](https://doi.org/10.1532/IJH97.05113), indexed in Pubmed: [16513527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16513527/).
24. Fay PJ. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Rev.* 2004; 18(1): 1–15, indexed in Pubmed: [14684146](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14684146/).
25. Koedam JA, Meijers JC, Sixma JJ, et al. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. *J Clin Invest.* 1988; 82(4): 1236–1243, doi: [10.1172/JCI113721](https://doi.org/10.1172/JCI113721), indexed in Pubmed: [2971673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2971673/).
26. Koedam JA, Hamer RJ, Beeser-Visser NH, et al. The effect of von Willebrand factor on activation of factor VIII by factor Xa. *Eur J Biochem.* 1990; 189(2): 229–234, indexed in Pubmed: [2110896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2110896/).
27. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood.* 1998; 92(11): 3983–3996, indexed in Pubmed: [9834200](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9834200/).
28. Terraube V, O'Donnell JS, Jenkins PV. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia.* 2010; 16(1): 3–13, doi: [10.1111/j.1365-2516.2009.02005.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2009.02005.x), indexed in Pubmed: [19473409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19473409/).
29. Shiltagh N, Kirkpatrick J, Cabrita LD, et al. Solution structure of the major factor VIII binding region on von Willebrand factor. *Blood.* 2014; 123(26): 4143–4151, doi: [10.1182/blood-2013-07-517086](https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-517086), indexed in Pubmed: [24700780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24700780/).
30. van Meegeren MER, Mancini TL, Schoormans SCM, et al. Clinical phenotype in genetically confirmed von Willebrand disease type 2N patients reflects a haemophilia A phenotype. *Haemophilia.* 2015; 21(5): e375–e383, doi: [10.1111/hae.12733](https://doi.org/10.1111/hae.12733), indexed in Pubmed: [26207643](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26207643/).
31. Mazurier C, Dieval J, Jorieux S, et al. A new von Willebrand factor (vWF) defect in a patient with factor VIII (FVIII) deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet vWF. Characterization of abnormal vWF/FVIII interaction. *Blood.* 1990; 75(1): 20–26, indexed in Pubmed: [2104761](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2104761/).
32. Mazurier C, Gaucher C, Jorieux S, et al. Evidence for a von Willebrand factor defect in factor VIII binding in three members of a family previously misdiagnosed mild haemophilia A and haemophilia A carriers: consequences for therapy and genetic counselling. *Br J Haematol.* 1990; 76(3): 372–379, indexed in Pubmed: [2124499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2124499/).
33. Nishino M, Girma JP, Rothschild C, et al. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood.* 1989; 74(5): 1591–1599, indexed in Pubmed: [2506947](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2506947/).
34. Casonato A, Pontara E, Sartorello F, et al. Interaction of factor VIII and von Willebrand factor investigated in a large cohort of von Willebrand disease patients: evaluation of type 2N prevalence. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1: 0093 (ab).
35. Casonato A, Daidone V, Barbon G, et al. A common ancestor more than 10,000 years old for patients with R854Q-related type 2N von Willebrand's disease in Italy. *Haematologica.* 2013; 98(1): 147–152, doi: [10.3324/haematol.2012.066019](https://doi.org/10.3324/haematol.2012.066019), indexed in Pubmed: [22875612](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22875612/).
36. Mazurier C, Goudemand J, Hilbert L, et al. Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001; 14(2): 337–347, doi: [10.1053/beha.2001.0138](https://doi.org/10.1053/beha.2001.0138), indexed in Pubmed: [11686103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11686103/).
37. Casonato A, Galletta E, Sarolo L, et al. Type 2N von Willebrand disease: Characterization and diagnostic difficulties. *Haemophilia.* 2018; 24(1): 134–140, doi: [10.1111/hae.13366](https://doi.org/10.1111/hae.13366), indexed in Pubmed: [29115006](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29115006/).
38. Koppelman SJ, van Hoeij M, Vink T, et al. The affinity and stoichiometry of binding of human factor VIII to von Willebrand factor. *Blood.* 1995; 85(11): 3150–3157, indexed in Pubmed: [7756647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7756647/).
39. Schneppenheim R, Budde U, Krey S, et al. Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1. *Thromb Haemost.* 1996; 76(4): 598–602, indexed in Pubmed: [8903002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8903002/).
40. Qin HH, Xing ZF, Wang XF, et al. Similarity in joint and mucous bleeding syndromes in type 2N von Willebrand disease and severe hemophilia A coexisting with type 1 von Willebrand disease in two Chinese pedigrees. *Blood Cells Mol Dis.* 2014; 52(4): 181–185, doi: [10.1016/j.bcmd.2013.11.005](https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.11.005), indexed in Pubmed: [24351655](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24351655/).
41. Allan JN, Friedman KD, DeSancho MT. Life-threatening bleeding in a patient with mild hemophilia A and heterozygosity for von Willebrand disease Type 2N. *Int J Hematol.* 2014; 100(6): 602–606, doi: [10.1007/s12185-014-1662-3](https://doi.org/10.1007/s12185-014-1662-3), indexed in Pubmed: [25212677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25212677/).
42. Laffan M, Brown SA, Collins PW, et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Cen-

- tre Doctors' Organization. *Haemophilia*. 2004; 10(3): 199–217, doi: [10.1111/j.1365-2516.2004.00894.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2004.00894.x), indexed in Pubmed: [15086318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15086318/).
43. Tuley EA, Gaucher C, Jorieux S, et al. Expression of von Willebrand factor „Normandy”: an autosomal mutation that mimics hemophilia A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(14): 6377–6381, indexed in Pubmed: [1906179](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1906179/).
  44. Michiels JJ, Gadisseur A, Vangenegten I, et al. Recessive von Willebrand disease type 2 Normandy: variable expression of mild hemophilia and VWD type 1. *Acta Haematol*. 2009; 121(2-3): 119–127, doi: [10.1159/000214852](https://doi.org/10.1159/000214852), indexed in Pubmed: [19506358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19506358/).
  45. Casonato A, Sartorello F, Cattini MG, et al. An Arg760Cys mutation in the consensus sequence of the von Willebrand factor propeptide cleavage site is responsible for a new von Willebrand disease variant. *Blood*. 2003; 101(1): 151–156, doi: [10.1182/blood-2002-04-1046](https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1046), indexed in Pubmed: [12393698](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12393698/).
  46. Casonato A, Pontara E, Sartorello F, et al. Identifying carriers of type 2N von Willebrand disease: procedures and significance. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2007; 13(2): 194–200, doi: [10.1177/1076029606299000](https://doi.org/10.1177/1076029606299000), indexed in Pubmed: [17456630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17456630/).
  47. Jorieux S, Gaucher C, Goudemand J, et al. A novel mutation in the D3 domain of von Willebrand factor markedly decreases its ability to bind factor VIII and affects its multimerization. *Blood*. 1998; 92(12): 4663–4670, indexed in Pubmed: [9845532](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9845532/).
  48. Meyer D, Fressinaud E, Gaucher C, et al. Gene defects in 150 unrelated French cases with type 2 von Willebrand disease: from the patient to the gene. *INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. Thromb Haemost*. 1997; 78(1): 451–456, indexed in Pubmed: [9198195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9198195/).
  49. Caron C, Goudemand J. Type 2N von Willebrand disease: clinical, therapeutical and laboratory aspects. *Von Willebrand Disease. Clinical and Laboratory Aspects*. 2012; 2: 12–15.
  50. Veyradier A, Boisseau P, Fressinaud E, et al. French Reference Center for von Willebrand disease. A Laboratory Phenotype// Genotype Correlation of 1167 French Patients From 670 Families With von Willebrand Disease: A New Epidemiologic Picture. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(11): e3038, doi: [10.1097/MD.0000000000003038](https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003038), indexed in Pubmed: [26986123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26986123/).
  51. Fidalgo T, Salvado R, Corrales I, et al. Genotype-phenotype correlation in a cohort of Portuguese patients comprising the entire spectrum of VWD types: impact of NGS. *Thromb Haemost*. 2016; 116(1): 17–31, doi: [10.1160/TH15-07-0604](https://doi.org/10.1160/TH15-07-0604), indexed in Pubmed: [26988807](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26988807/).
  52. Hilbert L, Nurden P, Caron C, et al. INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. Type 2N von Willebrand disease due to compound heterozygosity for R854Q and a novel R763G mutation at the cleavage site of von Willebrand factor propeptide. *Thromb Haemost*. 2006; 96(3): 290–294, doi: [10.1160/TH06-03-0157](https://doi.org/10.1160/TH06-03-0157), indexed in Pubmed: [16953269](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16953269/).
  53. Schneppenheim R, Lenk H, Obser T, et al. Recombinant expression of mutations causing von Willebrand disease type Normandy: characterization of a combined defect of factor VIII binding and multimerization. *Thromb Haemost*. 2004; 92(1): 36–41, doi: [10.1160/TH04-02-0084](https://doi.org/10.1160/TH04-02-0084), indexed in Pubmed: [15213842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15213842/).
  54. Allen S, Abuzenadah AM, Blagg JL, et al. Two novel type 2N von Willebrand disease-causing mutations that result in defective factor VIII binding, multimerization, and secretion of von Willebrand factor. *Blood*. 2000; 95(6): 2000–2007, indexed in Pubmed: [10706867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10706867/).
  55. Pontara E, Gresele P, Cattini MG, et al. Spontaneous hemarthrosis in combined Glanzmann thrombasthenia and type 2N von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2014; 25(4): 401–404, doi: [10.1097/MBC.000000000000067](https://doi.org/10.1097/MBC.000000000000067), indexed in Pubmed: [24418945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24418945/).
  56. Casonato A, Pontara E, Sartorello F, et al. Combined hemophilia A and type 2 von Willebrand's disease: defect of both factor VIII level and factor VIII binding capacity of von Willebrand factor. *Haematologica*. 2001; 86(10): 1110–1111, indexed in Pubmed: [11602423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11602423/).
  57. Castaman G, Bertocello K, Bernardi M, et al. Pregnancy and delivery in patients with homozygous or heterozygous R854Q type 2N von Willebrand disease. *J Thromb Haemost*. 2005; 3(2): 391–392, doi: [10.1111/j.1538-7836.2005.01162.x](https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01162.x), indexed in Pubmed: [15670054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15670054/).
  58. Dennis MW, Clough V, Toh CH. Unexpected presentation of type 2N von Willebrand disease in pregnancy. *Haemophilia*. 2000; 6(6): 696–697, indexed in Pubmed: [11122399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11122399/).
  59. de Jong A, Eikenboom J. Von Willebrand disease mutation spectrum and associated mutation mechanisms. *Thromb Res*. 2017; 159: 65–75, doi: [10.1016/j.thromres.2017.09.025](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2017.09.025), indexed in Pubmed: [28987708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28987708/).
  60. Hampshire DJ, Goodeve AC. The international society on thrombosis and haemostasis von Willebrand disease database: an update. *Semin Thromb Hemost*. 2011; 37(5): 470–479, doi: [10.1055/s0031-1281031](https://doi.org/10.1055/s0031-1281031), indexed in Pubmed: [22102189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22102189/).
  61. Mazurier C, Meyer D. Factor VIII binding assay of von Willebrand factor and the diagnosis of type 2N von Willebrand disease—results of an international survey. On behalf of the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost*. 1996; 76(2): 270–274, indexed in Pubmed: [8865544](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8865544/).
  62. Federici AB, Bucciarelli P, Castaman G, et al. Management of inherited von Willebrand disease in Italy: results from the retrospective study on 1234 patients. *Semin Thromb Hemost*. 2011; 37(5): 511–521, doi: [10.1055/s-0031-1281037](https://doi.org/10.1055/s-0031-1281037), indexed in Pubmed: [22102194](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22102194/).
  63. Favaloro EJ, Mohammed S, Koutts J. Identification and prevalence of von Willebrand disease type 2N (Normandy) in Australia. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2009; 20(8): 706–714, doi: [10.1097/MBC.0b013e328332d022](https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e328332d022), indexed in Pubmed: [19809303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19809303/).
  64. Ghosh K, Trasi S, Shetty S, et al. Use of a new enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of type 2N von Willebrand disease and its prevalence in an Indian population. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006; 17(1): 7–11, doi: [10.1097/01.mbc.0000198048.42634.5a](https://doi.org/10.1097/01.mbc.0000198048.42634.5a), indexed in Pubmed: [16607072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16607072/).
  65. Morales-De la Vega A, Reyes-Maldonado E, Martínez-Murillo C, et al. [Type 2N von Willebrand disease (Normandy)]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2008; 46(1): 55–62, indexed in Pubmed: [18647572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18647572/).
  66. Bykowska K. Klasyfikacja i diagnostyka choroby von Willebranda. 2013; 4: 24–34.
  67. Casonato A, Pontara E, Zerbinati P, et al. The evaluation of factor VIII binding activity of von Willebrand factor by means of an ELISA method: significance and practical implications. *Am J Clin Pathol*. 1998; 109(3): 347–352, indexed in Pubmed: [9495210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9495210/).
  68. Caron C, Mazurier C, Goudemand J. Large experience with a factor VIII binding assay of plasma von Willebrand factor using commercial reagents. *Br J Haematol*. 2002; 117(3): 716–718, indexed in Pubmed: [12028048](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12028048/).
  69. Veyradier A, Caron C, Ternisien C, et al. Validation of the first commercial ELISA for type 2N von Willebrand's disease diagnosis. *Haemophilia*. 2011; 17(6): 944–951, doi: [10.1111/j.1365-2516.2011.02499.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2011.02499.x), indexed in Pubmed: [21371195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21371195/).

70. Favaloro EJ. Laboratory identification of von Willebrand disease: technical and scientific perspectives. *Semin Thromb Hemost.* 2006; 32(5): 456–471, doi: [10.1055/s-2006-947859](https://doi.org/10.1055/s-2006-947859), indexed in Pubmed: [16862518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16862518/).
71. Favaloro EJ, Lillicrap D, Lazzari MA, et al. von Willebrand disease: laboratory aspects of diagnosis and treatment. *Haemophilia.* 2004; 10 Suppl 4: 164–168, doi: [10.1111/j.1365-2516.2004.00979.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2004.00979.x), indexed in Pubmed: [15479392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15479392/).
72. Mannucci PM, Ruggeri ZM, Pareti FI, et al. 1-Deamino-8-d-arginine vasopressin: a new pharmacological approach to the management of haemophilia and von Willebrands' diseases. *Lancet.* 1977; 1(8017): 869–872, indexed in Pubmed: [67283](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/67283/).
73. Rodeghiero F, Castaman G, Mannucci PM. Clinical indications for desmopressin (DDAVP) in congenital and acquired von Willebrand disease. *Blood Rev.* 1991; 5(3): 155–161, indexed in Pubmed: [1777748](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1777748/).
74. Federici AB. The use of desmopressin in von Willebrand disease: the experience of the first 30 years (1977-2007). *Haemophilia.* 2008; 14 Suppl 1: 5–14, doi: [10.1111/j.1365-2516.2007.01610.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2007.01610.x), indexed in Pubmed: [18173689](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18173689/).
75. Federici AB, Mazurier C, Berntorp E, et al. Biologic response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease: results of a multicenter European study. *Blood.* 2004; 103(6): 2032–2038, doi: [10.1182/blood-2003-06-2072](https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-2072), indexed in Pubmed: [14630825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14630825/).