

Choroba von Willebranda u psów

Agnieszka Łobodzińska, Joanna Gruszczyńska

z Katedry Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Wydziału Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Czynnik von Willebranda jest białkiem osocza biorącym udział w krzepnięciu krwi. Jest on przede wszystkim konieczny do adhezji płytek krwi do kolagenu w miejscu uszkodzenia naczynia, a więc warunkuje powstanie pierwotnego czopa hemostatycznego. Zaburzenia wynikające z jego niedoboru lub nieprawidłowości strukturalnych nazywane są chorobą von Willebranda (von Willebrand disease – vWD). U zwierząt choroba ta została opisana u takich gatunków, jak: pies, kot, królik, mysz, świnia, koń i bydło (1). Wśród wymienionych gatunków typ 1 choroby wykazano u myszy i psa, typ 2 u psa, królika, konia i bydła, a typ 3 u psa, świni i kota. Chorobę opisano u ponad pięćdziesięciu ras psów. U dziesięciu z nich częstość występowania jest szczególnie wysoka, bo dotyczy od 15 do 60% populacji (1).

U zwierząt dotkniętych chorobą von Willebranda występują krwawienia na powierzchni skóry i błon śluzowych, a czas krwawienia w miejscu uszkodzenia jest znacznie wydłużony (2). Choroba jest jedną z najczęściej występujących u psów odziedziczalnych skaz krwotocznych. Pierwsze przypadki tej choroby odnotowano w 1970 r. w rodzinie owczarków niemieckich (3), a w 1972 r. u teriera szkockiego (4). Pierwsze badania epidemiologiczne przeprowadzono w latach 1988–1992 w australijskiej populacji psów rasy doberman. Genetyczne nieprawidłowości są częściej rozpoznawane we wczesnym okresie życia, niezależnie od płci, ale choroba może mieć postać wrodzoną lub nabytą, o stopniu nasilenia objawów od łagodnego do ciężkiego. Źródła literaturowe podają, że niektóre rasy psów są szczególnie obciążone efektem genetycznym usposabiającym do

jej występowania, np. doberman i airedale terier (1,5), natomiast wśród mieszańców pojawia się ona stosunkowo rzadko (6).

Gen kodujący czynnik von Willebranda

Występowanie choroby związane jest z defektem w genie kodującym białko nazywane czynnikiem von Willebranda (von Willebrand factor – vWF). Gen prekursorowy *vWF* (zwany również *F8VWF*) u *Canis lupus familiaris* zlokalizowany jest w chromosomie 27 (Ensembl: ENSCAFG00000015228), jednak status dostępnej w bazach danych sekwencji referencyjnej jest określony jako tymczasowy. Jego długość wynosi ponad 137 kbp i składa się z 52 egzonów. Venta i wsp. (7) ustalił doświadczalnie sekwencję cDNA całkowitej długości genu *vWF*, a także sekwencję aminokwasową białka kodowanego przez ten gen. Autorzy ci zidentyfikowali także obecność mutacji w sekwencji nukleotydowej, przyczyniającej się do wystąpienia choroby von Willebranda u psów ras: szkocki terier, doberman, owczarek szetlandzki, manchester terier i pudel. Pozwoliło to na ustalenie nosicieli wadliwego genu *vWF*, a także zmniejszenie częstości występowania choroby również wśród innych

ras psów. W bazie GenBank znaleźć można umieszczone pełnej długości sekwencji cDNA (nr sekwencji: L76227, U66246, AF099154) kodujące *vWF* psa, opracowane przez niezależnie pracujące trzy zespoły badawcze (8).

W ramach prowadzonych badań opracowano i skonstruowano mapy genetyczne. Do powstania jednej z nich posłużono się piętnastoma polimorficznymi markerami molekularnymi reprezentującymi geny o znanej funkcji, a także określono odległości między nimi. Ze względu na ich informatywność, wiele z tych *loci*, w tym *locus vWF*, z powodzeniem zastosowano w mapowaniu porównawczym genów warunkujących występowanie wielu chorób u psów. Dalsze badania z wykorzystaniem zintegrowanej hybrydowej mapy na bazie promieniowania (WG-RH) z powiększoną pulą markerów, z uwzględnieniem ich kolejności na genetycznej mapie sprzężeniowej, umożliwiło uzyskanie jeszcze większej liczby danych, np. na temat pochodzenia mutacji w obrębie genu *vWF*, a także przyczyniło się do udoskonalenia genetycznej mapy sprzężeniowej psa.

Białko *vWF* – czynniki regulujące jego wytwarzanie oraz ich rola

U psów czynnik von Willebranda jest syntetyzowany w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, magazynowany i uwalniany do macierzy pozakomórkowej pod śródbłonkiem naczyń oraz do osocza. U psów białko to nie jest syntetyzowane w megakariocytach, ani nie jest magazynowane w ziarnistościach płytek krwi (9). Niektórzy autorzy uważają jednak, że *vWF* jako duża multimeryczna osoczowa cząsteczka jest produkowana zarówno przez komórki śródbłonna, jak megakariocyty (10). W typie 3 choroby von Willebranda, u chorych psów przedwczesna terminacja w czasie syntezy tego białka skutkuje jego brakiem, a ich komórki śródbłonna naczyniowego nie mają ciałek Weibel-Palada i nie mogą magazynować tego czynnika (9).

Analiza regionu propeptydu, powstałego w produkcji białkowym sekwencji AF099154, wykazała, że jest nieco mniej konserwatywny od dojrzałego białka (81,4 w porównaniu do 87,5%; 8). Wyprodukowanie w pełni funkcjonalnego czynnika *vW* wymaga, aby pojedyncze monomeryczne łańcuchy białkowe uległy po drodze dimeryzacji, a następnie polimeryzacji i utworzyły aktywne biologiczne multimery *vWF* gotowe do sekrecji (11). Wynikiem transkrypcji jest mRNA *vWF* o długości sekwencji 8694 kbpz (GenBank: NM_001002932) kodującej białko zbudowane z 2813 aa (prekursor *vWF*) (GenBank: NP_001002932). W skład prekursorowego *vWF* wchodzi następujące konserwatywne

domeny: 3 A podrodziny *vWA* (tzw. *vWA* subfamily ECM), 1 C (*vWC*; von Willebrand factor type C domain), 1 CT (CTCK; C-terminal cystine knot – like domain), 4 D (*vWD*), 4 C8 (domena C8 z 8 resztami cysteinowymi), 4 TIL (trypsin inhibitor like cysteine rich domain), 3 nadrodziny C (tzw. *vWC* super family) zawierające miejsca o znanych funkcjach biologicznych. I tak, np.: domena A zawiera miejsce wiązania ligandu zależne od obecności jonu metali (MIDAS; metal ion – dependent adhesion site), miejsce wiązania glikoproteiny Ib (GPIb) i kolagenu; domeny D: D1 i D2 pełnią funkcję strukturalną, budując N-terminalny koniec propeptydu, podczas gdy pozostałe domeny D są wymagane do procesu multimeryzacji. Ponadto przewiduje się, że domena CT bierze udział w formowaniu homodimerów albo TIL, której dziesięć reszt cysteinowych tworzy razem pięć wiązań disiarczkowych (12).

W przypadku psów na różnorodność postaci choroby może również mieć wpływ wiele czynników regulujących poziom czynnika von Willebranda. Między innymi jest to niedobór hormonów tarczycy. U psów z niedoczynnością tarczycy wykazano obniżony poziom *vWF*. Niskie stężenie czynnika występuje też u zwierząt u heterozygotycznych nosicieli predyspozycji do hipotyreozy, niewykazujących klinicznych objawów choroby (13). Odnotowano, że na wzrost poziomu *vWF* mają wpływ również intensywne ćwiczenia oraz wyrzut adrenaliny (14). Stężenie osoczowego czynnika *vW* podlega wahaniom osobniczym w ciągu doby i tygodnia. Warto zwrócić uwagę przy przygotowywaniu próbek krwi do oznaczeń, że hemoliza może przyczynić się do zmniejszenia stężenia *vWF*. Z kolei Moser i wsp. (15) wykazali, że krew pobierana do badań może być lipemiczna. Na poziom *vWF* w próbce nie wpływają: jej 4-krotne zamrażanie i rozmrażanie, dodatek wersenianu sodu, wirowanie przy 100 g, a także przechowywanie osocza lub pełnej krwi przez 8 godz. w temperaturze pokojowej. Stężenie *vWF* nie zmienia się znacząco u szczeniąt między 3 a 180 dniem życia, dlatego wyniki uzyskane w młodszym wieku psa są podobne do otrzymanych po 6 miesiącach życia (15).

Jak wspomniano na wstępie, czynnik von Willebranda pełni podwójną rolę w hemostazie: umożliwia adhezję płytek w miejscu uszkodzenia naczynia krwionośnego, a także transportuje i chroni osoczowy czynnik VIII (FVIII) układu krzepnięcia krwi (16). Niedobór *vWF* prowadzi zarówno do trombocytarnych, jak i osoczowych zaburzeń w układzie krzepnięcia krwi (17). Utrzymanie płynności krwi w łożysku naczyniowym polega na kontroli i równoważeniu pomiędzy zdarzeniami

Von Willebrand's disease in dogs

Łobodzińska A., Gruszczyńska J., Department of Genetics and Animal Breeding, Faculty of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

This paper aims at the presentation of von Willebrand's disease (vWD), a congenital hemorrhagic diathesis inherited as an autosomal dominant trait in dogs. It occurs also in pigs and rabbits. Von Willebrand's disease is one of the most common coagulation disorders in dogs caused by a deficiency or dysfunction of macromolecular plasma glycoprotein called von Willebrand factor (vWF). It is characterized by a prolonged bleeding time, deficiency of coagulation factor VIII, often impairment of platelet adhesion and usually associated with mild bleeding tendencies. The vWD is very difficult to recognize. There are three primary variants of the disease depending on its inheritance. Main predisposed breeds are: Doberman, Poodle, Manchester Terrier, Bernese Mountain Dog, Pinscher Average (type 1 vWD), German Wirehaired Pointer (type 2 vWD) and the Scottish terrier, Sheltie (type 3 vWD). Highly sophisticated as well as very specific genetic tests allow to identify the animal genotype correctly and is superior over clinical research methods. The essential result of the low level of vWF is an increasing tendency to spontaneous, prolonged bleeding from mucous membranes during teeth replacement, acute trauma or surgery. The key point is not to eliminate carriers of vWD when breeding, but conscious crossing the individuals after detailed genetic testing by foremost identifying the potential risk of this disease in dogs. The article is the comprehensive study about vWD in dogs with regard to genetic factors and clinical symptoms, diagnostic methods and the treatment options.

Keywords: von Willebrand's disease, von Willebrand factor, hemostasis.

krwotocznymi a wieloetapowymi procesami krzepnięcia krwi. Czynnik von Willebranda jest jednym z wielu mediatorów biorących udział w tym procesie i determinuje działanie prozakrzepowe i promuje tworzenie czopu płytkowego (18). Powoduje on adhezję i agregację płytek (za pośrednictwem receptora *vWF*) do odsłoniętych włókien kolagenowych, jednocześnie jest nośnikiem czynnika VIII, tym samym mającym wpływ na hemostazę.

W następstwie vWD dochodzi przede wszystkim do zaburzeń hemostazy pierwotnej (10, 17). Przy czym zależnie od tego, czy występuje niedobór ilościowy lub strukturalny (niedobór dużych multimerów) czynnika von Willebranda różni się różne typy choroby, o odmiennym sposobie dziedziczenia (17). Wyniki wielu badań psów z vWD udowadniają, że nie przejawiają one tendencji do tworzenia płytki miażdżycowej, a także sugerują,

że to osoczowy, a nie płytkowy vWF jest wymagany w odpowiedzi wewnątrzcząsteczkowej płytek i w reakcji tworzenia mikrokrzepów, oraz że zakrzepowej płamicy małopłytkowej (TTP) nie można wywołać w przypadku braku vWF w osoczu (19), a indukcja okluzyjnej zakrzepicy związana jest z obecnością vWF w osoczu lub w warstwie podśróbłonkowej naczyń (20).

Podłoże genetyczne choroby von Willebranda

Prawidłowo przeprowadzona diagnostyka laboratoryjna pozwala na zaklasyfikowanie przypadków w zależności od ilości i postaci czynnika von Willebranda do jednego z trzech typów choroby (tab.1; (21).

Choroba von Willebranda u psów charakteryzuje się zróżnicowaniem wzorów dziedziczenia, heterogennością defektów w genie i zmiennością w ekspresji zmutowanego genu, a w rezultacie odmiennym poziomem koncentracji vWF: Ag (25) oraz niejednorodnością klinicznych objawów choroby (26). We wszystkich opisanych przypadkach psów z vWD występowało również niskie stężenie FVIII (3).

Typ 1

Typ 1 może być dziedziczony recesywnie, ale w większości przypadków jest to

zaburzenie o dominującym sposobie dziedziczenia i zmiennej penetracji w zależności od mutacji (6). Jest to najłagodniejsza i najczęściej występująca postać choroby. Jej występowanie zarejestrowano w populacji psów należących do większości ras spośród tych, u których odnotowano pozostałe typy choroby von Willebranda (tab. 1). W typie 1 choroby w osoczu występują wszystkie multimery czynnika von Willebranda, ale ogólne stężenie vWF jest obniżone (zwykle mniej niż 35% normy, a często tylko 5–10% normalnego poziomu). Duża zmienność objawów wynika z różnych poziomów vWF: Ag, a także zależy od rasy (26). Typ 1 vWD często występuje u dobermanów (ok. 63% populacji w Ameryce Północnej), a rzadziej u psów rasy airedale terier (18). Również w populacji polskiej dobermanów odnotowano vWD, a częstość występowania była podobna, jak u psów tej rasy w innych krajach (27). Stwierdzono, że psy rasy berneński pies pasterski również są predysponowane do tej choroby (28). U psów rasy doberman występujące jednocześnie: niski poziom mRNA vWF, jak również obniżone wydzielanie tego czynnika ze śródbłonna, wynikają z obecności uszkodzenia zaburzającego proces ekspresji genu vWF (3). W badaniach prowadzonych w populacji dobermanów, u których stwierdzono jednocześnie narkolepsję i chorobę von

Willebranda wykazano, że homozygotyczność pod względem tego genu u psów nie ma charakteru letalnego. Inni autorzy wskazują, że np. mutacja „zmiany miejsca składowania” (splice junction), którą udało się zlokalizować na końcu egzonu 43 u psów rasy doberman, może być odpowiedzialna za powstanie vWD. Testy diagnostyczne pozwoliły wykryć obecność identycznych mutacji u takich ras psów, jak: pudel oraz manchester terier (7).

Typ 2

Typ 2 choroby von Willebranda jest warunkowany genem autosomalnym recesywnym (tab. 1), a także charakteryzuje się niską wartością vWF: Ag i spadkiem ilości multimerów wysokocząsteczkowych w osoczu. Występuje dość rzadko, ale cechują go jednocześnie poważniejsze w skutkach krwawienia, przy czym wartość vWF: Ag nie jest skorelowana z występowaniem multimerów.

Występowanie choroby von Willebranda typu 2 zidentyfikowano u psów ras: wyżeł niemiecki krótkowłosey (29) i szorstkowłosey (30), u których zidentyfikowano identyczne warianty nukleotydowe vWF. Zaburzenia krzepnięcia, wiążące się z brakiem dużych multimerów vWF i vWF: Ag, wywołane zostały mutacją w egzonie 28 – defektem pojedynczego nukleotydu AAT

Tabela 1. Klasyfikacja, charakterystyka i predyspozycje rasowe psów do choroby von Willebranda (3, 4, 5, 7, 10, 16, 21, 22, 23, 24)

Typ	Dziedziczenie	Rasy psów, u których choroba występuje najczęściej	Opis i charakterystyka choroby
1	autosomalne dominujące lub autosomalne recesywne (?)	doberman*, pinczer niemiecki*, manchester terier*, kerry blue terier*, berneński pies pasterski*, miniaturowy pudel*, duży pudel*, spaniel kontynentalny (papillon – odmiana ze stojącymi uszami)*, pembroke welsh corgi*, akita inu, airedale terier, basset hound, coton de tulear, jamnik, wyżeł fryzjski*, pinczer średni*, golden retriever, chart hiszpański, wilczar irlandzki, szpic wilczy, sznaucer miniaturowy, rottweiler, drentse patrijshond*	<ul style="list-style-type: none"> dotyczy ponad 90% przypadków choroby duża zmienność penetracji i ekspresji; różnorodność form brak objawów choroby przy koncentracji vWF poniżej 20%; różne nasilenie – przedłużony czas krwawienia, jak również znaczne krwawienia; łagodniejszy przebieg niż w typach 2 i 3 w osoczu występują wszystkie rozmiary multimerów o prawidłowej strukturze vWF; niskie stężenie vWF (mniej niż 50%), niskie stężenie vWF: Ag i vWF: CB (proporcja 1: 1) poziom FVIII zmienny, obniżony
2	autosomalne recesywne	Typ 2A wyżeł niemiecki szorstkowłosey*, wyżeł niemiecki krótkowłosey*	<ul style="list-style-type: none"> postać ciężka zdarza się bardzo rzadko niedobór antygenu vWF w osoczu, np. u wyźłów niemieckich krótkowłosych – vWF: Ag – 12–27%, przez co wydłuża się czas krwawienia zaburzona struktura vWF – obecne tylko małe multimery vWF, brak większych multimerów niskie stężenia vWF: Ag i vWF: CB (stosunek >2) poziom FVIII zredukowany
3	autosomalne recesywne	terier szkocki*, owczarek szetlandzki*, chesapeake bay retriever, płochacz holenderski*	<ul style="list-style-type: none"> postać bardzo ciężka; duża skłonność do krwawień zdarza się rzadko niedobór lub całkowity brak vWF we krwi (<0,1% normy) zaburza stabilizację czynnika VIII i uniemożliwia przyłączenie płytek krwi do kolagenu w osoczu: całkowity brak vWF lub śladowe ilości niewykrywalne vWF: Ag lub vWF: CB poziom FVIII zmienny – 15–50%

* rasy, dla których zostały opracowane diagnostyczne testy DNA

Inne rasy psów, u których odnotowano chorobę: chart afgański, alaskan malamute, cocker spaniel amerykański, australian cattle dog, chart afrykański, bearded collie, bichon frise, bokser, buldog angielski, cairn terier, collie, cocker spaniel angielski, seter angielski, springer spaniel angielski, dog niemiecki, pirenejski pies górski, seter irlandzki, charcik włoski, kuwacz, labrador retriever, lakeland terier, lhasa apso, owczarek staroangielski bobtail, samoyed, shih tzu, siberian husky, skye terier, foksterier krótkowłosey, terier pszczyński (irish soft coated wheaten) terier, duży szwajcarski pies pasterski, terier tybetański, wyżeł węgierski, whippet, foksterier szorstkowłosey, yorkshire terier.

na AGT (zamiana N na S zlokalizowana w domenie A2 genu), co wykryto za pomocą testu diagnostycznego (29). Poza tym pojedyncze przypadki vWD typu 2 odnotowano u owczarków niemieckich, owczarków szetlandzkich, welsh corgi pembroke, pinczerów miniaturowych, rottweilera i u mieszańca.

Typ 3

Typ 3 choroby von Willebranda jest najcięższą i zagrażającą życiu postacią choroby, gdyż występuje całkowity brak białka vWF (tab. 1). Podobnie, jak w typie 1 vWD fenotyp typu 3 również uzależniony jest od poziomu vWF: Ag (18). Choroba von Willebranda typu 3 dziedziczy się autosomalnie recesywnie. Nosiciele typu 3 vWD wykrywa się u takich ras, jak np.: terier szkocki (31, 32), owczarek szetlandzki (33) czy płochacz holenderski. Choroba zdarza się sporadycznie również u psów rasy chesapeake bay retriever (34), a w przypadku psów rasy kooikerhondje wyniki laboratoryjne przypominały opisane u ras: szkocki terier i chesapeake bay retriever (35). Aktywność FVIII zwykle zmienia się w zakresie 15–50% (3), a poziom aktywności FVIII: C jest zmniejszony i zazwyczaj oscyluje między 30 a 40% normy (5). Sekwencja cDNA opublikowana przez Haberichter i wsp. (11) pozwoliła na zidentyfikowanie mutacji wywołującej chorobę von Willebranda u psów pochodzących z Chapel Hill (9). Usunięcie pojedynczego nukleotydu w pozycji 255 (Δ C255) spowodowało mutację przesunięcia ramki odczytu prowadzącą do przedwczesnego powstania kodonu stop w egzonie 4. Ta sama mutacja została zidentyfikowana u psów rasy szkocki terier (8). Natomiast badania przeprowadzone wśród czterech holenderskich psów rasy kooikerhondje pochodzących od jednego hodowcy, u których wystąpiły objawy związane z niedoborem charakterystyczne dla typu 3 choroby von Willebranda, pozwoliły odnaleźć lokalizację dwóch mutacji: tranzykcji G→A w pierwszej pozycji sekwencji donorowego miejsca łączenia należącego do intronu 16 (mutacja splicingowa na granicy 16 intronu i 16 egzonu) i mutację missens w 208 nukleotydzie (G→A) w egzonie 3, która wydaje się być odpowiedzialna za wywołanie vWD typu 3 (36). Do powstania typu 3 choroby von Willebranda może przyczynić się również delecja obejmująca pojedynczą zasadę, np. w pozycji 85 sekwencji aminokwasowej prepro-vWF cDNA, którą zidentyfikowano u psa rasy terier szkocki (11), delecja w egzonie 4 genu vWF u teriera szkockiego, delecja pojedynczej tyminy (T) w pozycji 735 nukleotydu regionu kodującego u owczarka szetlandzkiego (7) bądź mutacja zerowa (typu null)

warunkująca całkowitą utratę czynnika von Willebranda w osoczu i płytkach krwi, co zostało opisane w holenderskiej rasie kooikerhondje (37).

Nabyta postać choroby von Willebranda

Udokumentowane postaci nabytej choroby von Willebranda u psów związane są z obecnością nadmiernych naprężeń ścinających w przepływie krwi, np. przy znacznym zwężeniu zastawki aortalnej. W rezultacie rozwinięta cząsteczka białka vWF jest natychmiast cięta przez dezintegrynę i metaloproteinazę zawierającą domenę podobną do trombospondyny-1 (A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, member 13 – ADAMTS13; 5). Mechanizmy nabytej choroby von Willebranda wskazują również na związek z niedoczynnością tarczycy oraz środkami zastępującymi osocze, np. hydroksyetyloskrobia lub dekstran). Nabyty zespół von Willebranda (AvWS), charakteryzujący się brakiem multimerów vWF o dużej masie cząsteczkowej, został ostatnio wykryty u psów o turbulentnym przepływie krwi spowodowanym uszkodzeniem zastawek serca. Dlatego uważa się, że testy przesiewowe u zwierząt z oznakami krwawień i chorób powiązanych z AvWS, pozwalające na wykrycie oraz wdrożenie postępowania korygującego defekty jakościowe i ilościowe dotyczące vWF, są uzasadnione i pozwolą zapobiec nasileniu ich występowania. U dobermanów wykazano, że pierwotnie udokumentowana skłonność do występowania niedoczynności tarczycy nie jest przyczyną vWD odziedziczonej po rodzicach (38).

Badania diagnostyczne prowadzone u psów z nabytą postacią choroby von Willebranda, ujawniły m.in. wydłużenie czasu krwawienia, a w osoczu niską koncentrację vWF. Najczęściej towarzyszące zaburzenia kliniczne związane są z gospodarką hormonalną, nie tylko niewydolnością tarczycy, ale również zaburzeniami związanymi z występowaniem rui oraz porodem, wydają się nie bez znaczenia w tym przypadku (2).

Objawy kliniczne

Nasilenie objawów choroby zależy między innymi od tego, czy została odziedziczona po jednym, czy obojgu rodziców. Zróżnicowanie objawów u chorych psów jest duże, od łagodnych do ciężkich zdarzeń krwotocznych. Nosiciele defektu genetycznego mogą nie przejawiać żadnej tendencji do krwawień. Jedne z pierwszych badań przeprowadzonych przez Dodds (39) wskazywały, że choroba może ujawniać się w trzech postaciach: o poważnym nasileniu zaburzeń hemostazy (występującym

u homozygot i zazwyczaj przypadki te są letalne), w sposób umiarkowany bądź łagodny (heterozygoty) i o tzw. niecałkowitym wpływie (heterozygoty), przy czym w dwóch ostatnich przypadkach choroba von Willebranda może przejawiać skrajne postaci heterozygotyczności lub odzwierciedlać zmienną penetrację defektywnego genu. U osobników heterozygotycznych, u których choroba ma charakter penetracyjny, ujawnia się skaza krwotoczna. Podczas gdy przy braku penetracji się nie ujawnia (2). W ciężkiej postaci choroby von Willebranda pojawiają się spontaniczne krwawienia z nosa, jamy ustnej, dróg moczowych, układów oddechowego i rozrodczego lub jelit. Często choroba diagnozowana jest dopiero po wielu latach podczas zranień lub podczas poważnych uszkodzeń zabiegów chirurgicznych, np. podczas sterylizacji.

U szceniąt z podejrzeniem występowania choroby von Willebranda mogą się ujawniać silne krwawienia po usuwaniu pazurów bądź przy wymianie zębów. Wysoka śmiertelność u szceniąt i niewielka ich liczba w miocie mogą być związane z występowaniem tej choroby. Jednak ze względu na fakt, że przeważnie nie przeprowadza się sekcji zwłok szceniąt, to nie są wykrywane krwawienia, będące przyczyną śmierci. Do najczęściej spotykanych powikłań krwotocznych zalicza się: krwawe wylewy, kulawinę spowodowaną krwawieniami okołostawowymi, smoliste stolce, przewlekłą krwawą biegunkę, krwawienia w czasie rui, poporodowe krwawe wydzieliny z pochwy, poronienia lub padnięcia nowo narodzonych szceniąt, nadmierne krwawienie z pępownicy po urodzeniu i krwawienia do stawów. Objawy ciężkiej postaci choroby von Willebranda zwykle pojawiają się w pierwszym roku życia, są to: epizody krwawienia z dziąseł lub nosa bez wyraźnego powodu oraz krwawe stolce i krwiomocz. Mogą również występować spontaniczne krwawienia do światła macicy, krwawienia z przewodu pokarmowego i dróg moczowych. Z wiekiem objawy te są coraz mniej dotkliwe, a także ustępują wraz z kolejnymi ciążami. Epizody krwawienia mogą mieć związek z wysiłkiem fizycznym, cieżką lub ciążą. W tych sytuacjach wskazane jest przeprowadzenie testu przesiewowego w kierunku choroby von Willebranda (24, 39). Z obecnością takich krwawień wiążą się jednocześnie mniej lub bardziej nasilone bóle, które zależą od postaci choroby i obszaru krwawienia. W przypadku utraty krwi w obrębie stawów lub czaszki, czyli miejsc o ograniczonej przestrzeni, powstające ciśnienie może wywołać silne bóle. Generalnie krwawienia nie wywołują bólu, ale raczej nudności, mogą one powodować ogólne osłabienie, a w sytuacjach

ciężkich – zapaść, drgawki, a nawet śmierć. Za wyjątkowo stresujące uważa się również same zabiegi transportu psa do kliniki lub zabiegi związane bezpośrednio z samym leczeniem. Do objawów możliwych, o innym charakterze, a wywołanych pozornie drobnymi urazami, zalicza się zaburzenia neurologiczne, w tym porażenie kończyn, tetraplegię lub utratę czucia bólu głębokiego (40). Jako objawy dodatkowe mogące towarzyszyć chorobie oprócz krwawień wewnątrzczaszkowych, będących źródłem objawów neurologicznych, mogą być także słabe gojenie się ran lub kulawizna. Dunn i wsp. (41) opisali przypadek, w którym dopiero pośmiertne badanie mózgu u 12-tygodniowego dobermana pozwoliło ujawnić obecność wewnętrznego wodogłowia z krwotokiem do komór. Wykazano jednocześnie, że zwierzę doznało poważnego krwawienia śródczaszkowego na skutek niskiego poziomu antygenu vWF, a krwawienie prawdopodobnie jeszcze nasilało ogólne działanie wywołane niską liczbą

płytek krwi (41). Już początkowe badania kliniczne (1985–1988) prowadzone na grupie psów, dotkniętych chorobą von Willebranda należących do trzech ras, wskazały i potwierdziły w chwili rozpoznania choroby, że znaczne różnice międzyrasowe zależą od wieku (u dobermana – średni wiek 4,6 lat; terier szetlandzki – 1,7 rok życia; owczarek szetlandzki – 1,9 rok życia) i koncentracji vWF: Ag (odpowiednio 15, 0 i 8%; 26).

U psów dotkniętych chorobą von Willebranda stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych, niektórych antybiotyków, np. penicyliny, ampicyliny i sulfamidów oraz leków przeciwhistaminowych i pochodnych fenotiazyny mogą nasilać krwawienia (5).

Postępowanie diagnostyczne: badania przesiewowe i specjalistyczne

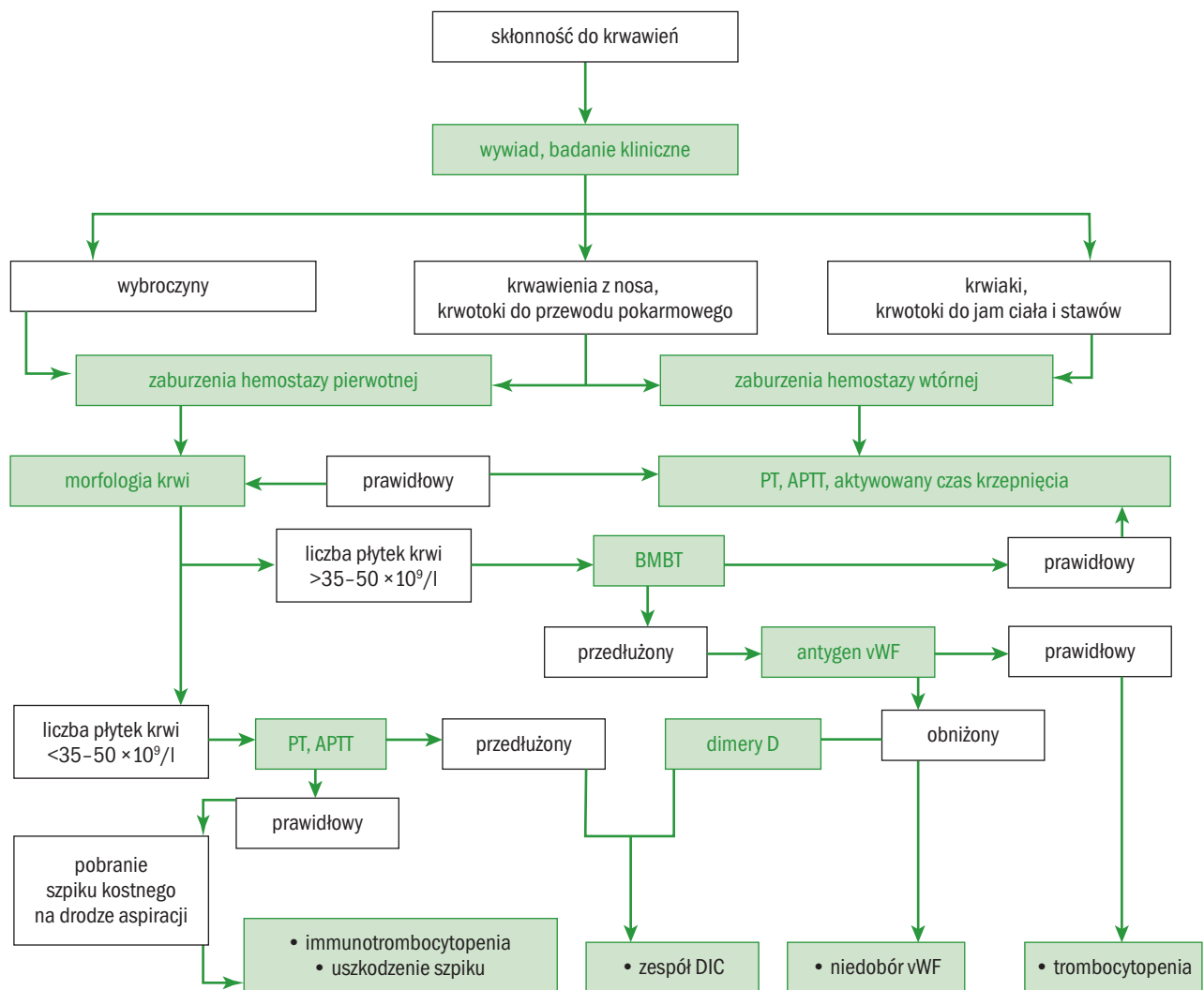
Diagnostyka skaz krwotocznych, w tym choroby von Willebranda, jest trudna i wieloetapowa. Algorytm postępowania

diagnostycznego w rozpoznawaniu choroby von Willebranda jest przedstawiony na **ryc. 1**.

Stwierdzenie określonego zaburzenia hemostazy pierwotnej bądź wtórnej charakteryzującego daną jednostkę chorobową nie jest możliwe bez:

- 1) przeprowadzenia wywiadu chorobowego mającego na celu określenie danego fenotypu z zaznaczeniem, jakie leki zostały podane, w jakim środowisku znajdowało się zwierzę oraz jaki jest charakter i czas trwania problemu;
- 2) pełnego badania klinicznego, wraz z badaniem palpacyjnym jamy brzusznej, badaniem rektalnym i badaniem dna oka;
- 3) przeprowadzenia badań laboratoryjnych uzupełniających i specjalistycznych, wykorzystując protokoły testowe w kierunku konkretnych koagulopatii (10).

W celu oceny zdolności koagulacyjnych i fibrynolitycznych krwi wykonuje się testy przesiewowe. Na ogół nie wystarczają one do rozpoznania określonego typu



Ryc. 1. Algorytm diagnostyczny choroby von Willenranda u psów (10)

Objaśnienia: PT – czas protrombinowy, APTT – czas częściowej tromboplastyny po aktywacji, BMBT – czas krwawienia z błony śluzowej policzka, dimery D – fragmenty fibryny powstałe pod wpływem plazminy, zespół DIC – zespół rozsiazonego krzepnięcia wewnątrznaczyniowego

choroby von Willebranda, ponieważ u chorych psów większość parametrów jest prawidłowa (5, 10), ale ich przeprowadzenie jest istotne na wstępnym etapie, gdy chodzi o odróżnienie choroby von Willebranda od innych skaz krwotocznych. Do sporządzenia profilu diagnostycznego przeprowadza się pomiary: liczby płytek krwi, czasu krwawienia z błony śluzowej policzka, aktywowanego czasu częściowej tromboplastyny (APTT) lub aktywowanego czasu krzepnięcia (ACT), czasu protrombinowego (PT, OSPT), czasu trombinowego (TT), produktów degradacji fibrynogenu i fibryny (FDP) oraz D-dimerów (5), a także wartość hematokrytu (43). W związku z niegdyś błędnym diagnozowaniem choroby von Willebranda jako hemofilii A, podstawą do ich odróżnienia jest określenie stężenia osocowego czynnika VIII krzepnięcia krwi, którego niedobór jest przyczyną hemofilii (44).

Wartościowe w postawieniu rozpoznania jest określenie czasu krwawienia z błony śluzowej policzka, którego wydłużenie świadczy o zaburzeniu pierwotnego czopa hemostatycznego, co jest charakterystyczne dla choroby von Willebranda (24). Próbę tę przeprowadza się w ogólnym znieczuleniu. Specjalnym nożykiem nacina się na odpowiednią długość i głębokość błonę śluzową policzka, po czym rejestruje się, po jak długim czasie ustąpi krwawienie. Czas krwawienia ulega wydłużeniu zarówno przy wrodzonej ciężkiej, jak i nabytej postaci choroby von Willebranda oraz jest zmienny przy łagodnej postaci choroby (5). Niektórzy jednak uważają, że bardziej wiarygodne jest określenie kapilarnego czasu krwawienia lub pomiar czasu krzepnięcia metodą Lee-White (17).

Przypuszcza się, że szybkość krwawienia i czas niezbędny do pojawienia się hemostazy mogą być monitorowane *in vivo* za pomocą ultrasonografu i obrazowania wysokoczułą metodą opartą na technice wykorzystującej działanie silnego impulsu akustycznego zogniskowanego w wybranym punkcie (acoustic radiation force impulse – ARFI), a pomiar czasu okluzji (CT) poprzez zastosowanie *in vitro* analizatora funkcji płytek krwi u psów sprawdził się jako szybka metoda przesiewowa dla vWD (24).

Kolejny etap badań ma na celu zdiagnozowanie choroby von Willebranda i rozpoznanie jego wariantu (badania specjalistyczne). Najbardziej powszechnym jest pomiar stężenia antygeny czynnika von Willebranda (vWF: Ag) metodą immunoenzymatyczną (ELISA) lub elektroimmunoenzymatyczną (EIA). Uzyskane wyniki pozwalają na wytypowanie grup ryzyka pod względem prawdopodobieństwa wystąpienia choroby, zależnie od stężenia antygeny vWF, a dostępne testy genetyczne

na postawie określenia ich podłoża genetycznego pozwalają także na wyraźne zdefiniowanie psów chorych, nosicieli choroby, zdrowych, ale i bezobjawowych. U psów z niskim poziomem vWF: Ag (<50%) występuje możliwość przekazania nieprawidłowego genu potomstwu lub ekspresji vW. Zakres od 70 do 180% vWF: Ag uznawany jest za normę, a psy za zdrowe (16, 24). Oznacza się również aktywność koagulatoryczną czynnika VIII (FVIII: C), która jest obniżona przy ciężkich postaciach choroby von Willebranda, a stosunek FVIII/vWF: Ag może być użyteczny w określeniu nosicielstwa choroby. Przeprowadzanymi testami czynnościowymi są: aktywność kofaktora ristocetyny (vWF: RCo), aktywność kofaktora polibrenu (PBCo; 46), ocena funkcji płytek testem wiązania vWF do kolagenu (vWF: CBA) pomocnym przy rozpoznaniu psów z nabytą vWD i wrodzonym typem 2 vWD (16, 18, 24) bądź poprzez zastosowanie analizatora płytek krwi (PFA-100). Innymi metodami są: test oparty na pomiarze agregacji płytek krwi indukowanej ristocetyną (ristocetin induced platelet aggregation – RIPA) oraz immuno- i elektroimmunodufuzja (EID; 39).

Określenie struktury czynnika von Willebranda można uzyskać za pomocą multimerycznej analizy czynnika vWF (47). Obniżenie vWF: CBA występuje u psów o ograniczonej ilości multimerów vWF o dużej masie cząsteczkowej, postaci najbardziej aktywnej hemostatycznie. Wyniki badań wskazują, że u psów istnieje ścisła korelacja między aktywnościami: antygenową (koncentracją vWF), a funkcjonalną wiązania kolagenu. Wartość wskaźnika diagnostycznego pomiędzy vWF: Ag/vWF: CBA może być wykorzystana do odróżnienia typu 2 vWD od typu 1 i 3 vWD (5, 24). Spośród testów laboratoryjnych za szczególnie przydatne do ilościowych i jakościowych pomiarów vWF uznaje się: vWF: CBA oraz PFA-100 w połączeniu z testem ELISA vWF: Ag (48).

W związku z ograniczonymi możliwościami niektórych z wymienionych testów i wpływem wielu czynników na zmienność oraz wahania poziomu vWF (15, 25), a także z faktu pokrywania się wyników testów (koncentracji vWF: Ag; 6, 24) i znikomą wartością prognostyczną pomiaru czasu krwawienia w prognozowaniu statusu vWD i ryzyka krwotoków (49) zaleca się powtórne ich wykonanie, a także użycie nie jednego, a wielu złożonych testów lub zastosowanie bezpośrednich testów DNA na rozpoznanie mutacji dezaktywującej wraz z określeniem jej rodzaju czy lokalizacji u wybranych ras psów (7, 23, 36). Do odnalezienia mutacji stosuje się łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR), która pozwala na skuteczną technikę amplifikacji sekwencji

docelowej. Zostały już opracowane znacznie bardziej specyficzne testy genetyczne pozwalające wykryć zmutowany gen (jedna kopia – heterozygota bądź dwie kopie genu – homozygota). Są one komercyjnie dostępne w laboratoriach należących do: VetGen LLC, Laboklin i Animal Health Trust. Mimo że u niektórych z ras psów wykryto wady genetyczne, nadal brakuje badań, które by ujawniły związek pomiędzy defektem genetycznym i chorobą kliniczną, dlatego nakazuje się jednoczesne sprawdzanie poziomu vWF: Ag (24).

Leczenie i profilaktyka

Standardowe oznaczenie stężenia antygeny czynnika von Willebranda nie umożliwia identyfikacji nosicieli defektu, natomiast przeprowadzenie testów diagnostycznych DNA pozwala na zidentyfikowanie psów chorych (homozygoty pod względem mutacji w genie vWF), nosicieli zmutowanego genu oraz psów zdrowych. W przypadku psów ras doberman i owczarek szetlandzki w badaniu powinno się uwzględnić również analizę wyników testów oznaczenia vWF. Wykluczenie z hodowli chorych psów pozwoli na wyeliminowanie choroby von Willebranda z danej rasy (23).

Postępowanie z chorym zwierzęciem zmierza w kierunku zapobiegania wystąpieniu ewentualnego krwotoku podczas planowanych zabiegów lub tamowania już trwającego krwotoku. Krwawienia z mniejszych ran i po drobnych urazach mogą być kontrolowane lokalnie w miejscu zranienia za pomocą bandaży lub szwów. Innymi przydatnymi procedurami są: elektrokoagulacja, podwiązanie drobnych naczyń, zamykanie nacięć techniką wielowarstwową, zabezpieczenie i kontrolowane uciśnięcie rany przez owinięcie obszaru w jej pobliżu bądź zastosowanie absorbujących gąbek lub specjalnych klejów (2). Leczenie polega przede wszystkim na podwyższeniu stężenia czynnika von Willebranda do poziomu, który zahamuje lub zapobiegnie krwawieniu przez przetoczenie preparatów krwiopochodnych.

Należy unikać stosowania pełnej krwi i stosować ją jedynie przy znacznej niedokrwistości (24). Podaje się przede wszystkim świeże lub świeżo mrożone osocze w dawce 6–12 ml/kg m.c., *i.v.*, co 8–12 godz. w zależności od wskazań lub krioprecypitat w dawce 1 jednostka/10 kg m.c., *i.v.*, co 6–12 godz. w zależności od potrzeby. Krioprecypitat zawiera od 5 do 10 razy więcej czynnika von Willenbranda niż osocze. Jedna jednostka krioprecypitatu odpowiada 200 ml osocza.

U niektórych psów, szczególnie z łagodną postacią Wd., przydatne może być zastosowanie octanu desmopresyny (wazopresyny) w dawce 1 µg/kg. m. c., *s. c.*, który

doprowadza do wyrzutu czynnika von Willebranda z komórek śródbłonna naczyńowego (5). Podwyższenie stężenia vWF jest niewielkie, ale poprawia się hemostaza.

U psów z chorobą von Willebranda cierpiących na niedoczynność tarczycy zastosowanie lewotyroksyny przyczynia się do podniesienia stężenia tego czynnika w osoczu.

Psy z łagodną postacią choroby mogą żyć normalnie, z ograniczeniem zabiegów chirurgicznych oraz sytuacji, przy których istnieje ryzyko zranienia. Natomiast w przypadku zwierząt z ciężką postacią kliniczną choroby von Willebranda z powodu występowania już w młodym wieku licznych krwotoków, stanowiących niejednokrotnie zagrożenie życia, zalecana jest eutanazja.

Wielu autorów żywi nadzieję, że odpowiednia strategia oparta na prowadzeniu badań diagnostycznych i właściwy dobór zwierząt do kojarzeń umożliwi wyeliminowanie choroby, a przez to przyczyni się do poprawy stanu zdrowia psów danej rasy.

Piśmiennictwo

- Ginsburg D., Bowie E. J.: Molecular genetics of von Willebrand disease. *Blood* 1992, **79**, 2507–2519.
- Brooks M.: Management of canine von Willebrand's disease. *Probl. Vet. Med.* 1992, **4**, 636–646.
- Denis C. V., Wagner D. D.: Insights from von Willebrand disease animal models. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 1999, **56**, 977–990.
- De Gopegui R. R., Feldman B. F.: Von Willebrand's disease. *Comp. Haematol. Int.* 1997, **7**, 187–196.
- Latimer K. S.: *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine and Clinical Pathology*. 5th ed., Blackwell Publishing, Ames 2011, 111–112, 115–118, 133.
- Brooks M.: A Review of canine inherited bleeding disorders: biochemical and molecular strategies for disease characterization and carrier detection. *J. Hered.* 1999, **90**, 112–118.
- Venta P. J., Brewer G. J., Yuzbaslyan-Gurkan V., Schall W. D.: DNA encoding canine von Willebrand factor and methods of use. *Unites States Patent* 2004, No. US 6,780,583 B1.
- Venta P. J., Li J., Yuzbaslyan-Gurkan V., Brewer G. J., Schall W. D.: Mutation causing von Willebrand's disease in Scottish terriers. *J. Vet. Intern. Med.* 2000, **14**, 10–19.
- Haberichter S. L., Merricks E. P., Fahs S. A., Christopherson P. A., Nichols T. C., Montgomery R. R.: Re-establishment of VWF-dependent Weibel-Palade bodies in VWD endothelial cells. *Blood* 2005, **105**, 145–152.
- Neiger R.: *Diagnostyka różnicowa w chorobach wewnętrznych psów i kotów*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2011, 106–118.
- Haberichter S. L., Fahs S. A., Montgomery R. R.: von Willebrand factor storage and multimerization: 2 independent intracellular processes. *Blood* 2000, **96**, 1808–1815.
- Conserved domains. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?Seqinput= NP_001002932.1 \(5.11.2012\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?Seqinput= NP_001002932.1 (5.11.2012)).
- McCarroll D. R., Lothrop S. A., Dolan M. C., McDonald T. P.: Canine von Willebrand factor expresses a multimeric composition similar to human von Willebrand factor. *Exp. Hematol.* 1987, **15**, 1060–1067.
- Meyers K. M., Wardrop K. J., Dodds W. J., Brassard J.: Effect of exercise, DDAVP, and epinephrine on the factor VIII: C/von Willebrand factor complex in normal dogs and von Willebrand factor deficient Doberman pinscher dogs. *Thromb. Res.* 1990, **57**, 97–108.
- Moser J., Meyers K. M., Meinkeoth J. H., Brassard J. A.: Temporal variation and factors affecting measurement of canine von Willebrand factor. *Am. J. Vet. Res.* 1996, **57**, 1288–1293.
- Vaden S. L., Knoll J. S., Smith F. W. K., Jr., Tilley L. P.: *Blackwell's five-minute veterinary consult: laboratory tests and diagnostic procedures: Canine & Feline*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa 2009, 716–717.
- Mischke R.: Overview of haemostasis. W: *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. Day M. J., Kohn B. (edit.), 2nd ed., British Small Animal Veterinary Association 2012, 182–183.
- Gentry P., Burgess H., Wood D.: Hemostasis. W: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th ed. Kaneko J. J., Harvey J. W., Bruss M. L. (edit.) San Diego, Academic Press 2008, 287–330.
- Sanders Jr. W. E., Reddick R. L., Nichols T. C., Brinkhous K. M., Read M. S.: Thrombotic thrombocytopenia induced in dogs and pigs. The role of plasma and platelet vWF in animal models of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995, **15**, 793–800.
- Nichols T. C., Bellinger D. A., Reddick R. L., Smith S. V., Koch G. G., Davis K., Sigman J., Brinkhous K. M., Griggs T. R., Read M. S.: The roles of von Willebrand factor and factor VIII in arterial thrombosis: studies in canine von Willebrand disease and hemophilia A. *Blood* 1993, **81**, 2644–2651.
- Johnson G. S., Turrentine M. A., Kraus K. H.: Canine von Willebrand's disease. A heterogeneous group of bleeding disorders. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1988, **18**, 195–229 (abstr.).
- Müller E.: Choroby dziedziczne u psów i kotów. *Weterynaria w praktyce* 2006, 58–59. [http://www.laboklin.pl/pdf/de/fachbeitraege_online/choroby_dziedziczne_u_psov_i_kotow_2006.pdf \(25.10.2012\)](http://www.laboklin.pl/pdf/de/fachbeitraege_online/choroby_dziedziczne_u_psov_i_kotow_2006.pdf (25.10.2012)).
- Ackerman L.: Hemolympathic disorders, W: *Genetic Connection: A Guide to Health Problems in Purebred Dogs*, 2nd ed., American Animal Hospital Association, Lakewood 2011, 94.
- Stokol T.: Von Willebrand's disease, W: *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. Day M. J., Kohn B. (edit.) 2nd ed. British Small Animal Veterinary Association 2012, 246–251.
- Brooks M. B., Erb H. N., Fourman P. A., Ray K.: von Willebrand disease phenotype and von Willebrand factor marker genotype in Doberman Pinschers. *Am. J. Vet. Res.* 2001, **62**, 364–369.
- Brooks M., Dodds W. J., Raymond S. L.: Epidemiologic features of von Willebrand's disease in Doberman pinschers, Scottish terriers, and Shetland sheepdogs: 260 cases (1984–1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1992, **200**, 1123–1127 (Abstr.).
- Wessely-Szponder J., Szponder T.: Wstępne badania nad występowaniem choroby von Willebranda u psów w Polsce. *Życie Wet.* 2001, **76**, 26–28.
- Arnold S., Müller A., Binder H., Meyers K., Giger U.: Von Willebrand factor concentrations in blood plasma of Bernese mountain dogs. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 1997, **139**, 177–182.
- Kramer J. W., Venta P. J., Klein S. R., Cao Y., Schall W. D., Yuzbaslyan-Gurkan V.: A von Willebrand's factor genomic nucleotide variant and polymerase chain reaction diagnostic test associated with inheritable type-2 von Willebrand's disease in a line of German shorthaired pointer dogs. *Vet. Pathol.* 2004, **41**, 221–228.
- Gavazza A., Prescittini S., Keuper H., Lubas G.: Estimated prevalence of canine Type 2 Von Willebrand disease in the Deutsch-Drahthaar (German Wirehaired Pointer) in Europe. *Res. Vet. Sci.* 2012, **93**, 1462–1466.
- Johnstone I. B., Norris A. M., Hirzer L.: Type III von Willebrand's disease in Scottish terriers: A report of two cases. *Can. Vet. J.* 1993, **34**, 679–681.
- Stokol T., Parry B. W., Mansell P. D.: von Willebrand's disease in Scottish Terriers in Australia. *Aust. Vet. J.* 1995, **72**, 404–407.
- Pathak E. J.: Type 3 von Willebrand's disease in a Shetland sheepdog. *Can. Vet. J.* 2004, **45**, 685–687.
- Johnson G. S., Lees G. E., Benson R. E., Rosborough T. K., Dodds W. J.: A bleeding disease (von Willebrand's disease) in a Chesapeake Bay Retriever. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1980, **176**, 1261–1263.
- Slappendel R. J., Beijer E. G. M., Van Leeuwen M.: Type III von Willebrand's disease in Dutch kooiker dogs. *Vet. Q.* 1998, **20**, 93–97.
- Van Oost B. A., Versteeg S. A., Slappendel R. J.: DNA Testing for Type III von Willebrand Disease in Dutch Kooiker Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 2004, **18**, 282–288.
- Slappendel R. J.: Von Willebrand's disease in dutch kooiker dogs. *Vet. Q.* 1995, **17**, sup1, S21–S22.
- Heseltine J. C., Panciera D. L., Troy G. C., Monroe W. E., Brooks M. B., Feldman B. E.: Effect of Levothyroxine Administration on Hemostatic Analytes in Doberman Pinschers with von Willebrand Disease. *J. Vet. Intern. Med.* 2005, **19**, 523–527.
- Dodds W. J.: Further studies of canine von Willebrand's disease. *Blood* 1975, **45**, 221–230.
- Applewhite A. A., Wilkens B. E., McDonald D. E., Radasch R. M., Barstad R. D.: Potential central nervous system complications of von Willebrand's disease. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1999, **35**, 423–429.
- Dunn K. J., Nicholls P. K., Dunn J. K., Herrtage M. E.: Intracranial haemorrhage in a dobermann puppy with von Willebrand's disease. *Vet. Rec.* 1995, **136**, 635–636.
- Schrey C. F.: *Diagnostyka różnicowa psów i kotów*. Med-Pharm Polska, Wrocław 2011, 406–410.
- Kirby R.: *Small Animal Emergency & Critical Care Medicine*. Manson Publishing, London 1998, 11–12.
- Willard M. D., Tvedten H., Turnwald G. H.: *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. W. B. Saunders Company, Philadelphia 1989, 97–98.
- Dodds W. J.: Animal models for the evolution of thrombotic disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1987, **516**, 631–635.
- Rosborough T. K., Johnson G. S., Benson R. E., Swaim W. R., Dodds W. J.: Measurement of canine von Willebrand factor using ristocetin and polybrene. Diagnosis of canine von Willebrand's disease. *J. Lab. Clin. Med.* 1980, **96**, 47–56.
- Johnstone I. B.: Multimeric analysis of von Willebrand factor in animal plasmas using sodium dodecyl sulfate agarose gel electrophoresis, semidry electrotransfer, and immunoperoxidase detection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1997, **9**, 314–317.
- Burgess H. J., Woods J. P., Abrams-Ogg A. C. G., Wood R. D.: Evaluation of laboratory methods to improve characterization of dogs with von Willebrand disease. *Can. J. Vet. Res.* 2009, **73**, 252–259.
- Burgess H. J., Woods J. P., Abrams-Ogg A. C. G., Wood R. D.: Use of a questionnaire to predict von Willebrand disease status and characterize hemorrhagic signs in a population of dogs and evaluation of a diagnostic profile to predict risk of bleeding. *Can. J. Vet. Res.* 2009, **73**, 241–251.
- Johnstone I. B., Crane S.: The effects of desmopressin on plasma factor VIII/von Willebrand factor activity in dogs with von Willebrand's disease. *Can. J. Vet. Res.* 1987, **51**, 189–193.

Dr Joanna Gruszczynska,
e-mail: joanna_gruszczynska@sggw.pl