

บทความพิเศษ

von Willebrand Disease

ธีระ ฤๅษะตระกูล

สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

โรควอนวิลเล็บบรอนด์ เป็นโรคเลือดออกผิดปกติทางพันธุกรรมซึ่งมีรายงานเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1926 โดย Erik von Willebrand^{1,2} แพทย์ชาวฟินแลนด์ ได้รายงานผู้ป่วยหญิงอายุ 5 ปีที่มีปัญหาเลือดออกไม่หยุดเป็นๆ หายๆ ตั้งแต่เด็ก โดยที่มีพี่สาวอีก 3 คนที่มีอาการเช่นเดียวกับผู้ป่วยและเสียชีวิตก่อนอายุ 4 ปี เพราะเลือดออกไม่หยุดในอวัยวะต่างๆ กัน สำหรับตัวผู้ป่วยเองเสียชีวิตเมื่ออายุ 13 ปี เนื่องจากเลือดออกไม่หยุดหลังมีประจำเดือนรอบที่ 4 ในชีวิต³

โรควอนวิลเล็บบรอนด์เป็นโรคเลือดออกผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบได้ไม่น้อย แม้ว่าโรคนี้จะมีแบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นแบบ autosomal dominant ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีความรุนแรงของโรคไม่มากทำให้ผู้ป่วยไม่ได้มาพบแพทย์ ดังนั้นถ้าเทียบกับผู้ป่วยฮีโมฟีเลียเอ โรควอนวิลเล็บบรอนด์ยังพบเป็นอันดับสองรองจากโรคฮีโมฟีเลียเอ โดยอุบัติการณ์ในประชากรทางซีกโลกตะวันตกเท่ากับร้อยละ 0.8-1.6^{4,5}

การสร้างและหลังวอนวิลเล็บบรอนด์แฟกเตอร์

ระดับยีน

แม้ว่าโรคนี้จะถูกพบมานานถึง 80 ปีแล้วก็ตาม แต่วอนวิลเล็บบรอนด์แฟกเตอร์ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1973 โดย Theodore S. Zimmerman⁶ เป็นคนแรกที่พบว่า

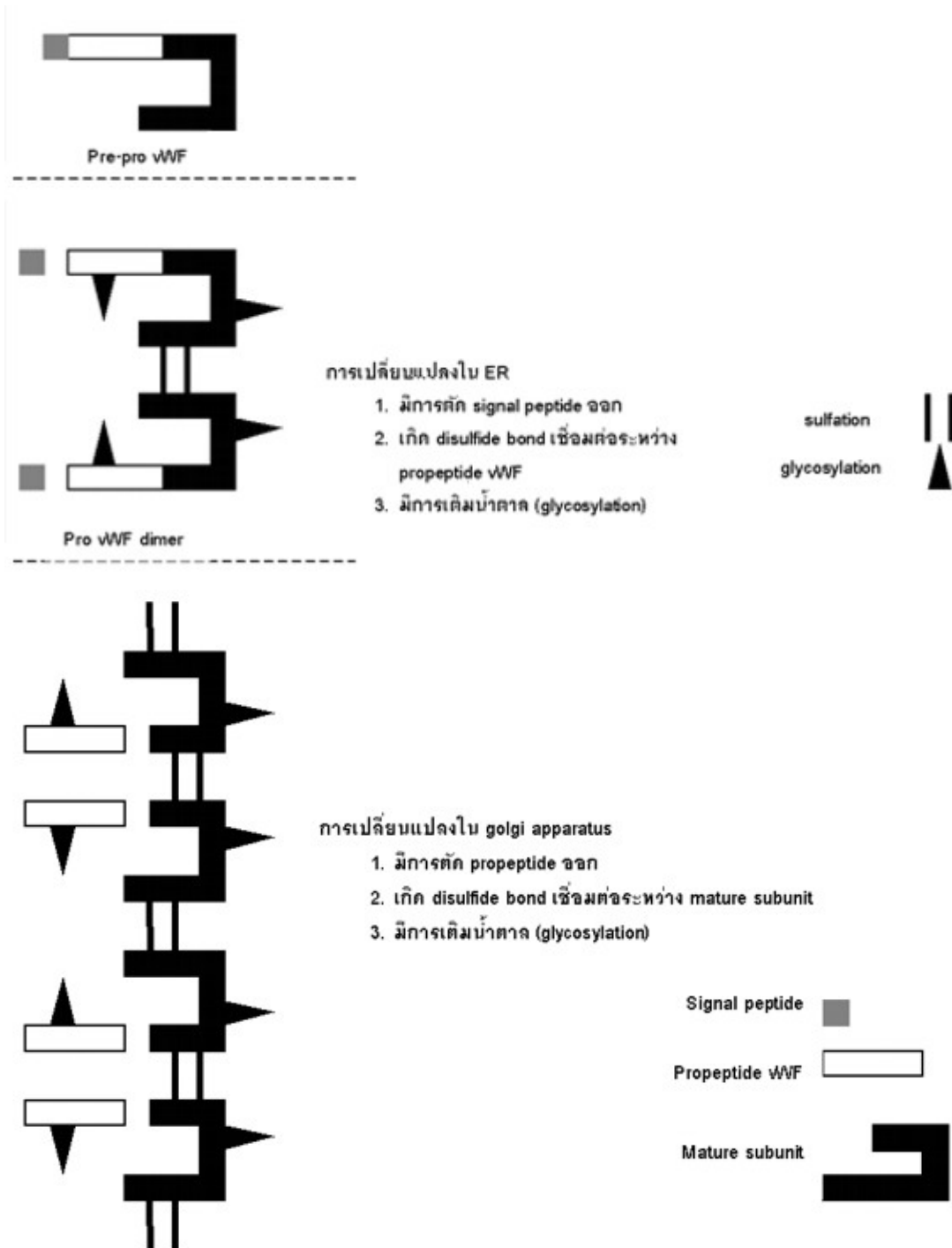
ได้รับต้นฉบับ 7 กุมภาพันธ์ 2549 ให้ลงตีพิมพ์ 21 กุมภาพันธ์ 2549
ต้องการสำเนาต้นฉบับกรุณาติดต่อ ผศ.นพ.ธีระ ฤๅษะตระกูล สาขา
โลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

โปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่ทำงานสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดกับ factor VIII (FVIII) และในปี ค.ศ. 1985 ยีนที่ควบคุมการสร้างวอนวิลเล็บบรอนด์แฟกเตอร์ถูกค้นพบโดยกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ต่างสถาบันกันได้รายงานการค้นพบยีนนี้ในเวลาใกล้เคียงกัน^{7,8,9,10} แม้ว่าจะมียีนที่ควบคุมการสร้างวอนวิลเล็บบรอนด์แฟกเตอร์ อยู่ในหลายๆ เซลล์ แต่พบว่าเซลล์ที่สามารถสร้างวอนวิลเล็บบรอนด์แฟกเตอร์ ได้แก่ endothelium และ megakaryocyte เท่านั้น ยีนที่ควบคุมการสร้างวอนวิลเล็บบรอนด์แฟกเตอร์อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 12 มีขนาด 180 กิโลเบส (คิดเป็นร้อยละ 0.1 ของยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 12) ประกอบด้วย 52 exons (ที่มีขนาดของยีนตั้งแต่ 40 เบส จนถึง 1.4 กิโลเบส) และเมื่อคะเนจากขนาดของ mRNA ทำให้ประมาณได้ว่าโปรตีนนี้ควรมีขนาด 309 กิโลดาลตัน และประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 2,813 ตัว โดยแบ่งออกเป็นส่วนต่างๆ ไปเรียงจาก amino terminus จนถึง carboxy terminus ได้ดังนี้ คือ

1. Signal peptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 22 ตัว
2. Pre-propeptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 741 ตัว
3. Mature subunit ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนอีก 2,050 ตัว

ระดับโปรตีน (post-translation processing)

หลังจากที่สร้าง pre-propeptide von Willebrand factor (vWF) ซึ่งมีกรดอะมิโนจำนวน 2,813 ตัว โดยที่กรดอะมิโน 22 ตัวทาง amino terminus เป็น signal



รูปที่ 1 แสดงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเพื่อให้ได้ vWF multimer ที่สมบูรณ์

D	D3	A1	A2	A3		D4	B	C
---	----	----	----	----	--	----	---	---

Factor VIII

GPIB/IX/V

Collagen

GPIIb/IIIa

Collagen?

Sulfatide

Heparin

รูปที่ 2 แสดงหน้าที่ของแต่ละ domain บนโมเลกุลของ mature subunit vWF

peptides กรดอะมิโน 741 ตัวต่อมาเป็น propeptide และกรดอะมิโน 2,050 ตัวที่เหลือเป็น mature subunit ซึ่งขบวนการดังกล่าวเริ่มหลังจากที่มีการขับ pre-propeptide vWF ออกจาก mRNA มาสู่ rough endoplasmic reticulum (ER) จะมีการตัดกรดอะมิโน 22 ตัว (signal peptide) ออก ได้เป็น propeptide vWF จากนั้น จึงมีการเติมน้ำตาล (glycosylation) และซัลเฟต (sulfation) ในโมเลกุลของ vWF และเกิดการสร้าง disulfide bond เชื่อมต่อโมเลกุลของ vWF เกิดเป็น vWF dimer จากนั้นจะผ่านเข้ามาใน golgi apparatus ซึ่งจะมีการเชื่อมต่อกันระหว่าง vWF dimer ด้วย disulfide bond ทำให้เกิด เป็น vWF multimer ก่อนที่จะถูกเก็บสะสมไว้ในเซลล์ (Weibel-Palade bodies ใน endothelium หรือ alpha granule ในเกล็ดเลือด) หรือหลั่งออกจากเซลล์ โดยปกติจะตรวจพบทั้ง propeptide และ mature subunit ในเลือดปริมาณ 1 และ 5-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และมีระยะกึ่งชีพเท่ากับ 2 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ

การทำงานของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์

วอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ mature subunit สามารถแยกออกเป็นช่วงๆ (domain) ตามการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน ออกเป็น A, B, C และ D domains สำหรับ A domain พบว่ามีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนซ้ำกันเป็นช่วงๆ เรียกว่า A1, A2 และ A3 domain ดังแสดงในรูปที่ 2

ดังนั้นถ้ามีความผิดปกติของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ที่ต่าง domain กัน ส่งผลทำให้เกิดภาวะเลือดออกผิดปกติด้วยกลไกที่ไม่เหมือนกัน และทำให้ความรุนแรงของอาการแตกต่างกัน วอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการห้ามเลือดสองประการคือ

1. ช่วยการเกาะติดของเกล็ดเลือดต่อเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในบริเวณที่มีการฉีกขาดของหลอดเลือด (platelet adhesion) โดยวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ทำหน้าที่เสมือนสะพานเชื่อมระหว่างเกล็ดเลือด (โดยอาศัย A1 domain บนโมเลกุลของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์จับกับ glycoprotein Ib/IX/V complex บนผิวของเกล็ดเลือด) กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (โดยอาศัย A3 domain บนโมเลกุลของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์จับกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน)

2. วอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ในเลือดจะจับกับ F VIII (โดยอาศัย D domain บนโมเลกุลของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์) เพื่อปกป้องไม่ให้ F VIII ถูกทำลายเร็วเกินไป ดังนั้นความผิดปกติของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ จึงทำให้เกิดเลือดออกผิดปกติจากทั้งชนิดปฐมภูมิและทุติยภูมิ

การแบ่งชนิดของโรควอนวิลลิแบรนด์¹¹

ปัจจุบันการแบ่งชนิดของโรคมีความชัดเจนมากขึ้น เนื่องจากความรู้ในระดับอนุพันธุศาสตร์ดีขึ้น (ปัจจุบันพบลักษณะความผิดปกติทางพันธุกรรมมากกว่า 250

ชนิด)^{12,13} สามารถแบ่งชนิดของโรคออกเป็น 3 ชนิด ตามลักษณะความผิดปกติทางอณูพันธุศาสตร์¹⁴ กล่าวคือ

Type 1 (Quantitative defects) เป็นชนิดที่พบมากที่สุดกล่าวคือ ร้อยละ 60-80 ของผู้ป่วยทั้งหมด มีลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมชนิด autosomal dominant โดยความผิดปกติของยีนที่พบเป็นสาเหตุมักเป็นความผิดปกติในบริเวณ Promoter และส่วนมากเป็นการแห้วหายไของยีน (gene deletions) หรือ nonsense mutations และ frameshift mutations ทำให้สร้างวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ในปริมาณที่น้อยลง แต่คุณภาพของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ยังปกติ การตรวจทางห้องปฏิบัติการจะพบ F VIII, vWF:Antigen (vWF:Ag), vWF:Ristocetin cofactor (vWF:Rco) และ vWF:Collagen Binding Aaasy (vWF:CBA) ลดลง แต่ vWF:multimer อยู่ในเกณฑ์ปกติแต่การตัดสินจะจางกว่าคนปกติ

Type 2 (Qualitative defects) พบประมาณร้อยละ 10-30 ของผู้ป่วยทั้งหมด มีลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรม เช่นเดียวกับ Type 1 แต่ลักษณะความผิดปกติของยีนมักเป็นเพราะมีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่ง (Point mutations) ทำให้ร่างกายสร้างวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ที่มีคุณภาพผิดปกติไปจากเดิม (mutant von Willebrand factors) ซึ่งทำให้เกิดอาการทางคลินิกและการตรวจทางห้องปฏิบัติการแตกต่างกันไปขึ้นกับว่าเป็นความผิดปกติที่ domain ไດสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 4 กลุ่มย่อย คือ Type 2A, 2B, 2M และ 2N

Type 2A เป็นความผิดปกติในบริเวณ A2 domain ของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูก Proteolysis ทำให้เกิดการย่อยสลายวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ ความผิดปกติทางพันธุกรรมของ Type 2A มีสองประเภทที่แตกต่างกัน แต่ทำให้ขาด vWF:multimer เหมือนกัน ได้แก่

1. การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในบริเวณ A2

domain ทำให้มีการย่อยสลายวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ง่ายขึ้น ถ้าเกิดจากกลไกชนิดนี้จะตรวจพบ vWF:multimer ในเกล็ดเลือดแต่จะไม่พบ vWF:multimer ในพลาสมา

2. เกิดความผิดปกติในขบวนการ polymerization มีผลทำให้วอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ไม่สามารถจับตัวรวมกันเป็น multimer ได้ ทำให้ไม่มี vWF:multimer และเกิดภาวะเลือดออกผิดปกติในที่สุด ถ้าเกิดจากกลไกชนิดนี้จะไม่สามารถตรวจพบ vWF:multimer ทั้งจากพลาสมาและเกล็ดเลือด

Type 2B เป็นความผิดปกติของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่เป็น binding site ของเกล็ดเลือด ทำให้วอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์จับกับเกล็ดเลือดได้มากขึ้น (spontaneous binding) โดยไม่ต้องอาศัยปัจจัยกระตุ้น เช่น collagen หรือ ristocetin มีผลทำให้จำนวนเกล็ดเลือดต่ำลง บ่อยครั้งที่ผู้ป่วยประเภทนี้จะถูกวินิจฉัยว่าเป็นโรคเกล็ดเลือดต่ำไม่ทราบเหตุ (idiopathic thrombocytopenic purpura ITP) การตรวจทางห้องปฏิบัติการจะให้ผลปกติ ยกเว้นสามารถทำให้เกล็ดเลือดของผู้ป่วยเกาะกลุ่มได้โดยใช้ ristocetin ในขนาดต่ำ (0.3 มิลลิกรัม/เดซิลิตร) โดยที่เกล็ดเลือดของคนปกติไม่สามารถเกาะกลุ่มได้ด้วย ristocetin ขนาดต่ำเช่นนี้ เนื่องจากการถูกใช้ไปกับการทำให้เกล็ดเลือดในร่างกายเกาะกลุ่ม ทำให้ vWF:multimer ในพลาสมาลดลงไป แต่ vWF:multimer ในเกล็ดเลือดยังคงเป็นปกติ

Type 2M พบได้น้อยมาก เป็นรายงานผู้ป่วยไม่กี่รายในโลกเท่านั้น เกิดจากความผิดปกติของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่เป็น binding site ของเกล็ดเลือด เช่นเดียวกับ Type 2B แต่มีผลตรงกันข้าม กล่าวคือกลับทำให้วอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ไม่สามารถจับกับเกล็ดเลือดได้ ทำให้เกิดเลือดออกผิดปกติอย่างรุนแรง การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับระดับของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์และ F VIII จะเป็นปกติรวมทั้ง vWF:

multimer จะยังคงปรากฏอยู่เป็นปกติ แต่ที่เกี่ยวกับหน้าที่ของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ เช่น vWF:Rco, vWF:CBA และ RIPA จะผิดปกติอย่างมาก

Type 2N เป็นความผิดปกติของกรดอะมิโนใน D-domain ของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ซึ่งเป็น binding site ของ F VIII ทำให้ F VIII ในเลือดไม่มีวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์จับอยู่ และ F VIII ที่ไม่มีวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์จับจะถูกทำลายไปอย่างรวดเร็วกว่าปกติ ดังนั้นระดับ F VIII ในคนไข้กลุ่มนี้จะต่ำมาก (น้อยกว่าร้อยละ 20) ทำให้ต้องวินิจฉัยแยกออกจากโรคฮีโมฟีเลียเอ การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับระดับของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์เป็นปกติรวมทั้ง vWF: multimer จะยังคงปรากฏอยู่เป็นปกติ ยกเว้น F VIII:C จะต่ำมาก

Type 3 (Combined) พบเพียงร้อยละ 1-5 ของผู้ป่วยทั้งหมด หรือคิดเป็น 1 ในประชากรล้านคนแม้ว่าจะพบความผิดปกติชนิดนี้ได้ตั้งแต่โรคในกลุ่มนี้จะมีอาการเลือดออกผิดปกติรุนแรง เพราะมีความผิดปกติของยีนที่ควบคุมการสร้างวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ ทั้งสองข้างของโครโมโซมซึ่งอาจจะเป็นความผิดปกติทางอณูพันธุศาสตร์ชนิดเดียวกัน (homozygous) หรือต่างกัน (compound heterozygous) โดยลักษณะความผิดปกติอาจจะเป็นการขาดหายไปของยีน (large gene deletions) หรือ nonsense และ frameshift mutations โรคชนิดนี้มักไม่มีปัญหาในการวินิจฉัย เนื่องจากผลตรวจทางห้องปฏิบัติการมีความผิดปกติชัดเจน กล่าวคือ จะผิดปกติทั้งระดับและการทำหน้าที่ของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ รวมทั้ง multimer และ F VIII จะต่ำมาก ทำให้มีอาการเลือดออกผิดปกติรุนแรงคล้ายโรคฮีโมฟีเลียเอ เช่น เลือดออกในข้อและกล้ามเนื้อ เป็นต้น

อาการและอาการแสดง

แม้ว่าจะมีวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์น้อยหรือทำงานผิดปกติ แต่ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะไม่มีอาการหรืออาการไม่

มาก โดยใหญ่เป็นอาการเลือดออกที่เกิดจากความผิดปกติปฐมภูมิ เช่น พราย้ำจ้ำเขียวหลังการกระแทกเบาๆ เลือดออกตามไรฟัน ส่วนหนึ่งของผู้ป่วยจะมีอาการหลังจากที่มีบาดแผลเกิดขึ้น เช่น เลือดประจำเดือนออกมากและนานกว่าปกติ เลือดออกไม่หยุดหลังถอนฟันหรือผ่าตัด เป็นต้น สำหรับผู้ป่วยที่มีอาการมาก เช่น Type 3 อาจจะมีอาการเลือดออกผิดปกติเช่นที่พบในฮีโมฟีเลีย

การวินิจฉัย

ในอดีต (ก่อนปี ค.ศ. 1970) อาศัยการตรวจพบ bleeding time ที่ยาวผิดปกติ ร่วมกับระดับ F VIII ที่ต่ำ แต่ปัจจุบันมีความรู้ ความเข้าใจถึงหน้าที่ที่แตกต่างกันในแต่ละ domain ของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ ทำให้สามารถให้การวินิจฉัยที่ไวมากขึ้น (ไวมากจนทำให้บางชนิดของความผิดปกติ เช่น Type 1 อาจจะไม่ถือว่าเป็นโรคเลือดออกผิดปกติ แต่เป็นเพียงปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้มีโอกาสเกิดเลือดออกผิดปกติมากขึ้นเท่านั้น¹⁵⁾ และจำเพาะต่อชนิดของโรคมากยิ่งขึ้น

การตรวจกรอง

เป็นการตรวจที่ทำในเบื้องต้นเมื่อพบผู้ป่วยที่มีปัญหาเลือดออกผิดปกติ ได้แก่ CBC, bleeding time, coagulation times เช่น aPTT, PT และ TT ซึ่งทำได้ทั่วไป การตรวจกรองดังกล่าวเป็นการตรวจที่ไม่ไวและมีความจำเพาะต่ำ เพราะยังอาจตรวจพบได้ในภาวะอื่นๆ จำเป็นต้องทำการตรวจพร้อมๆ กัน หลายอย่างเพื่อประกอบกันในการแปลผล

การตรวจจำเพาะและการตรวจเพื่อแยกชนิดของโรค

vWF (vWF:Ag) เป็นการตรวจหาปริมาณวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ในเลือดโดยวิธี ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) และพบว่าต่ำใน Type 1 และ Type 3 เนื่องจากการสร้างวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ได้ลดลง แต่ใน Type 2 ระดับวอนวิลลิแบรนด์

แฟกเตอร์ไม่ลดลง เพราะเป็นความผิดปกติในการสร้างวอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์ที่มีคุณสมบัติผิดปกติไป ข้อจำกัดของการวัดปริมาณ คือมีปัจจัยหลายประการที่มีผลกระทบต่อระดับวอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์ในเลือด เช่น หมดเลือด การอักเสบของร่างกาย¹⁶ การตั้งครรภ์ เป็นต้น สำหรับหมดเลือดพบว่าคนที่หมดเลือด โอ จะมีระดับวอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์ต่ำกว่าคนที่หมดเลือดเอ บี และเอบี ร้อยละ 25¹⁷ ดังนั้นการวินิจฉัยว่าเป็นโรควอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์ในคนที่หมดเลือดโออาจจะต้องใช้ระดับที่ต่ำกว่า โดยทั่วไปควรหาระดับในคนปกติที่มีหมดเลือดต่าง ๆ กัน และสำหรับการตั้งครรภ์ เชื่อว่าเอสโตรเจนที่สูงขณะตั้งครรภ์อาจจะมีผลทำให้วอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์สูงขึ้นด้วย เพื่อช่วยไม่ให้มีเลือดออกมากขณะคลอด ดังนั้นการวินิจฉัยโรคขณะตั้งครรภ์อาจไม่แน่ชัด

F VIII:C เป็นการตรวจระดับ F VIII โดยเป็นการตรวจการแข็งตัวของเลือดเป็นหลัก ระดับ F VIII ที่ต่ำในผู้ป่วยโรควอนวิลลิแบรนด์ส่วนใหญ่ การที่มีวอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์น้อยลงทำให้ไม่มีโปรตีนที่ช่วยป้องกันการทำลาย F VIII ทำให้ F VIII มีระดับต่ำลง นอกจากนี้จะพบ F VIII ต่ำมากใน Type 2N เนื่องจากเป็นความผิดปกติที่ binding site ระหว่างวอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์ และ F VIII โดยตรงทำให้มีการสลายตัวของ F VIII ได้ง่ายขึ้น

vWF:Rco เป็นการตรวจหน้าที่ของวอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์ของผู้ป่วยในการทำให้เกิดเลือดของคนที่ปกติเกาะกลุ่มโดยอาศัยการกระตุ้นของ ristocetin (ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่เคยนำมาใช้และพบว่าทำให้เกิดเลือดต่ำมากจนมีเลือดออกผิดปกติ) ค่าดังกล่าวจะต่ำกว่าปกติในผู้ป่วยโรควอนวิลลิแบรนด์ส่วนใหญ่

vWF: CBA เป็นการตรวจหน้าที่ของวอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์ของผู้ป่วยในการจับกับ collagen ที่เคลือบไว้บนผิวพลาสติก เป็นการตรวจที่เพิ่งมีการพัฒนาเมื่อไม่นานมานี้ เพื่อใช้วินิจฉัยในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติที่ A3 domain ทำให้ไม่สามารถจับกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้

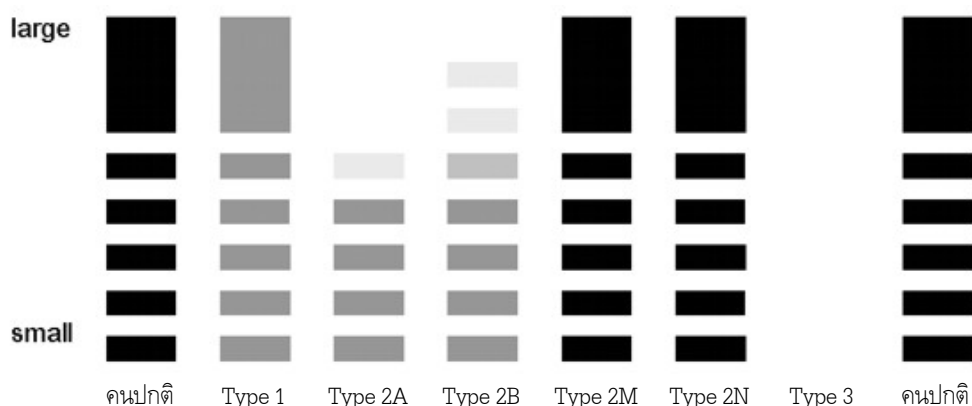
เช่นปกติ

RIPA (ristocetin-induced platelet aggregation) เป็นการตรวจหน้าที่ของวอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์ของผู้ป่วยในการทำให้เกิดเลือดของผู้ป่วยเองเกาะกลุ่มโดยอาศัยการกระตุ้นของ ristocetin (ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่เคยนำมาใช้และพบว่าทำให้เกิดเลือดต่ำมากจนมีเลือดออกผิดปกติ) เป็นการตรวจที่ไม่ไว มักจะผิดปกติใน Type 3 และ Type 2M นอกจากนี้จะมีประโยชน์มากในการช่วยวินิจฉัย Type 2B โดยพบว่าเกล็ดเลือดของผู้ป่วยชนิดนี้สามารถเกาะกลุ่มได้ด้วย ristocetin ขนาดต่ำ (3 มิลลิกรัม/เดซิลิตร) ซึ่งไม่สามารถทำให้เกิดเลือดของคนที่ปกติเกาะกลุ่มได้

vWF multimer เป็นการแยกวอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์ที่มีขนาดต่างกันในเลือดให้ออกจากกันโดยอาศัยการวิ่งในสนามไฟฟ้า เนื่องจากโมเลกุลใหญ่เท่านั้นที่สามารถทำหน้าที่ห้ามเลือดได้ ดังนั้นการขาดหายไปของ vWF multimer จึงเป็นการบอกว่าน่าจะมีภาวะเลือดออกผิดปกติ นอกจากนี้ยังสามารถใช้แยกชนิดของโรควอนวิลลิแบรนด์ได้ เพราะบางชนิดมี vWF multimer อยู่ครบ ในขณะที่บางชนิดก็ไม่มี vWF multimer เลย (ดูรูปที่ 3)

การรักษา

การรักษาขึ้นกับชนิดของโรควอนวิลลิแบรนด์และอาการเลือดออกผิดปกติเป็นหลัก ซึ่งจะได้กล่าวในรายละเอียดต่อไป ปัญหาที่สำคัญในการรักษา คือ แนวทางการรักษามาตรฐาน แม้ว่าอุบัติการณ์ของโรคจะมาก แต่ชนิดของโรคที่มีปัญหาเลือดออกผิดปกติรุนแรงมีน้อย (น้อยกว่าฮีโมฟีเลียมาก) ทำให้ไม่มีการทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการรักษาชนิดต่างๆ ทั้งขนาด ชนิด และระยะเวลาที่เหมาะสมในการรักษา ปัญหาอีกประการ คือ การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการวินิจฉัยโรค ที่ไม่สามารถนำมาใช้ติดตามผลการรักษาได้ทันที เช่น การรักษาจนกระทั่ง bleeding time เป็นปกติไม่มีความ



รูปที่ 3 แสดงภาพจำลองของการตรวจ vWF multimer

ตารางที่ 1 สรุปผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่พบในแต่ละชนิดของโรควอนวิลเลียบเรนด์

ชนิดของโรควอนวิลเลียบเรนด์	Factor VIII:C	vWF:Ag	vWF:Rco or vWF:CBA	RIPA	Multimer structure
Type 1	ลดลง	ลดลง	ลดลง	ลดลง	มี multimer ทุกขนาดแต่ติดสีจางลงทั้งในเลือดและเกล็ดเลือด
Type 2A	ลดลง หรือปกติ	ลดลง หรือปกติ	ลดลงมากกว่าที่ vWF:Ag ลดลง	ลดลงมากกว่าที่ vWF:Ag ลดลง	multimer ขนาดใหญ่และปานกลางในเลือดหายไป แต่ผลไม่แน่นอนถ้าตรวจจากเกล็ดเลือด
Type 2B	ลดลง หรือปกติ	ลดลง หรือปกติ	ลดลง หรือปกติ	กระตุ้นให้เกล็ดเลือดจับกลุ่มได้ด้วย ristocetin ขนาดต่ำกว่าปกติ	multimer ขนาดใหญ่และปานกลางในเลือดหายไป แต่เป็นปกติถ้าตรวจจากเกล็ดเลือด
Type 2M	ลดลง หรือปกติ	ลดลง หรือปกติ	ลดลงมากกว่าที่ vWF:Ag ลดลง	ลดลงมากกว่าที่ vWF:Ag ลดลง	ปกติทั้งที่ตรวจจากเลือดและเกล็ดเลือด
Type 2N	ลดลงปานกลาง	ปกติ	ปกติ	ปกติ	ปกติทั้งที่ตรวจจากเลือดและเกล็ดเลือด
Type 3	ลดลงปานกลาง	น้อยมาก หรือตรวจไม่พบ	ลดลงมาก	ลดลงมาก	ไม่มีทั้งที่ตรวจจากเลือดและเกล็ดเลือด

vWF:Ag = von Willebrand factor antigen; vWF:Rco = von Willebrand ristocetin cofactor;

vWF:CBA = von Willebrand factor collagen binding assay; RIPA = ristocetin induced platelet aggregation assay

จำเป็นยกเว้นรายที่มีเลือดออกในสมอง¹⁸ หรือแม้ว่าการยอมรับเอาระดับ vWF :Rco ที่ 50 ยูนิต/เดซิลิตร ว่าเพียงพอต่อการห้ามเลือดก็ยังไม่ใช่วิธีที่แน่ชัด เป็นต้น

Desmopressin 19 (1- deamino-8-D-arginine vasopressin หรือ DDAVP) เป็นสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของ antidiuretic hormone เริ่มนำมาใช้ครั้งแรกในโรคฮีโมฟีเลีย และวอนวิลลิแบรนด์ ในปี ค.ศ. 1977²⁰ โดย DDAVP มีฤทธิ์ต่างจาก antidiuretic hormone ตรงที่ไม่ค่อยมีฤทธิ์ vasoconstriction และไม่เพิ่มความดันโลหิต สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ในการห้ามเลือด คือ DDAVP จะไปกระตุ้นการหลั่ง F VIII และวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ จาก endothelium²⁰ โดยมีหลักฐานในหนูทดลองที่ถูกฉีด DDAVP จะมีระดับวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์สูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า มี P-selectin ซึ่งเป็นตัวชี้วัดถึง endothelial activation²¹ สูงขึ้นด้วย

ข้อบ่งชี้ เนื่องจากการกระตุ้นการหลั่งวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ที่สะสมอยู่ ดังนั้นใช้ได้ผลดีในโรควิลลิแบรนด์ Type 1 และ Type 2A สำหรับ Type 2N อาจจะได้ผลเป็นบางราย (ส่วนมากของ Type 2 จะสร้างวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ที่คุณภาพผิดปกติไป

ข้อห้ามใช้ Type 2B (เพราะวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ที่ผิดปกติจะจับเกล็ดเลือดและทำให้เกิดเลือดออกง่าย) และ Type 3 (เพราะร่างกายไม่สามารถสร้างวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ได้เลย)

ขนาดที่ใช้ รับประทาน ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย บรรจุหลอดละ 4 ไมโครกรัม ใช้สำหรับฉีดเข้าเส้นเลือดดำในขนาด 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม นาน 15-20 นาที โดยจะทำให้ ระดับ F VIII และ วอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ สูงขึ้นกว่า ระดับเดิม 3-5 เท่า และคงอยู่นาน 5-8 และ 8-10 ชั่วโมง สำหรับ F VIII และวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ ตามลำดับ

รูปยาผงมุก 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็น

ขนาดสูงกว่าที่ใช้ในการรักษาโรคเบาจัด (Central diabetes insipidus) ยาในรูปแบบนี้ไม่มีจำหน่ายในประเทศไทย

ข้อควรระวัง

1. ยาอาจทำให้มีภาวะน้ำคั่ง (Water intoxication) สมควรดูระดับโซเดียมในเลือดเป็นระยะๆ

2. ผู้ป่วยใหม่ที่ต้องการให้ DDAVP ควรตรวจระดับ F VIII และวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ ก่อนและหลังบริหารยาว่าได้ผลหรือไม่เพราะอาจจะได้ผลดีทุกราย

3. การให้ DDAVP ซ้ำๆ ในระยะเวลาอันสั้นจะทำให้ F VIII และวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ เพิ่มขึ้นไม่มากเท่าที่ควร (Tachyphylaxis) เพราะต้องรอเวลาให้ endothelium สร้างและเก็บสะสม F VIII และวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ขึ้นใหม่

4. ผู้ป่วยอาจจะมีอาการใจสั่น และหน้าแดงขณะบริหารยา

การให้วอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ทดแทน

แม้ว่า DDAVP สามารถใช้ได้ผลดีกับผู้ป่วยวอนวิลลิแบรนด์ส่วนใหญ่ แต่อีกประมาณร้อยละ 10-20 ของผู้ป่วยยังมีความจำเป็นต้องได้รับวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ทดแทน เช่น Type 2B, Type 3 และ Type 1 ที่ต้องการการรักษาเป็นเวลานานซึ่งการให้ DDAVP จะไม่ได้ผล

Cryoprecipitate ถูกใช้เป็นแหล่งของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ ในการรักษาโรควอนวิลลิแบรนด์มานาน²² สามารถห้ามเลือดได้ดี จวบจนกระทั่งยุคที่มีการแพร่ระบาดของไวรัสโรคเอดส์ ทำให้ความนิยมใช้ cryoprecipitate ลดลง และหันมาใช้ F VIII concentrate²³ เป็นแหล่งของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์มากขึ้น โดยที่ intermediate purified F VIII concentrate เช่น Alphanate (เป็นแหล่งของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ที่ดี ในขณะที่ high purified factor VIII concentrate (ที่ผลิตโดย monoclonal antibody affinity chroma-

tography หรือ recombinant technology ก็ตาม) ไม่สามารถใช้รักษาโรค von Willebrand ได้ เพราะเป็นผลิตภัณฑ์ที่เล็กวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์อยู่น้อยมาก

ปัญหาที่สำคัญหลักสองประการในการให้การรักษาทดแทนคือ การที่ไม่มีการกำหนดปริมาณของวอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ในผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด ไม่ว่าจะเป็น cryoprecipitate หรือ F VIII concentrate ให้เป็นมาตรฐาน และการขาดการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้เป็นมาตรฐานในการติดตามผลการรักษา ในทางปฏิบัติที่ทำกันมานาน คือการติดตามดูระดับ F VIII หลังให้วอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ เช่น การให้ cryoprecipitate ทุก 12-24 ชั่วโมงติดต่อกันนาน 48-72 ชั่วโมง พบว่าได้ผลดี สามารถห้ามเลือดได้ทุกราย สำหรับขนาดของ cryoprecipitate ที่จะให้สามารถคำนวณโดยใช้ F VIII เป็นเกณฑ์ โดยให้เพิ่มระดับ F VIII ตามแต่ละสถานการณ์เลือดออก ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 2^{28,29}

มีการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ การวัดระดับวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ในผลิตภัณฑ์ รวมทั้งการหาระดับวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ที่เหมาะสมในสถานการณ์ต่างๆ ปัจจุบันมีการศึกษาที่สมบูรณ์แบบ

คือ การศึกษา ของ Alphanate^{®30} โดยพบว่าระดับวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ (vWF:Rco) ต่อ ระดับ F VIII:C ในแต่ละขวดมีค่าเท่ากับ 1-2.6 (เฉลี่ย 1.6) และเมื่อให้ vWF:Rco ในขนาด 1 ยูนิต/กิโลกรัม จะสามารถเพิ่มระดับ vWF:Rco ในเลือด เท่ากับ 2.5-3 ยูนิต/เดซิลิตร โดยมีระยะครึ่งชีพเท่ากับ 6-7 ชั่วโมงเท่านั้น ในขณะที่ยาระยะครึ่งชีพของ F VIII เท่ากับ 24 ชั่วโมง ซึ่งยาวกว่าการให้ F VIII ในผู้ป่วย ฮีโมฟีเลียเอ เนื่องจากวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ ที่ให้เข้าไปจะป้องกัน proteolysis ของ F VIII ทั้งที่สร้างจากผู้ป่วยเองและ F VIII ที่ให้เข้าไป ผลการศึกษาที่น่าสนใจจากการศึกษานี้คือการที่หนึ่ง คือเลือดออกในทางเดินปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์ (genitourinary hemorrhage) และเลือดออกในกล้ามเนื้อและกระดูก (musculoskeletal hemorrhage) ต้องการระดับวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ในการห้ามเลือด สูงกว่าเลือดออกในทางเดินอาหาร และโพรงจมูก (gastrointestinal และ nasopharyngeal hemorrhage) นอกจากนี้ยังพบว่า bleeding time ไม่มีความสัมพันธ์กับภาวะเลือดออก กล่าวคือ ร้อยละ 20 ของผู้ป่วยยังคงมี bleeding time ยาวผิดปกติหลังการให้วิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ทดแทน และผู้ป่วยที่ bleeding time กลับมา

ตารางที่ 2 แสดงการให้วอนวิลลิแบรนด์แฟคเตอร์ทดแทนในภาวะต่างๆ

ลักษณะทางคลินิก	ขนาด F VIII:C เริ่มต้น (ยูนิต/กิโลกรัม)	จำนวนครั้งที่ให้	เป้าหมาย
การผ่าตัดใหญ่	40-60	ให้ซ้ำทุก 12-24 ชั่วโมง ในขนาด 25-40 ยูนิต/กก.	รักษาระดับ F VIII:C มากกว่า 50 ยูนิต/เดซิลิตร จนกว่าแผลหาย ซึ่งมักจะใช้เวลา 5-10 วัน
การผ่าตัดเล็ก	30-50	วันละครั้ง หรือวันเว้นวัน	รักษาระดับ F VIII:C มากกว่า 30 ยูนิต/เดซิลิตรจนกว่าแผลหาย ซึ่งมักจะใช้เวลา 2-4 วัน
การถอนฟัน	20-30	1 ครั้ง	รักษาระดับ F VIII:C มากกว่า 30 ยูนิต/เดซิลิตร นานอย่างน้อย 12 ชั่วโมง
เลือดออกเอง (spontaneous bleeding)	20-30	1 ครั้ง	รักษาระดับ F VIII:C มากกว่า 30 ยูนิต/เดซิลิตร
การคลอด	30-50	วันละครั้ง	รักษาระดับ F VIII:C มากกว่า 50 ยูนิต/เดซิลิตรนาน 3-4 วันหลังคลอด

ปกติจะปกติอยู่เพียง 6 ชั่วโมงเท่านั้น โดยที่ผู้ป่วยไม่มีปัญหาเลือดออก ขณะนี้ยังไม่สามารถหาคำอธิบายที่แน่ชัดได้ เชื่อว่าเลือดออกมีความสัมพันธ์กับระดับ F VIII มากกว่า bleeding time

การรักษาพร้อมอื่นๆ

การใช้ยาต้านการสลายลิ่มเลือด (antifibrinolytic agents) ที่มีใช้ในประเทศไทย คือ tranexamic acid ซึ่งมีฤทธิ์ห้ามการสลายลิ่มเลือด เป็นยาที่เหมาะสมกับเลือดออกในอวัยวะ ที่มี fibrinolytic activity สูงๆ เช่น ในช่องปาก และทางเดินปัสสาวะ โดยอาจจะใช้เป็นการรักษาเดี่ยว (ในรายที่เลือดออกไม่รุนแรง) หรือการรักษาควบคู่กันได้ โดยให้ในขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/ครั้ง แบ่งให้ 2-3 ครั้งต่อวัน มีทั้งรูปกิน (เม็ดละ 250 มิลลิกรัม) และฉีด (หลอดละ 250 มิลลิกรัม/5 มิลลิลิตร)

Conjugated estrogen³¹ มีฤทธิ์ในการห้ามเลือด ด้วยกลไกที่ไม่ทราบแน่ชัด มักต้องให้ในขนาดสูง และนิยมใช้ในรายที่มีประจำเดือนออกมากและนาน

สรุป

โรควิลลิแบรนด์ยังคงเป็นโรคเลือดออกผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบบ่อย แต่ให้การวินิจฉัยไม่ยากเนื่องจากอาการเลือดออกมีเล็กน้อยแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละราย และแม้ว่าจะมีการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นจำนวนมากที่ช่วยในการวินิจฉัยโรคแต่ยังมีข้อจำกัดทั้งนี้เป็นเพราะมีปัจจัยเป็นจำนวนมากที่รบกวนทำให้ค่ามากหรือน้อยกว่าความเป็นจริง แนวโน้มในอนาคตอาจจะไม่ถือว่า Type 1 เป็นโรคแต่เป็นเพียงปัจจัยเสี่ยงต่อภาวะเลือดออกเมื่อมีการทำหัตถการต่างๆ เท่านั้น การรักษาโรควิลลิแบรนด์ให้ได้ผลดีต้องมีความรู้ความเข้าใจในอนุพันธุศาสตร์และอาการทางคลินิกของโรคแต่ละชนิด การใช้ DDAVP มีประโยชน์ในผู้ป่วยส่วนใหญ่ (Type 1 และ Type 2 บางชนิด) แต่อีกร้อยละ 10-20 ต้องการให้วิลลิแบรนด์แฟกเตอร์ทดแทนไม่ว่าจะเป็น cryopre-

cipitate หรือ F VIII concentrate โดยข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์เกี่ยวกับวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์มีมากขึ้น ทำให้การรักษาโรควิลลิแบรนด์ในอนาคตจะมีมาตรฐานที่เป็นไปในแนวทางเดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

1. von Willebrand EA. Hereditar pseudohamofili. *Fin Lakaresallsk Hand* 1926;68:87-112.
2. von Willebrand EA. Über hereditäre pseudohämophilie. *Acta Med Scand* 1931;76:521-49.
3. von Willebrand EA. Über eine neue Bluterkrankheit, die konstitutionelle Thrombopathie. *Klin Wochenschr* 1933;12:414.
4. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidermiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987;69:454-9.
5. Werner EJ, Brobbsen EH, Tucker EL, Girov DS, Shults J, Abshire TC. Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study. *J Pediatr* 1993;123:893-8.
6. Zimmerman TS, Edgington TS. Factor VIII coagulant activity and factor VIII-like antigen: independent molecular entities. *J Exp Med* 1973;138:1015-20.
7. Lynch DC, Zimmerman TS, Collins CJ et al. Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor: authentication by a new method. *Cell* 1985;41:49-56.
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;228:1401-6.
9. Sadler JE, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Harlan Jm, Titani K, Davie EW. Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6394-8.
10. Verweij CL, Hofker M, Quadt R, Briet E, Pannekoek H. RFLP for a human von Willebrand factor (vWF) cDNA clone, pvWF1100. *Nucleic Acid Res* 1985;13:8289.
11. Sadler JE, Matsushita T, Dong Z et al. Molecular mechanism and classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 1995;74:161-6.
12. Ginsburg D, Sadler JE. Von Willebrand disease: a

- database of point mutation, insertion, and deletions. *Thromb Haemost* 1993;69:177-184.
13. Sadler JE, Ginsburg D. A database of polymorphisms in the von Willebrand factor gene and pseudogene. *Thromb Haemost* 1993;69:185-91.
 14. Ginsburg D. Molecular Genetics of von Willebrand Disease. *Thromb Haemost* 1999;82:585-91.
 15. Sadler JE. Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood* 2003;101:2089-93.
 16. Ates E, Bakkaloglu A, Saatci U, Soylemezoglu O. von Willebrand factor antigen compared with other factors in vasculitic syndromes. *Arch Dis Child* 1994;70:40-3.
 17. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987;69:1691-5.
 18. Blatt PM, Brinkhous KM, Culp HR et al. Antihemophilic factor concentrates therapy in von Willebrand's disease. Dissociation of bleeding-time factor and ristocetin cofactor activities. *JAMA* 1976;236:2770-2.
 19. Mannucci PM. Desmopressin (DDAVP) in the Treatment of Bleeding Disorders: The First 20 Years. *Blood* 1997;90:2515-21.
 20. Mannucci PM, Ruggeri ZM, Pareti FI, Capitanio A. DDAVP: a new pharmacological approach to the management of hemophilia and von Willebrand's disease. *Lancet* 1977;1:869-72.
 21. Kanwar S, Woodman RC, Poon MC, Murohara T, Lefer AM, Davenpeck KL, Kubus P. Desmopressin induces endothelial P-selectin expression and leukocyte rolling in post capillary venules. *Blood* 1995;86:2760-6.
 22. Mannucci PM. Biochemical characteristics of therapeutic plasma concentrates used in the treatment of von Willebrand disease. *Hemostasis* 1994;24:285-8.
 23. Rodeghiero F, Castaman G, Meyer D, Mannucci PM. Replacement therapy with virus-inactivated plasma concentrates in von Willebrand disease. *Vox Sang* 1992;62:193-9.
 24. Lethagen S, Berntorp E, Nilsson IM. Pharmacokinetics and hemostatic effect of different factor VIII/von Willebrand factor concentrates in von Willebrand's disease type III. *Ann Hematol* 1992;65:253-9.
 25. Hanna WT, Bona RD, Zimmerman CE, Carta CA, Hebert GZ, Rickles FR. The use of intermediate and high purity factor VIII product in the treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 1994;71:173-9.
 26. Dobrkovska A, Krzenski U, Chediak JR. Pharmacokinetics, efficacy and safety of Humate-P in von Willebrand disease. *Haemophilia* 1998;4(suppl3):33-9.
 27. Chang AC, Rick ME, Pierce LR, Weinstein MJ. Summary of a workshop on potency and dosage of von Willebrand factor concentrates. *Haemophilia* 1998;4(suppl 3):1-6.
 28. Mannucci PM. How I treat patient with von Willebrand disease. *Blood* 2001;97:1915-9.
 29. Mannucci PM, Chediak J, Hanna W et al. Treatment of von Willebrand disease with high-purity factor VIII/von Willebrand factor concentrate: a prospective, multicenter study. *Blood* 2002;99:450-6.
 30. Mannucci PM, Chediak J, Hanna W, Byrnes J, Ledford M, Ewenstein BM et al. Treatment of von Willebrand disease with a high-purified factor VIII/von Willebrand factor concentrate: a prospective, multicenter study. *Blood* 2002;99:450-6.
 31. Alperin JB. Estrogen and surgery in women with von Willebrand's disease. *Am J Med* 1982;73:367-71.

