

# Choroba von Willebranda typu 2M. Problemy klasyfikacyjne i diagnostyczne

## Type 2M von Willebrand disease. Classification and diagnostic problems

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

<sup>1</sup>Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych,

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

### Streszczenie

Choroba von Willebranda (VWD) typu 2M to skaza krwotoczna dziedziczona autosomalnie dominująco. Jej cechą charakterystyczną jest zmniejszona interakcja między czynnikiem von Willebranda (VWF) i płytkami krwi, która nie wynika z utraty wielkocząsteczkowych multimerów VWF. Typ 2M VWD występuje u 5–10% ogółu pacjentów z VWD i często jest mylony z typem 1 lub typem 2A VWD. Podłożem skazy krwotocznej są mutacje zmiany sensu i delecje występujące w domenie A1 (w miejscu wiązania z glikoproteiną Ib i kolagenem) oraz, znacznie rzadziej, w domenie A3 (miejsce wiązania kolagenu) VWF. Laboratoryjnie typ 2M VWD charakteryzuje się upośledzoną agregacją z ryostocetyną, prawidłowym/upośledzonym wiązaniem z kolagenem, obniżoną aktywnością VWF:RCo, ilorazem VWF:RCo/VWF:Ag poniżej 0,7 i prawidłową dystrybucją multimerów VWF.

Typ 2M VWD jest szczególnie trudny do diagnostyki, ponieważ muszą być w nim uwzględnione nie tylko zaburzenia wiązania VWF z receptorem GPIIb/IIIa płytek krwi (VWF:RCo), ale także zaburzenia wiązania VWF z podśródbłonkowym kolagenem (VWF:CB). Dodatkowo, konieczność wykonania analizy multimerów VWF powoduje, że typ 2M VWD jest rozpoznawany najczęściej jedynie w wysokospecjalistycznych laboratoriach.

Rozpoznanie typu 2M może mieć znaczenie w wyborze sposobu leczenia. W piśmiennictwie leczenie DDAVP jest oceniane różnie. U części chorych może być ono mało skuteczne ze względu na szybki klirens VWF z osocza. Leczenie koncentratami czynnika VIII zawierającymi VWF jest natomiast identyczne jak w typie 1 i 2A VWD.

**Słowa kluczowe:** choroba von Willebranda (VWD), klasyfikacja, choroba von Willebranda 2M, diagnostyka fenotypowa, leczenie

*J. Transf. Med.* 2018; 11: 100–111

### Summary

Type 2M von Willebrand disease (type 2M VWD) is an autosomally dominant inherited bleeding disorder characterized by a decrease in the affinity of the Willebrand factor (VWF) for platelets in the absence of any deficiency of high molecular weight (HMW) VWF multimers. Type 2M VWD accounts for 5–10% of the general population of patients with von Willebrand

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

*disease and is frequently misdiagnosed with type 1 and type 2A VWD. The underlying causes of this bleeding disorder are missense mutations and deletions in WVD-A1 domain (binding site for glycoprotein Ib and collagen) and much rarely in WVD-A3 domain (binding site for collagen). Laboratory characteristics of type 2M VWD include: lower ristocetin cofactor activity (VWF:RCo), normal/decreased collagen binding, discrepancy between VWF antigen and ristocetin activity (VWF:RCo/VWF:Ag rate < 0,7) and normal multimer distribution.*

*Diagnosis of type 2M VWD is particularly difficult as it should take into account not only defects in VWF binding with platelet receptor GPIb $\alpha$  (VWF:RCo) but also with epithelial collagen (VWF:CB). Furthermore, 2M VWD requires multimer analysis so it is predominantly recognized in high-tech laboratories.*

*Correct recognition of 2M VWD may have impact on the choice of therapy. Literature reports present disparity in the evaluation of 2M VWD treatment. In some 2M VWD patients treatment with desmopressin (DDAVP) is often ineffective due to increased VWF clearance from plasma. However, replacement therapy with concentrates containing FVIII and VWF has proved as effective as in type 1 and 2A VWD.*

**Key words:** von Willebrand disease (VWD), classification, von Willebrand disease 2M, phenotypic diagnosis, treatment

*J. Transf. Med. 2018; 11: 100–111*

## Wstęp

Choroba von Willebranda (VWD) jest najczęściej występującą skazą krwotoczną, bardzo heterogenną zarówno fenotypowo, jak i molekularnie. Częstość jej występowania określa się jako 1 na 100 w odniesieniu do całej grupy chorych z VWD (objawowych i bezobjawowych) i 1 na 10 tys. w przypadku pacjentów objawowych. Występuje we wszystkich grupach etnicznych, a objawy kliniczne mogą manifestować się w każdym wieku [1].

Podłożem skazy krwotocznej w VWD jest złożony defekt syntezy, struktury i funkcji osoczowego białka — czynnika von Willebranda (VWF). Czynnikiem von Willebranda to białko o strukturze multimerycznej, którego podstawową podjednostką jest monomer. Monomer jest zbudowany z powtarzających się domen (A, B, C, D), zawierających sekwencje odpowiedzialne za udział VWF w procesie hemostazy pierwotnej (adhezja i agregacja płytek krwi; domeny A1, A3, C1) i hemostazy wtórnej (krzepnięcie krwi; domeny D'D3) [2].

## Objawy kliniczne choroby von Willebranda

Charakterystycznymi objawami VWD są nadmierne krwawienia skórno-słuzówkowe, siniaczenie, przedłużone, nawracające krwawienia z nosa, krwawienia z dziąseł, krwotoczne miesiączki, przedłużone krwawienia po urazach, po porodzie, krwawienia z przewodu pokarmowego, po zabie-

gach chirurgicznych i ekstrakcji zębów [3, 4]. VWD jest diagnozowana u około 5–20% kobiet z krwotocznymi miesiączkami [4, 5]. Krwawienia i mutacje genu VWF występują najczęściej u pacjentów z aktywnością VWF:RCo poniżej 30 j/dL. Uważa się, że przyczyną ciężkich krwawień u chorych z niewielkim niedoborem VWF (30–40%) może być obecność dodatkowego defektu hemostazy [6]. Wylewy do mięśni i stawów pojawiają się zazwyczaj u osób ze stężeniem czynnika VIII (FVIII:C) niższym niż 10 IU/dl (VWD 2N i VWD 3). Objawy kliniczne VWD mogą pojawiać się w różnym wieku, w zależności od typu VWD. W typie ciężkim (typ 3 VWD) skaza krwotoczna pojawia się bardzo wcześnie, natomiast w typie 1 VWD może nie być rozpoznana aż do wieku średniego, nawet mimo występowania małych epizodów krwotocznych.

Choć udowodniono, że u osób zdrowych i z typem 1 VWD wraz z wiekiem stopniowo wzrasta stężenie VWF i czynnika VIII (FVIII, VIII:C), dalej nie wiadomo, jaki ma to wpływ na obraz kliniczny choroby. Dotychczasowe doniesienia na temat wpływu starzenia się organizmu na objawy skazy krwotocznej u chorych z VWD często bywają ze sobą sprzeczne, co wynika w dużej części ze współistnienia zmian patofizjologicznych niezależnych od VWD, a towarzyszących procesowi starzenia [7–10].

W 2008 roku amerykański Narodowy Instytut Zdrowia opublikował dane [11] rekomendujące rozpoznawanie choroby VWD u pacjentów z VWF:Ag

**Tabela 1.** Podłoże molekularne choroby von Willebranda (VWD) [16–19]**Table 1.** Molecular background of von Willebrand disease [16–19]

Typ VWD wg Sadler [1]	Dziedziczenie	Miejsca najczęściej występujących mutacji
VWD1	Autosomalne dominujące	Mutacje zmiany sensu (85%) <i>Allele null</i> (15%) Zróżnicowany stopień penetracji genu
VWD2A	Autosomalne dominujące lub autosomalne recesywne	Mutacje zmiany sensu, głównie w domenach A1, A2, D3 i CK Mutacje zmiany sensu w propeptydzie
VWD2B	Autosomalnie dominujące	Mutacje zmiany sensu w domenach A1 (ekson 28; 86%) i D3 (ekson 28; 14%)
VWD2M	Autosomalne dominujące	Mutacje zmiany sensu i małe delecje w ramce odczytu w domenie A1
VWD2N	Autosomalne recesywne	Mutacje zmiany sensu w domenach D' i D3
VWD3	Autosomalne recesywne	Głównie <i>allele null</i> (80–90%), duże-małe delecje; mutacje nonsensowne, zmiany sensu, przesunięcie ramki odczytu

lub VWF:RCo mniejszym lub równym 30 IU/dl oraz zaliczenie osób z aktywnością VWF:RCo 30–50 IU/dl i łagodną skazą skórno-śluzówkową do grupy pacjentów z niskim stężeniem VWF (*low VWF level*) i niskim ryzykiem krwawień [11–14].

### Podłoże molekularne choroby von Willebranda

Choroba von Willebranda dziedziczy się autosomalnie dominująco lub recesywnie. Synteza VWF przebiega pod kontrolą genu znajdującego się na końcu krótkiego ramienia chromosomu 12 (12p13.2). Analizę molekularną VWF komplikuje obecność pseudogenu zlokalizowanego na chromosomie 22q11.2. Pseudogen koresponduje do eksonów 23–34 genu VWF i wykazuje z nim 97-procentową homologię [15].

Mutacje odpowiedzialne za VWD występują na prawie całej długości genu VWF. Najczęściej są to mutacje zmiany sensu, nonsensowne, małe delecje, insercje, mutacje w miejscu składania eksonów (*splice-site*), a także allele *null* (tab. 1). Chorzy są homozygotami, heterozygotami lub złożonymi heterozygotami defektu. Ekspresja i penetracja mutacji jest bardzo różna i brak mutacji nie wyklucza rozpoznania VWD. W typie 1 VWD mutacje punktowe są wykrywane u około 65% chorych [16–19]. Nie wszyscy chorzy, u których wykryto mutacje genu VWF, wykazują objawy kliniczne (niekompletna penetracja). U chorych z VWD, wywiadem rodzinnym skazy krwotocznej i obniżonym poziomem VWF w osoczu objawy skazy krwotocznej mogą być nasilone w różnym stopniu [20, 21].

Miejsce wystąpienia mutacji ma związek nie tylko ze zmianą funkcji biologicznej VWF, ale także z odpowiedzią na leczenie, na przykład iniekcjami desmopresyny (DDAVP, *1-deamino-8-D-arginine vasopressin*). Wykazano, że najwyższe wzrosty i skrócony czas przeżycia VWF po podaniu DDAVP mają pacjenci z mutacjami w domenie D'D3, natomiast pacjenci odpowiadający na DDAVP jedynie częściowym wzrostem VIII:C i VWF (lub nieodpowiadający wcale) mają zazwyczaj mutacje w domenach A1–A3 [22, 23].

### Klasyfikacja choroby von Willebranda

Pierwszą fenotypową klasyfikację VWD opracowano w roku 1994 [24] (tab. 2). Klasyfikacja ta opiera się głównie na oznaczeniu aktywności prokoagulacyjnej czynnika VIII (VIII:C), antygeny VWF (VWF:Ag), oznaczenia kofaktora rystocetyny (VWF:RCo), testu RIPA (*ristocetin-induced platelet aggregation*) i multimerów VWF w żelu agarowym o niskiej rozdzielczości (*low resolution gel*). Wydzielono w niej trzy główne typy VWD: dwa ilościowe (typ 1 i typ 3) i jeden jakościowy (typ 2, obejmujący podtypy: 2A, 2B, 2M i 2N).

Klasyfikacja według Sadler [24] uzyskała rekomendację Komitetu do spraw Standaryzacji Czynnika von Willebranda (VWF-SSC, *von Willebrand Factor Scientific Standardization Committee*) Międzynarodowego Towarzystwa do spraw Zakrzepic i Hemostazy (ISTH, *International Society on Thrombosis and Haemostasis*). Chociaż w 2006 roku klasyfikację tę zmodyfikowano [25], to jednak jest ona już niewystarczająca do właściwego, a jednocześnie przejrzystego zróżnicowania wszystkich

**Tabela 2.** Klasyfikacja choroby von Willebranda (VWD) według Sadler (1994) [24]**Table 2.** Von Willebrand disease (VWD) classification according to Sadler (1994) [24]

VWD			
Typ	Podtyp	Charakterystyka defektu	Warianty VWD
1		Częściowy, ilościowy niedobór VWF, VWF:RCo/VWF:Ag $\geq 0,7$	I, I z prawidłowymi płytkami, I z niską liczbą płytek, IA, I-1, I-2, I-3
2		Defekt jakościowy VWF, VWF:RCo/VWF:Ag $< 0,7$	
	2A	Upośledzona adhezja płytek zależna od VWF, niedobór wielkocząsteczkowych multimerów VWF	IIA, IB, I z nieprawidłową liczbą płytek, IIC, IID, IIE, IIF, IIG, IIH
	2B	Zwiększone powinowactwo do płytkowej glikoproteiny GPIb	IIB, 1 New York, 1 Malmo, I Sydney
	2M	Upośledzona adhezja płytek zależna od VWF bez selektywnego niedoboru wielkocząsteczkowych multimerów VWF	B, IC, ID, Vicenza
	2N	Znaczące obniżenie wiązania FVIII przez VWF	Normandy
3		Całkowity brak VWF; VWF:Ag poniżej progu detekcji [17]	III

typów VWD. W dalszym ciągu pozostało nierozwiązanych wiele problemów diagnostycznych, na przykład takich jak prawidłowe zakwalifikowanie typu 1C (*clearance*) czy zróżnicowanie typu 2M VWD z typem 1 lub typem 2A.

W roku 2016 kilka czołowych laboratoriów europejskich przygotowało propozycję nowej klasyfikacji VWD — *European Clinical Laboratory and Molecular (ECLM) classification* — według rekomendacji zespołu: Budde, Schnepfenheim, Michiels i Gadisseur [26] (tab. 3). Nowa klasyfikacja jest bardziej skomplikowana niż ta według Sadler [24, 25]. Dodatkowo wyróżnia ona typ 1 Vicenza i autosomalnie recesywny typ 1 ciężki, natomiast w typie 2 — podtypy 2C, 2D, 2E i 2M-CBD (z defektem wiązania kolagenu).

Klasyfikacja ECLM [26] wyróżnia zamiast jednego aż dwa podtypy 2M VWD (2M i 2M-CBD), zwracając tym samym uwagę na trudności w prawidłowym rozpoznawaniu tej skazy krwotocznej. Diagnostyka 2M VWD musi bowiem uwzględniać zaburzenia wiązania VWF nie tylko z receptorem GPIIb $\alpha$  płytek krwi, ale także z podśródbłonkowym kolagenem typu I, III, IV i VI. Wykonanie tylko jednego z tych testów nie pozwala na wykluczenie lub potwierdzenie VWD 2M u wszystkich chorych, ponieważ test wiązania kolagenu VWF:CB nie wykrywa defektu wiązania płytek, a VWF:RCo — defektów wiązania kolagenu. Dodatkowo, konieczność wykonania analizy multimerów VWF powoduje, że typ 2M VWD jest prawidłowo rozpoznawany najczęściej jedynie w wysokospecjalistycznych laboratoriach.

### Choroba von Willebranda typu 2M

W fenotypowej klasyfikacji z 1994 roku [24] typ 2M VWD jest zdefiniowany jako jakościowy wariant VWD charakteryzujący się upośledzoną aglutynacją/agregacją płytek krwi pod wpływem ryostocetyny przy prawidłowej dystrybucji multimerów VWF. Multimery w typie 2M VWD mają prawidłową wielkość lub są nawet nieco większe niż normalne, natomiast ich linie satelitarne są najczęściej nieprawidłowe, co wskazuje na obecność nieprawidłowych podjednostek VWF — tak jak w zaliczanych do typu 2M wariantach VWD.

Typ 2M VWD to skaza krwotoczna spowodowana jakościowym defektem cząsteczki VWF upośledzającym wiązanie VWF z płytkowym receptorem GPIIb i/lub podśródbłonkowym kolagenem. Stanowi on 5–10% pacjentów z VWD [27] i jest często mylony z typem 1 VWD i typem 2A VWD. W przeciwieństwie do typu 2A zmniejszenie interakcji między VWF a płytkami krwi nie wynika z utraty wielkocząsteczkowych multimerów VWF.

Obraz kliniczny 2M VWD charakteryzuje się typowymi dla VWD łagodnymi/umiarkowanymi krwawieniami skórno-słuzówkowymi. U chorych stosunkowo często występują krwawienia z nosa, a u kobiet — krwotoczne miesiączki. Krwawienia są łagodniejsze niż w typie 2A VWD, lecz cięższe niż w typie 1 VWD [28]. Ciężka skaza krwotoczna pojawia się głównie u osób z bardzo niskimi stęże-



**Tabela 3.** Choroba von Willebranda (VWD) według klasyfikacji opracowanej przez Kliniczne i Molekularne Laboratoria w roku 2016 [26]**Table 3.** Von Willebrand disease (VWD) according to the European Clinical Laboratory and Molecular Classification from 2016 [26]

Typ	Charakterystyka
1	VWF:Ag < 35%; prawidłowy VWF:CB/VWF:Ag; VWF:RCo/VWF:Ag > 0,7 Pacjenci z VWF:Ag > 35% z ciężką skazą krwotoczną
1	Autosomalno-dominujący defekt klirensu (typ Vicenza)
1 ciężki	Autosomalnie recesywny — VWF:Ag i VWF:RCo < 5%; wysoki iloraz FVIII/VWF po DDAVP
2	Autosomalnie dominujący; VWF:RCo/VWF:Ag < 0,7 dla 2A, 2B, 2E, 2D, 2M
2A	Niedobór HMWM w wyniku proteolizy związany z mutacją w domenie A2; nieprawidłowe triplety
2B	Podwyższony RIPA (0,8 mg/ml), trombocytopenia, mutacja w domenie A1 VWF
2C	Autosomalna recesywna, defekt uwalniania (zwiększony iloraz FVIII:C/VWF:Ag); brak HMWM w wyniku defektu multimeryzacji spowodowanego hetero- i homozygotycznymi mutacjami w domenach D1 i D2
2D	Niedobór HMWM; nieparzysta liczba monomerów; nieprawidłowe prążki w analizie multimerów spowodowane mutacjami w C-końcowej domenie CK VWF
2E	Brak HMWM spowodowany defektem multimeryzacji i wzrostem klirensu; mutacje w domenie D3
2M	Iloraz VWF:RCo/VWF:Ag < 0,7; prawidłowy VWF:CB/VWF:Ag ≥ 0,7; upośledzony RIPA; mutacje w domenie A1
2M-CBD	Defekt wiązania kolagenu; VWF:RCo/VWF:Ag > 0,7; VWF:CB/VWF:Ag < 0,7; mutacje w domenie D3
2N	Autosomalny recesywny; FVIII:C/VWF:Ag < 0,5; defekt wiązania FVIII przez VWF; mutacje w domenie D'
3	Autosomalny recesywny; nieoznaczalny VWF:Ag i VIII:C

HMWM (*high molecular weight multimers*) — multimery o wysokiej masie cząsteczkowej; RIPA (*ristocetin-induced platelet aggregation*) — agregacja płytek indukowanych rystocetyną

niami VWF:RCo [29, 30]. Fenotypowo typ 2M jest często trudny do odróżnienia od typu 1 i typu 2A [31, 32] (tab. 4).

Początkowo większość wariantów 2M VWD zaliczano do typu 1 VWD. W roku 1994 w opracowanej przez Sadler [24] klasyfikacji VWD (tab. 1) po raz pierwszy do typu 2M VWD zaliczono następujące warianty VWD:

- Milwaukee [33] — jest spowodowany delecją R1392–Q1402 (Arg629–Gln639); charakteryzuje się obecnością prawidłowych multimerów oraz upośledzeniem wiązania z GPIIb;
- Vicenza [34, 35] — cechuje się obniżonym stężeniem VWF w osoczu, większą niż normalnie wielkością multimerów, znacznie zwiększonym klirensem, skróconym czasem przeżycia VWF i ilorazem VWF:RCo/VWF:Ag często powyżej 0,7 [35];
- B [36, 37] — charakteryzuje się prawidłową strukturą multimerów, upośledzonym VWF:RCo oraz mutacją G1324S (Gly561Ser); identyczny fenotyp spowodowany mutacją G1324A (Gly561Ala) opisali Meyer i wsp. [38];
- IC [39] i ID [40] — warianty te wyróżniano na podstawie charakterystycznych niewielkich

zmian w strukturze multimerów różnicowanych na podstawie elektroforezy w żelach o wysokiej rozdzielczości.

### Podłoże molekularne

Choroba von Willebranda typu 2M dziedziczy się autosomalnie dominująco i charakteryzuje się pełną penetracją nieprawidłowego genu. Jest spowodowana mutacjami występującymi najczęściej w domenie A1 [18, 19, 41], w której znajduje się miejsce wiązania glikoproteiny Ib [42] i kolagenu [43, 44]. Są to głównie mutacje zmiany sensu lub małe delecje w ramce odczytu w eksonie 28, w pełni penetrujące, upośledzające wiązanie z GPIIb i/albo z kolagenem.

Do 2017 roku opisano 83 mutacje typu 2M VWD, w tym 78 zmian sensu i pięć innych (mutacje w miejscu składania eksonów, delecje lub insercje) [19]. Mutacje zmiany sensu zachodzą głównie w dwusiarczkowej pętli domeny A1 (82%) między C1272 a C1458 (Cys509–Cys695), natomiast znacznie rzadziej — w domenie A3 (17%). Pozostałe

**Tabela 4.** Charakterystyka laboratoryjna choroby von Willebranda (VWD) — typów 1, 2A VWD i 2M VWD [32, 51, 54–56]**Table 4.** Laboratory characteristics of types 1, 2A and 2M von Willebrand disease (VWD) [32, 51, 54–56]

Badania laboratoryjne		VWD		
		Typ 1	Typ 2A	Typ 2M
Badania przesiewowe	PT	Prawidłowy	Prawidłowy	Prawidłowy
	APTT	Prawidłowy lub przedłużony w zależności od VIII:C	Prawidłowy lub przedłużony w zależności od VIII:C	Prawidłowy lub przedłużony w zależności od VIII:C
	Płytki krwi	Prawidłowe	Prawidłowe	Prawidłowe
	Czas okluzji	Przedłużony lub prawidłowy	Przedłużony lub brak okluzji	Przedłużony lub brak okluzji
Ustalenie typu VWD	FVIII:C	Obniżony lub prawidłowy	Obniżony lub prawidłowy	Prawidłowy lub obniżony
	VWF:Ag	< 50%	Obniżony lub prawidłowy	Prawidłowy lub obniżony
	VWF:RCo	< 50%	Obniżony < 30%	Obniżony
	VWF:CB	< 50%	Obniżony < 15%	Obniżony lub prawidłowy
	VWF:RCo/VWF:Ag	Prawidłowy > 0,7	Obniżony < 0,7	Obniżony < 0,7 (< 0,6)
	VWF:CB/VWF:Ag	Prawidłowy > 0,7	Obniżony < 0,7	Obniżony lub prawidłowy
Ustalenie podtypu	VWF:VIII B	Prawidłowy	Prawidłowy	Prawidłowy
	VIII/VWF:Ag	Prawidłowy	Prawidłowy	Prawidłowy
	Multimery	Prawidłowa dystrybucja	Niedobór HMWM lub IMWM, często nieprawidłowe prążki tripletów	Prawidłowa dystrybucja, sporadycznie multimery większe niż normalnie
	RIPA 0,5 mg/ml	Brak agregacji	Brak agregacji	Brak agregacji
	1,0 mg/ml	Obniżona/prawidłowa	Obniżona	Obniżona
1,5 mg/ml	Obniżona/prawidłowa	Obniżona	Obniżona	

APTT (*activated partial thromboplastin time*) — czas częściowej tromboplastyny po aktywacji; HMWM (*high molecular weight multimers*) — multimery o wysokiej masie cząsteczkowej; IMWM (*intermediate molecular weight multimers*) — multimery o średniej masie cząsteczkowej; PT (*prothrombin time*) — czas protrombinowy; RIPA (*ristocetin-induced platelet aggregation*) — agregacja płytek indukowanych rystocetyną

to mutacje w miejscu składania eksonów, a także delecje i insercje w domenach D3, A1 i A3. Według badań kanadyjskich najczęściej udaje się ustalić rodzaj mutacji u pacjentów, u których VWF:RCo/VWF:Ag jest mniejsze niż 0,4 [29].

**Mutacje upośledzające wiązanie GPIb.** Większość mutacji 2M VWD, powodujących defekt wiązania GPIb, to mutacje heterozygotyczne występujące na całej długości domeny A1 VWF [35]. Mutacje te albo upośledzają bezpośrednio wiązanie VWF do GP Ib (Ser1285Phe), albo hamują odślanianie domeny A1 w warunkach szybkiego przepływu krwi (Gly1324Ala i Gly1324Ser) [19, 45–47].

**Mutacje powodujące defekt wiązania kolagenu.** Mutacje wiązania kolagenu I i III występują w domenach A1 i A3, a w wypadku kolagenów IV i VI — w domenie A1 [19, 48–50].

## Diagnostyka

Dużym wyzwaniem diagnostycznym jest różnicowanie typu 1 VWD z typem 2M VWD i typu 2A z 2M VWD. Trudności diagnostyczne w rozpoznawaniu typów VWD spowodowały, że cały czas podejmowane są próby modyfikacji zarówno panelu badań, czego przykładem może być rozszerzony zestaw badań diagnostycznych Federici [17] (tab. 5), jak i samej klasyfikacji VWD (26) (tab. 3).

Diagnostyka 2M VWD (tab. 5) wymaga przeprowadzenia pełnego panelu badań laboratoryjnych, w tym oznaczenia wiązania kolagenu i/lub analizy multimerów. W około 70% laboratoriów 2M VWD jest rozpoznawany nieprawidłowo. Najczęstsze powody błędnego rozpoznania to:

- ograniczony panel badań (41,7%) — w laboratoriach tych rozpoznanie jest oparte jedynie na

**Tabela 5.** Laboratoryjna diagnostyka choroby von Willebranda (VWD) zaproponowana przez Federici (2016) [17]**Table 5.** Laboratory diagnostics of von Willebrand disease (VWD) according to Federici (2016) [17]

Parametry kliniczne	Wywiad kliniczny	Pojawianie się często krwawień skórno-słuzówkowych, krwawienia pooperacyjne; na podstawie kwestionariusza oznaczony współczynnik krwotoczny (BS, Bleeding Score)
Parametry laboratoryjne	Wywiad rodzinny	Pozytywny w kierunku krwawień charakterystycznych dla VWD
Parametry laboratoryjne	Poziom pierwszy	Badania aktywności VWF różnymi metodami: <ul style="list-style-type: none"> <li>• VWF:RCo — pomiar indukowanego rystocetyną wiązania VWF z GPIb<math>\alpha</math></li> <li>• VWF:GPIbR — pomiar indukowanego rystocetyną wiązania VWF z fragmentem rekombinowanego prawidłowego GPIb<math>\alpha</math></li> <li>• VWF:GPIbM — spontaniczne wiązanie VWF do zrekombinowanego fragmentu GPIb<math>\alpha</math> (<i>gain of function</i>)</li> <li>• VWF:Ab — wiązanie przeciwciał monoklonalnych do miejsca wiązania GPIb<math>\alpha</math> w A1 VWD</li> </ul> Pomiar wiązania kolagenu — VWF:CB Stężenie antygenu — VWF:Ag Aktywność prokoagulacyjna czynnika VIII — VIII:C VWF:RCo/VWF:Ag; VWF:CB/VWF:Ag
	Poziom drugi	Aglutynacja pod wpływem rystocetyny (RIPA) Analiza multimerów o wysokiej i niskiej rozdzielczości Oznaczenie propeptydu (VWFpp) jako VWFpp/VWF:Ag Test wiązania czynnika VIII — VWF:FVIII B
	Badania molekularne — potwierdzenie VWD	Obecność dużych delecji w typie VWD3 Obecność mutacji w określonych domenach: <ul style="list-style-type: none"> <li>• D2-D3-C2-A2-CK (VWD2A)</li> <li>• D3 (VWD1/VWD2M Vicenza)</li> <li>• D'-D3 (2N)</li> <li>• A1 (VWD2 i VWD M)</li> </ul>

- oznaczeniu kofaktora rystocetyny (VWF:RCo), VIII:C i antygenu VWF (VWF:Ag);  
 — błędna interpretacja wyników (10%);  
 — błędy analityczne (13,3%) [32–53].

Diagnostyka typu 2M VWD powinna obejmować badania uwzględniające defekty wiązania VWF nie tylko z płytkami krwi (VWF:RCo i VWF:RCo/VWF:Ag), ale także z podśródbłonkowym kolagenem (VWF:CB; VWF:CB/VWF:Ag). Wykonanie jedynie jednego z tych testów nie pozwala na wykluczenie lub potwierdzenie rozpoznania VWF 2M, ponieważ test wiązania kolagenu VWF:CB nie wykrywa defektu wiązania płytek, a VWF:RCo — defektów wiązania kolagenu. Typ 2M VWD jest nieprawidłowo rozpoznawany aż w 70,6% przypadków [53, 54].

Najczęściej wykrywany jest typ 2M spowodowany defektem wiązania GPIb. Typ 2M zależy od

upośledzenia funkcji wiązania podśródbłonkowego kolagenu rozpoznaje się znacznie rzadziej.

Typ 2M VWD charakteryzuje się upośledzoną agregacją z rystocetyną, spowodowaną mutacjami w miejscu wiązania GPIb $\alpha$  (głównie domena A1 VWF) i/lub prawidłowym/upośledzonym wiązaniem z kolagenem [13, 18]. Obniżone są aktywność VWF, jak również iloraz VWF:RCo/VWF:Ag ( $< 0,7$ ). U większości chorych dystrybucja multimerów jest prawidłowa. U części pacjentów mogą występować multimery o wyższej niż normalnie masie, może być też niewielki niedobór multimerów lub zwiększone stężenie multimerów prawidłowych [24, 33–36, 39, 40] (tab. 6).

W każdym przypadku podejrzenia typu 2M konieczne jest jego zróżnicowanie z typem 1 i typem 2A, z którymi 2M jest często mylony [53–56] (tab. 4).

**Tabela 6.** Dystrybucja multimerów czynnika von Willebranda (VWF) w chorobie von Willebranda (VWD) typu 2M**Table 6.** Von Willebrand factor (VWF) multimer distribution in 2M von Willebrand disease (VWD)

Warianty typu 2M VWD		Piśmiennictwo
Milwaukee (delecja R1392–Q1402; Arg629–Gln639)	Prawidłowa dystrybucja multimerów, obniżony VWF:RCo, upośledzone wiązanie VWF-GPIb	Mancuso i wsp. [33]
Vicenza	Obecność multimerów większych niż normalnie	Mannucci i wsp. [34] Zieger i wsp. [35]
IC i ID	Nieprawidłowa struktura tripletów	Ciavarella i wsp. [39] Lopez-Fernandez i wsp. [40]
B (G1324S; Gly561Ser)	Prawidłowa dystrybucja multimerów, nieoznaczalny VWF:RCo, prawidłowe wiązanie z botrocetyną	Rabinowicz i wsp. [37] Howard i wsp. [36]

Panel badań laboratoryjnych konieczny dla rozpoznania 2M VWD i zróżnicowania go z typem 1 i 2A obejmuje (oprócz rutynowych badań stosowanych w diagnostyce VWD, takich jak oznaczenie VWF:RCo, VWF:Ag i VIII:C) wykonanie:

- analizy multimerów VWF;
- testu wiązania kolagenu (VWF:CB) metodą ELISA.

**Analiza multimerów** [57–59]. Właściwości biologiczne VWF są związane ze stężeniem i z wielkością obecnych w osoczu multimerów tego białka. Obniżenie stężenia liczących 5–10 tys. kDa multimerów o wysokiej masie cząsteczkowej (HMWM, *high molecular weight multimers*) lub ich degradacja mogą zmieniać funkcje VWF, takie jak agregacja, adhezja lub krzepnięcie krwi w wyniku upośledzenia zdolności do wiązania z płytkowym receptorem GP Ib (VWF:RCo) i/lub wiązania z podśródbłonkowym kolagenem (VWF:CB) albo osłabionego wiązania z czynnikiem VIII (FVIII:B). Ocenę dystrybucji multimerów w osoczu wykonuje się metodą rozdziału multimerów w żelach agarozowych lub stosując test wiązania kolagenu. Ocena struktury multimerycznej VWF jest ważnym parametrem w diagnostyce oraz różnicowaniu typów i podtypów VWD. Należy jednak pamiętać, że nie jest to badanie przesiewowe; jedynie w połączeniu z wynikami badań klinicznych i wstępnych badań laboratoryjnych — obejmujących kofaktor rystocetyny (VWF:RCo), antygen VWF (VWF:Ag) i aktywność czynnika VIII — umożliwia prawidłowe rozpoznanie typu VWD. Chociaż nieprawidłowa dystrybucja multimerów jest związana najczęściej z obniżoną aktywnością kofaktora rystocetyny, to jednak należy pamiętać, że przykładowo w nabytej chorobie von Willebranda (AVWS) upośledzenie lub brak HMWM może nie przekładać się na

upośledzenie VWF:RCo, na przykład przy zwiększonej proteolizie VWF spowodowanej wysokimi siłami ścinania, powodującymi (tak jak w stenozie aortalnej) zmiany konformacyjne cząsteczki VWF umożliwiające proteolizę.

Prawidłowo wykonana analiza multimerów jest badaniem stosunkowo czułym i może być wykonana przy stężeniu VWF niższym niż 1 IU/dL. Badanie obejmuje kilka etapów:

- rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym o wyższej rozdzielczości (*medium resolution gel*), liczącej 1,4–2,0% agarozy, lub niższej rozdzielczości (*low resolution gel*) — 0,7–1,2% agarozy;
- transfer białka na membranę;
- detekcję metodą chemiluminescencji.

Żele o niskiej rozdzielczości są stosowane przede wszystkim do różnicowania niedoborów HMWM, wykrywania multimerów o większej niż normalna masie cząsteczkowej i prawidłowych multimerów VWF. Stosując żele o niskiej rozdzielczości, należy pamiętać, że najmniejsze multimery (prążki 1 i 2) migrują razem i odpowiadający im prążek (protomer) liczy się jako dwa oligomery. Żele agarozowe o większej rozdzielczości pozwalają identyfikować nie tylko wszystkie multimery VWF, ale także strukturę tripletów (dodatkowe linie powstające w wyniku proteolizy). Według Budde i wsp. [57] rozdział w żelu o wyższej rozdzielczości pozwala rozpoznać w osoczu prawidłowym następujące prążki (licząc od czoła elektroforezy):

- pięć prążków (1–5, licząc od czoła rozdziału) odpowiadających multimerom o niskiej masie cząsteczkowej (LMWM, *low molecular weight multimers*);
- 6–10, odpowiadające multimerom o średniej masie cząsteczkowej (IMWM, *intermediate molecular weight multimers*);
- powyżej 10, odpowiadające HMWM [57].



Podczas analizy obrazu multimerów ważne jest nie tylko wykrycie niedoboru HMW multimerów, ale również odróżnienie prawidłowej cząsteczki VWF od niewielkiego niedoboru HMW, a także od niewielkich zmian w strukturze linii satelitarnych multimerów, czemu służy wykonanie elektroforetycznego rozdziału multimerów w żelu agarozowym o wyższej rozdzielczości.

Analiza multimerów VWF ma szczególne znaczenie w diagnostyce typu 2. Jest podstawowym parametrem różnicującym 2A i 2M VWD. W typie 2A i u większości chorych z typem 2M VWD upośledzone jest wiązanie VWF z GPIIb $\alpha$  (VWF:RCo), natomiast prawidłowe — wiązanie z kolagenem (VWF:CB). Istotne różnice między typem 2A a 2M widać najlepiej w obrazie multimerów. Typ 2A charakteryzuje się utratą wielkocząsteczkowych multimerów VWF (HMW VWF), podczas gdy w typie 2M VWD multimery HMW są z reguły obecne, mogą być nieco większe niż normalnie lub z bardzo niewielkimi nieprawidłowościami (np. nieprawidłowe lub rozmazane linie satelitarne) (tab. 6). Chociaż analiza multimerów VWF jest badaniem ważnym diagnostycznie, to jednak z uwagi na to, że jest to badanie wymagające specjalistycznej aparatury, trudne do wykonania i niekiedy również trudne do interpretacji, jest ono wykonywane w niewielu laboratoriach. Według Favaloro i wsp. [53, 54] analiza multimerów może być jednak zastąpiona znacznie mniej skomplikowanym oznaczeniem wiązania kolagenu.

**Test wiązania kolagenu** [48–50, 52, 53, 60–64]. Kolejnym, bardzo ważnym testem w diagnostyce 2M VWD jest test wiązania kolagenu (VWF:CB). O ile aktywność kofaktora rystocetyny (VWF:RCo) informuje nas o mutacjach w domenie A1 VWF, odpowiedzialnej za wiązanie z glikoproteiną GPIIb, o tyle test wiązania kolagenu (VWF:CB) dostarcza informacji o upośledzeniu funkcji wiązania do podśródbłonkowego kolagenu związanego z mutacjami w domenach A1 i A3.

#### Test wiązania kolagenu:

- pozwala na wykrywanie typu 2M VWD spowodowanego upośledzonym wiązaniem do kolagenu;
- ułatwia różnicowanie typu 2A i 2M;
- może być badaniem alternatywnym do analizy multimerów, ponieważ jego wynik zależy od obecności/braku wielkocząsteczkowych multimerów.

W procesie naprawy uszkodzonego naczynia multimery VWF wiążą się z kolagenem typu I

i III przez domenę A3 VWF oraz z kolagenem IV i VI przez domenę A1 VWF. Upośledzone wiązanie kolagenu w typie 1 i 3 VWD może być spowodowane obniżeniem/brakiem VWF:Ag, brakiem HMW multimerów w typie 2A i 2B i w typie 2M VWD lub defektem wiązania kolagenu przy prawidłowej dystrybucji multimerów. Test wiązania kolagenu nie tylko pozwala na ocenę wiązania kolagenu, ale także informuje o dystrybucji multimerów VWD. Po raz pierwszy został włączony do diagnostyki VWD przez Favaloro [60], który wykazał, że test ten może zastąpić w panelu badań VWD trudną do wykonania i interpretacji analizę multimerów. Według Flood i wsp. [61] czułość testu VWF:CB w ocenie dystrybucji multimerów VWF wynosi 100% dla osób zdrowych, dla osób z typem 2A VWD oraz dla tych z 2B VWD przy VWF:CB/VWF:Ag mniejszej lub równej 0,6. Z kolei dla osób z typem 1 VWD oraz z 2B VWD przy VWF:CB/VWF:Ag większej lub równej 0,7 czułość wynosi 99%.

Ograniczeniem dostępnych obecnie handlowych testów VWF:CB jest to, że z reguły wykrywają one jedynie defekty w wiązaniu kolagenu I i III natomiast nie wykrywają defektów wiązania z kolagenem IV i VI spowodowanych mutacjami w domenie A1 VWF.

Jak podaje Flood [61], defekt wiązania kolagenu IV występuje w około 2% populacji kaukaskiej, najczęściej u heterozygot mutacji R1399H, u których jest obniżony iloraz VWF:CB/VWF:Ag.

Dotychczas VWF:CB było oznaczane najczęściej immunochromogenną metodą ELISA, przy użyciu kolagenu typu I i III. Oceny wiązania kolagenu wykonywano także metodą cytometrii przepływowej, choć badanie to nie było nigdy szerzej stosowane. W latach 2016–2018 opracowano testy dające możliwość wykonywania oznaczenia VWF:CB metodą automatyczną w analizatorach diagnostycznych [62–64]. W systemie HemosIL AcuStar oznaczenie wiązania kolagenu wykonuje się dwuetapową metodą immunochemiluminescencyjną (HemosIL AcuStar VWF:CB). Ta nowa metoda jest znacznie szybsza niż stosowana dotychczas ELISA, wykazuje dobrą z nią korelację i, co także bardzo ważne, może być wykonywana na tej samej platformie analitycznej co VWF:RCo i VWF:Ag.

#### Leczenie

U chorych z 2M VWD stosuje się koncentraty zawierające VWF lub przy niewielkich krwawieniach — iniekcje DDAVP. Ponieważ poszczególne koncentraty VIII/VWF różnią się zawartością VWF oraz strukturą multimerów VWF, ich dawkowanie może być różne. Najskuteczniejsze są preparaty,

w których stosunek VWF:Ag/FVIII jest wyższy niż 1 [10].

U pacjentów z typem 2M VWD, podobnie jak z typem 1 czy 2A, leczenie desmopresyną może być stosowane jedynie po wykonaniu testu odpowiedzi na ten lek, ponieważ u dużej części chorych klirens VWF jest przyspieszony, wzrost stężenia VWF — szybki i krótkotrwały, niewystarczający dla uzyskania prawidłowej hemostazy.

### Podsumowanie

Choroba von Willebranda — zarówno wrodzona, jak i nabyta — stanowi nadal duże wyzwanie dla naukowców, klinicystów i diagnostów laboratoryjnych. Mimo że od pierwszej publikacji Erica von Willebranda (1926 r.) upłynęło ponad 90 lat, wiele pytań dotyczących tej choroby pozostaje nadal bez odpowiedzi. Kliniczna i molekularna heterogenność VWD sprawia, że uproszczona klasyfikacja VWD z lat 1994–2006 staje się już niewystarczająca dla prawidłowego zróżnicowania typów i podtypów tej choroby.

Różnicowanie typów i podtypów VWD, w tym typu 2M z typem 1 i 2A, nie jest możliwe bez wykonania wieloetapowej diagnostyki dostępnej jedynie w wysokospecjalistycznych laboratoriach. Prawidłowe rozpoznanie typu 2M VWD może mieć znaczenie w wyborze sposobu leczenia. W piśmiennictwie leczenie DDAVP jest oceniane różnie. U większości chorych może być ono mało skuteczne ze względu na szybki klirens VWF z osocza. Zasady leczenia koncentratami czynnika VIII zawierającymi VWF są natomiast identyczne jak w typie 1 i 2A VWD.

### Piśmiennictwo

- Castaman G. Epidemiology and diagnosis of von Willebrand disease. *Haematologica* 2001; 86 ; 10(supl. 2): 1–9.
- 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.
- de Wee EM, Sanders YV, Mauser-Bunschoten EP, et al. WiN study group. Determinants of bleeding phenotype in adult patients with moderate or severe von Willebrand disease. *Thromb Haemost.* 2012; 108(4): 683–692, doi: 10.1160/TH12-04-0244, indexed in Pubmed: 22918553.
- Leebeek F, Eikenboom J. Von Willebrand's Disease. *New England Journal of Medicine.* 2016; 375(21): 2067–2080, doi: 10.1056/nejmra1601561.
- Kadir RA, Edlund M, Von Mackensen S. The impact of menstrual disorders on quality of life in women with inherited bleeding disorders. *Haemophilia.* 2010; 16(5): 832–839, doi: 10.1111/j.1365-2516.2010.02269.x, indexed in Pubmed: 20584085.
- Bauduer F, Ducout L. Is the assessment of von Willebrand disease prevalence an achievable challenge? The example of the French Basque Country where blood group O and factor XI deficiency are highly prevalent. *J Thromb Haemost.* 2004; 2(10): 1724–1726, doi: 10.1111/j.1538-7836.2004.00930.x, indexed in Pubmed: 15456482.
- Miesbach W, Berntorp E. When von Willebrand disease comes into age - a matter of change? *Eur J Haematol.* 2011; 86(6): 496–501, doi: 10.1111/j.1600-0609.2011.01611.x, indexed in Pubmed: 21418329.
- Sanders YV, Giezenaar MA, Laros-van Gorkom BAP, et al. WiN study group. von Willebrand disease and aging: an evolving phenotype. *J Thromb Haemost.* 2014; 12(7): 1066–1075, doi: 10.1111/jth.12586, indexed in Pubmed: 24750783.
- Borghi M, Guglielmini G, Mezzasoma AM, et al. Increase of von Willebrand factor with aging in type 1 von Willebrand disease: fact or fiction? *Haematologica.* 2017; 102(11): e431–e433, doi: 10.3324/haematol.2017.168013, indexed in Pubmed: 28751564.
- Seaman CD, Ragni MV. The Association of Aging With Von Willebrand Factor Levels and Bleeding Risk in Type 1 Von Willebrand Disease. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2018; 24(3): 434–438, doi: 10.1177/1076029617724232, indexed in Pubmed: 28874064.
- Nichols WL, Hultin MB, James AH, et al. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia.* 2008; 14(2): 171–232, doi: 10.1111/j.1365-2516.2007.01643.x, indexed in Pubmed: 18315614.
- Ng C, Motto DG, Di Paola J. Diagnostic approach to von Willebrand disease. *Blood.* 2015; 125(13): 2029–2037, doi: 10.1182/blood-2014-08-528398, indexed in Pubmed: 25712990.
- Sadler JE. Low von Willebrand factor: sometimes a risk factor and sometimes a disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009; 106–112, doi: 10.1182/asheducation-2009.1.106, indexed in Pubmed: 20008188.
- Zdziarska J, Chojnowski K, Klukowska A, et al. Postępowanie w chorobie von Willebranda. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów. *Med Prakt.* 2008; 12: 1–16.
- 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.
- Keeney S, Cumming AM. The molecular biology of von Willebrand disease. *Clin Lab Haematol.* 2001; 23(4): 209–230, indexed in Pubmed: 11683782.
- Federici AB. Current and emerging approaches for assessing von Willebrand disease in 2016. *Int J Lab Hematol.* 2016; 38 Suppl 1: 41–49, doi: 10.1111/ijlh.12540, indexed in Pubmed: 27426859.
- Goodeve AC. The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Rev.* 2010; 24(3): 123–134, doi: 10.1016/j.blre.2010.03.003, indexed in Pubmed: 20409624.
- 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, indexed in Pubmed: 28987708.
- James PD, Notley C, Hegadorn C, et al. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. *Blood.* 2007; 109(1): 145–154, doi: 10.1182/blood-2006-05-021105, indexed in Pubmed: 17190853.
- Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, et al. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type

- 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood*. 2007; 109(1): 112–121, doi: 10.1182/blood-2006-05-020784, indexed in Pubmed: 16985174.
22. Castaman G, Lethagen S, Federici AB, et al. Response to desmopressin is influenced by the genotype and phenotype in type 1 von Willebrand disease (VWD): results from the European Study MCMDM-1VWD. *Blood*. 2008; 111(7): 3531–3539, doi: 10.1182/blood-2007-08-109231, indexed in Pubmed: 18230755.
  23. 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, indexed in Pubmed: 18173689.
  24. 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.
  25. Sadler JE, Budde U, Eikenboom J, 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, indexed in Pubmed: 16889557.
  26. Michiels JJ, Smejkal P, Penka M, et al. Diagnostic Differentiation of von Willebrand Disease Types 1 and 2 by von Willebrand Factor Multimer Analysis and DDAVP Challenge Test. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2017; 23(6): 518–531, doi: 10.1177/1076029616647157, indexed in Pubmed: 27443694.
  27. Larsen DM, Haberichter SL, Gill JC, et al. Variability in platelet- and collagen-binding defects in type 2M von Willebrand disease. *Haemophilia*. 2013; 19(4): 590–594, doi: 10.1111/hae.12117, indexed in Pubmed: 23496210.
  28. Favaloro EJ, Forsyth C, Koutts J. Distinguishing types 1 and 2M von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol*. 2012; 34(1): 102–105, doi: 10.1111/j.1751-553X.2011.01362.x, indexed in Pubmed: 21794096.
  29. James PD, Notley C, Hegadorn C, et al. Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada. Challenges in defining type 2M von Willebrand disease: results from a Canadian cohort study. *J Thromb Haemost*. 2007; 5(9): 1914–1922, doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02666.x, indexed in Pubmed: 17596142.
  30. Castaman G, Federici AB, Tosetto A, et al. Different bleeding risk in type 2A and 2M von Willebrand disease: a 2-year prospective study in 107 patients. *J Thromb Haemost*. 2012; 10(4): 632–638, doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04661.x, indexed in Pubmed: 22329792.
  31. Hermans C, Batlle J. Autosomal dominant von Willebrand disease type 2M. *Acta Haematol*. 2009; 121(2-3): 139–144, doi: 10.1159/000214854, indexed in Pubmed: 19506360.
  32. Laffan M, Brown SA, Collins PW, et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia*. 2004; 10(3): 199–217, doi: 10.1111/j.1365-2516.2004.00894.x, indexed in Pubmed: 15086318.
  33. Mancuso DJ, Kroner PA, Christopherson PA, et al. Type 2M:Milwaukee-1 von Willebrand disease: an in-frame deletion in the Cys509-Cys695 loop of the von Willebrand factor A1 domain causes deficient binding of von Willebrand factor to platelets. *Blood*. 1996; 88(7): 2559–2568, indexed in Pubmed: 8839848.
  34. Mannucci PM, Lombardi R, Castaman G, et al. von Willebrand disease „Vicenza” with larger-than-normal (supranormal) von Willebrand factor multimers. *Blood*. 1988; 71(1): 65–70, indexed in Pubmed: 3257148.
  35. Zieger B, Budde U, Jessat U, et al. New families with von Willebrand disease type 2M (Vicenza). *Thromb Res*. 1997; 87(1): 57–64, indexed in Pubmed: 9253800.
  36. Howard MA, Salem HH, Thomas KB, et al. Variant von Willebrand's disease type B--revisited. *Blood*. 1982; 60(6): 1420–1428, indexed in Pubmed: 6814554.
  37. Rabinowitz I, Tuley EA, Mancuso DJ, et al. von Willebrand disease type B: a missense mutation selectively abolishes ristocetin-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(20): 9846–9849, indexed in Pubmed: 1409710.
  38. 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.
  39. Ciavarella G, Ciavarella N, Antoncetti S, et al. High-resolution analysis of von Willebrand factor multimeric composition defines a new variant of type I von Willebrand disease with aberrant structure but presence of all size multimers (type IC). *Blood*. 1985; 66(6): 1423–1429, indexed in Pubmed: 3877533.
  40. Lopez-Fernandez MF, Gonzalez-Boullousa R, Blanco-Lopez MJ, et al. Abnormal proteolytic degradation of von Willebrand factor after desmopressin infusion in a new subtype of von Willebrand disease (ID). *Am J Hematol*. 1991; 36(3): 163–170, indexed in Pubmed: 1996556.
  41. 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, indexed in Pubmed: 27913546.
  42. Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, et al. von Willebrand factor. A reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem*. 1986; 261(1): 381–385, indexed in Pubmed: 2934387.
  43. Pareti FI, Niiya K, McPherson JM, et al. Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III. *J Biol Chem*. 1987; 262(28): 13835–13841, indexed in Pubmed: 3498719.
  44. Posch S, Obser T, König G, et al. Interaction of von Willebrand factor domains with collagen investigated by single molecule force spectroscopy. *J Chem Phys*. 2018; 148(12): 123310, doi: 10.1063/1.5007313, indexed in Pubmed: 29604837.
  45. Tischer A, Madde P, Moon-Tasson L, et al. Misfolding of vWF to pathologically disordered conformations impacts the severity of von Willebrand disease. *Biophys J*. 2014; 107(5): 1185–1195, doi: 10.1016/j.bpj.2014.07.026, indexed in Pubmed: 25185554.
  46. Tischer A, Campbell JC, Machha VR, et al. Mutational Constraints on Local Unfolding Inhibit the Rheological Adaptation of von Willebrand Factor. *J Biol Chem*. 2016; 291(8): 3848–3859, doi: 10.1074/jbc.M115.703850, indexed in Pubmed: 26677223.
  47. Stepanian A, Ribba AS, Lavergne JM, et al. A new mutation, S1285F, within the A1 loop of von Willebrand factor induces a conformational change in A1 loop with abnormal binding to platelet GPIb and botrocetin causing type 2M von Willebrand disease. *Br J Haematol*. 2003; 120(4): 643–651, indexed in Pubmed: 12588351.

48. Lankhof H, van Hoesj M, Schiphorst ME, et al. A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb Haemost.* 1996; 75(6): 950–958, indexed in Pubmed: 8822592.
49. Flood VH, Gill JC, Christopherson PA, et al. Critical von Willebrand factor A1 domain residues influence type VI collagen binding. *J Thromb Haemost.* 2012; 10(7): 1417–1424, doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04746.x, indexed in Pubmed: 22507569.
50. Flood VH, Schlauderaff AC, Haberichter SL, et al. Zimmerman Program Investigators. Crucial role for the VWF A1 domain in binding to type IV collagen. *Blood.* 2015; 125(14): 2297–2304, doi: 10.1182/blood-2014-11-610824, indexed in Pubmed: 25662333.
51. 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, indexed in Pubmed: 16862518.
52. Favaloro EJ. Evaluation of commercial von Willebrand factor collagen binding assays to assist the discrimination of types 1 and 2 von Willebrand disease. *Thromb Haemost.* 2010; 104(5): 1009–1021, doi: 10.1160/TH10-06-0360, indexed in Pubmed: 20806123.
53. Favaloro EJ, Bonar RA, Mohammed S, et al. Type 2M von Willebrand disease - more often misidentified than correctly identified. *Haemophilia.* 2016; 22(3): e145–e155, doi: 10.1111/hae.12903, indexed in Pubmed: 27029718.
54. Favaloro EJ, Pasalic L, Curnow J. Type 2M and Type 2A von Willebrand Disease: Similar but Different. *Semin Thromb Hemost.* 2016; 42(5): 483–497, doi: 10.1055/s-0036-1579641, indexed in Pubmed: 27148841.
55. Favaloro EJ, Bonar RA, Mohammed S, et al. Diagnosis of type 1 vs. 2A and 2M von Willebrand disease. *Haemophilia.* 2012; 18(1): e9–11, doi: 10.1111/j.1365-2516.2011.02628.x, indexed in Pubmed: 21812865.
56. Doruelo AL, Haberichter SL, Christopherson PA, et al. Clinical and laboratory phenotype variability in type 2M von Willebrand disease. *J Thromb Haemost.* 2017; 15(8): 1559–1566, doi: 10.1111/jth.13742, indexed in Pubmed: 28544236.
57. Budde U, Drewke E, Mainusch K, et al. Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost.* 2002; 28(2): 173–190, doi: 10.1055/s-2002-27820, indexed in Pubmed: 11992241.
58. Budde U, Schneppenheim R, Eikenboom J, et al. Detailed von Willebrand factor multimer analysis in patients with von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 von Willebrand disease (MCMDM-1VWD). *J Thromb Haemost.* 2008; 6(5): 762–771, doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.02945.x, indexed in Pubmed: 18315556.
59. Oliver S, Lau KK, Chapman K, et al. Laboratory Testing for Von Willebrand Factor Multimers. *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 495–511, doi: 10.1007/978-1-4939-7196-1\_36, indexed in Pubmed: 28804850.
60. Favaloro EJ. Toward a new paradigm for the identification and functional characterization of von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost.* 2009; 35(1): 60–75, doi: 10.1055/s-0029-1214149, indexed in Pubmed: 19308894.
61. Flood VH, Gill JC, Friedman KD, et al. Zimmerman Program Investigators. Collagen binding provides a sensitive screen for variant von Willebrand disease. *Clin Chem.* 2013; 59(4): 684–691, doi: 10.1373/clinchem.2012.199000, indexed in Pubmed: 23340442.
62. Favaloro EJ, Mohammed S. Evaluation of a von Willebrand factor three test panel and chemiluminescent-based assay system for identification of, and therapy monitoring in, von Willebrand disease. *Thromb Res.* 2016; 141: 202–211, doi: 10.1016/j.thromres.2015.12.010, indexed in Pubmed: 26743192.
63. Stufano F, Baronciani L, Mane-Padros D, et al. A comparative evaluation of a new fully automated assay for von Willebrand factor collagen binding activity to an established method. *Haemophilia.* 2018; 24(1): 156–161, doi: 10.1111/hae.13371, indexed in Pubmed: 29168270.
64. Jouselme E, Jourdy Y, Rugeri L, et al. Comparison of an automated chemiluminescent assay to a manual ELISA assay for determination of von Willebrand Factor collagen binding activity on VWD plasma patients previously diagnosed through molecular analysis of VWF. *Int J Lab Hematol.* 2018; 40(1): 77–83, doi: 10.1111/ijlh.12743, indexed in Pubmed: 28980759.