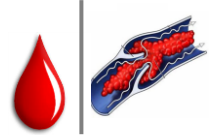




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΤΤΙΣΕΩΝ

## Διπλωματική Εργασία

«Μελέτη επιπέδων ADAMTS-13, vWF propeptide, vWF multimers σε ασθενείς με TTP»

**ΟΝΟΜΑ** : Παπαχρόνης Ανδρέας

**Αριθμός Μητρώου**: 2016/0661

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ** : Γιαλεράκη Αργυρή, Βιοχημικός

Αναπλ. Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Α) ΓΙΑΛΕΡΑΚΗ ΑΡΓΥΡΗ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Β) ΤΡΑΥΛΟΥ ΩΡΑΙΑΝΘΗ, Ομότιμη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, Αιματολόγος - Παθολόγος

Γ) ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Καθηγητής Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

*Αφιερωμένη στην οικογένειά μου  
και ειδικά στην κορούλα μου*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η συγγραφή μίας ερευνητικής διπλωματικής εργασίας αποτελεί μια σκληρή, αλλά παράλληλα και μια εποικοδομητική εμπειρία. Φτάνοντας στο τέλος αυτής της συναρπαστικής διαδρομής, συνειδητοποίησα ότι αποτέλεσε καρπό προσωπικής προσπάθειας, αλλά συγχρόνως συνδρομής και υποστήριξης πολλών ανθρώπων, στους οποίους θέλω να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη.

Οι αρχικές μου ευχαριστίες απευθύνονται στην επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου, κα. Αργυρή Γιαλεράκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ. Οι γνώσεις της πάνω στο αντικείμενο της εργασίας, η εμπειρία της, οι πολύτιμες συμβουλές και η υπομονή της, όχι μόνο συνέβαλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση της έρευνας, άλλα άλλαξαν και διαφώτισαν τον τρόπο σκέψης μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Μονάδας Αφαίρεσης στο ΓΝΑ «Λαϊκό», τον αείμνηστο Κωνσταντίνο Μαρκάκη, τον πρωτοπόρο στις πλασμαφαιρέσεις στην Ελλάδα και δημιουργό της βάσης δεδομένων των ασθενών με ΘΘΠ στο ΓΝΑ «Λαϊκό» και τους συνεχιστές του μοναδικού του έργου, κα. Γεωργία Κανελλοπούλου, Αιματολόγο, Διευθύντρια ΕΣΥ, κ. Θεοφάνη Αδρακτά, Παθολόγο, Διευθυντή ΕΣΥ και την κα. Αλίκη Μαρινάκη, Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων. Χωρίς τη βοήθειά τους, την παροχή πολύτιμων πληροφοριών, αλλά και την καθοδήγησή τους δε θα ήταν δυνατή η επιτυχημένη ολοκλήρωση της εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στην κα. Ιωάννα Αναστασοπούλου, Βιολόγο στο Εργαστήριο Αιμόστασης του ΓΝΑ «Λαϊκό», για την ευγενική παραχώρηση δεδομένων ετών, αλλά και την καθοδήγηση, τις συμβουλές και την υπομονή κατά την τέλεση πειραμάτων για τη δραστικότητα της ADAMTS-13 και του ανασταλτή της.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κα. Παρασκευή Κώτση, Αιματολόγο, Διευθύντρια ΕΣΥ, υπεύθυνη Εργαστηρίου Αιμόστασης στο ΓΝΑ «Λαϊκό», για τη συμβολή της στον εμπλουτισμό της εργασίας. Οι συμβουλές της και η μετάδοση των γνώσεών της ήταν οδηγός για πρωτοποριακές διαδρομές ιδεών, στην υλοποίηση των οποίων συνέβαλαν ο κ. Παναγιώτης Παναγιωτίδης, Καθηγητής Αιματολογίας στην Ιατρική Σχολή του ΕΚΠΑ, με

την ευγενική χορήγηση kit για την ανίχνευση επιπέδων sIL-2Ra και η κα. Αγορίτσα Βαρακλιώτη, Βιολόγος στο Εργαστήριο Ανοσοαιματολογίας στο ΓΝΑ «Λαϊκό», για την πολύτιμη βοήθειά της στην πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διευθύντρια του Κέντρου Αιμοδοσίας και Αναφοράς Αιμορραγικών Διαθέσεων του ΓΝΑ «Λαϊκό» κα. Όλγα Κατσαρού που μου έδωσε τη δυνατότητα εκπόνησης της εργασίας στα Εργαστήρια της Αιμοδοσίας και την Ομότιμη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ κα. Ωραιάνθη Τραυλού, η οποία ως υπεύθυνη του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Θρόμβωση Αιμορραγία Ιατρική των Μεταγγίσεων», μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στο πρόγραμμα.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους ίδιους τους ασθενείς που πήραν μέρος στην έρευνα για την παραχώρηση πολύτιμων πληροφοριών, αλλά και τους συναδέλφους μου, ειδικά τη Σοφία και τη Μαρίνα, που με υποστήριξαν και με βοήθησαν καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Το πιο θερμό «ευχαριστώ» ανήκει στην οικογένειά μου που με στήριξε ηθικά και ψυχολογικά σε όλη αυτή τη δύσκολη διαδρομή. Αποτελέσε πηγή έμπνευσης και αστείρευτης ενέργειας, συμβάλλοντας στην επιτυχημένη ολοκλήρωση της εργασίας.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ:** Η θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (ΘΘΠ) αποτελεί σύνδρομο που ανήκει στις θρομβωτικές μικροαγγειοπάθειες. Χαρακτηρίζεται κυρίως από θρομβοπενία, μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία και παρουσία σχιστοκυττάρων συνέπεια σχηματισμού θρόμβων στην μικροκυκλοφορία. Άλλα συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν πυρετό, νεφρική ανεπάρκεια και νευρολογικές εκδηλώσεις. Υποκείμενος μηχανισμός είναι η παρουσία αντισωμάτων έναντι της ADAMTS-13, μίας πρωτεάσης που διασπά τα μεγάλα πολυμερή vWF σε μικρότερες μονάδες. Το σύνδρομο Upshaw-Schulman, αποτελεί τη συγγενή μορφή της νόσου. Η αντιμετώπιση του συνδρόμου περιλαμβάνει πλασμαφαίρεσεις και ανοσοκατασταλτικά, όπως τα κορτικοειδή και η ριτουξιμάμπη.

**ΣΚΟΠΟΣ:** Σκοπός της εργασίας είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση των δεδομένων που αφορούν στην επιδημιολογία, παθοφυσιολογική βάση, εργαστηριακό έλεγχο και αντιμετώπιση της ΘΘΠ. Επίσης, η εκτίμηση των αποτελεσμάτων από τη μέτρηση της δραστηριότητας της ADAMTS-13, του ανασταλτή της και των επιπέδων του διαλυτού υποδοχέα της IL-2, σε οξεία φάση της νόσου και στην περίοδο ύφεσης. Τέλος, η εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων όσον αφορά την πορεία της νόσου και την πιθανότητα υποτροπής συνεκτιμώντας και άλλα χαρακτηριστικά (όπως η αιμοσφαιρίνη, ο αριθμός των αιμοπεταλίων και η LDH) και η επιβεβαίωση ή απόρριψη ανάλογων δεδομένων της διεθνούς βιβλιογραφίας.

**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:** Αξιολογήθηκαν τα δημογραφικά χαρακτηριστικά 64 ασθενών με ΘΘΠ που παρακολουθούνται στη Μονάδα Αφαιρέσεων «Κ. Μαρκάκης» στο ΓΝΑ «Λαϊκό», από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 μέχρι σήμερα. Έγινε συλλογή και επεξεργασία επιδημιολογικών δεδομένων και εργαστηριακών εξετάσεων των ανωτέρω ασθενών με σκοπό την συστηματική καταγραφή και τη δημιουργία βάσης δεδομένων. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν η δραστηριότητα της ADAMTS-13 και του ανασταλτή της σε 56 ασθενείς, στην οξεία φάση του συνδρόμου και στην ύφεση. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού [fluorescence resonance energy transfer (FRET)] και η ποσοτική ανοσοενζυμική τεχνική ανίχνευσης ανθρώπινων αυτοαντισωμάτων (IgG) έναντι της ADAMTS-13, αντίστοιχα. Τέλος, σε 11 ασθενείς, και στην οξεία φάση και στην ύφεση, μετρήθηκαν τα επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα IL-2 με ποσοτική τεχνική

ανοσοπροσδιορισμού τύπου σάντουιτς. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα εργαστήρια της αιμοδοσίας του ΓΝΑ «Λαϊκό».

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Οι 56 ασθενείς με ΘΘΠ χωρίστηκαν σε 2 ομάδες, οι 35 που εμφανίζουν υποτροπιάζουσα ΘΘΠ (ομάδα Α) και οι 21 χωρίς υποτροπές (ομάδα Β). Στην οξεία φάση της πρώτης ομάδας οι 29 είχαν δραστικότητα ADAMTS-13 <15% (οι 18/25, <5%). Στους υπόλοιπους 5 ασθενείς η δραστικότητα του ενζύμου ήταν 15%-30%. Θετικό ανασταλτή έναντι της ADAMTS-13 (>15 U/mL) είχαν οι 29 από τους 35 ασθενείς. Σε 3 ασθενείς οι τιμές του ήταν στη γκριζα ζώνη (12-15 U/mL), ενώ 2 ασθενείς, είχαν αρνητικό ανασταλτή (<12U/mL). Στην ύφεση, οι 30, παρουσίασαν δραστικότητα ADAMTS-13 >30% (οι 23/30, >65%). Στους υπόλοιπους 5 ασθενείς η δραστικότητα του ενζύμου ήταν 15%-30%. Αρνητικό ανασταλτή έναντι της ADAMTS-13 (<12 U/mL) είχαν οι 22 από τους 35 ασθενείς. Σε 2 ασθενείς οι τιμές του ήταν στη γκριζα ζώνη (12-15 U/mL), ενώ 11 ασθενείς είχαν θετικό ανασταλτή (>15U/mL). Στην οξεία φάση της δεύτερης ομάδας (N=21), οι 18 είχαν δραστικότητα ADAMTS-13 <15% (οι 15/18 <5%). Από τους υπόλοιπους 3 ασθενείς, σε 1 ασθενή ήταν 15%-30%, ενώ σε 2 ήταν 30%-65% (δεν υπάρχουν δεδομένα για 1 ασθενή στην οξεία φάση). Θετικό ανασταλτή έναντι της ADAMTS-13 (>15 U/mL) είχαν οι 18 από τους 21 ασθενείς. Σε 1 ασθενή η τιμή του ήταν στη γκριζα ζώνη (12-15 U/mL), ενώ 2 ασθενείς, αμφότεροι με ADAMTS-13 <5%, είχαν αρνητικό ανασταλτή (<12U/mL). Στην ύφεση, αντίστοιχα, οι 20 είχαν δραστικότητα ADAMTS-13 >30% (οι 14, >65%). Ένας μόνο ασθενής είχε δραστικότητα ενζύμου 15%-30%. Αρνητικό ανασταλτή έναντι της ADAMTS-13 (<12 U/mL) είχαν τα 2/3 των ασθενών (N=14). Δύο ασθενείς είχαν τιμές ανασταλτή στη γκριζα ζώνη (12-15 U/mL), ενώ 5 ασθενείς είχαν θετικό ανασταλτή (>15U/mL). Και οι 5 αυτοί ασθενείς είχαν δραστικότητα ADAMTS-13 30%-65%. Ελέγχθηκαν τα επίπεδα sIL-2Ra σε 11 ασθενείς τόσο στην οξεία φάση όσο και σε ύφεση. Οι 6 είχαν υψηλότερα επίπεδα στην οξεία φάση, ενώ οι 5 στην ύφεση. Όλοι οι ασθενείς είχαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με την ομάδα control. Προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.024 και p=0.059, αντίστοιχα) όταν συγκρίθηκαν οι τιμές sIL-r των ασθενών με ΘΘΠ με την ομάδα control. Στη σύγκριση των τιμών των ίδιων ασθενών στην οξεία φάση και την ύφεση, αντίστοιχα, δεν παρατήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (p>0.5)

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων της δραστικότητας της ADAMTS-13 και του ανασταλτή της,

συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με τη διεθνή βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία στην οξεία φάση της ΘΘΠ, στη μεγάλη πλειονότητα των ασθενών, η δραστικότητα της ADAMTS-13 βρίσκεται <10%, ενώ αντιστρόφως, υπάρχει ισχυρή παρουσία του ανασταλτή της. Αντίστοιχα, την ύφεση, η δραστικότητα της ADAMTS-13 είναι >65%, ενώ (στην πλειονότητα των ασθενών) δεν ανιχνεύονται αντι-ADAMTS-13 αντισώματα.[1] Η δημιουργία ενός ατομικού προφίλ για τις ανωτέρω παραμέτρους, καθώς και η μελέτη των πολυμερών του vWF θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση του συνδρόμου, τη βελτιστοποίηση της πρόγνωσης και τη χάραξη εξατομικευμένης θεραπευτικής στρατηγικής. Όσον αφορά τον sIL-2Ra, η περαιτέρω ανάλυση δεδομένων σε μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών, ίσως αποτελέσει ένα επιπλέον εργαλείο για την καλύτερη αντιμετώπιση της ΘΘΠ.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Θρομβωτική Θρομβοπενική Πορφύρα, ADAMTS-13, ανασταλτής ADAMTS-13, πολυμερή vWF, προπεπτίδιο vWF, οροδιαλυτός υποδοχέας IL-2



## **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a blood disorder included in the thrombotic microangiopathies (TMAs). Its main characteristics are thrombocytopenia, microangiopathic hemolytic anemia and presence of schistocytes due to blood clots forming in small blood vessels. Other symptoms may include fever, renal impairment and neurological disorders. The underlying mechanism involves antibodies against ADAMTS-13, an enzyme that cleavages large multimers of vWF into smaller units. Upshaw–Schulman syndrome is the inherited form of TTP. Plasma exchange and immunosuppressants, such as corticosteroids and rituximab are used in treatment of the syndrome.

**AIM:** The aim of this study is the bibliographic review of the data regarding epidemiology, pathophysiological basis, laboratory testing and treatment of TTP. Also, the assessment of the effects of measuring the activity of ADAMTS-13, its inhibitor and soluble IL-2 receptor levels, both in the acute phase of the disease and in remission. Finally, to draw useful conclusions about the course of the disease and the likelihood of recurrence taking into account other characteristics (such as hemoglobin, platelet count and LDH) and the confirmation or rejection of similar data in the international literature.

**MATERIALS AND METHODS:** Evaluation of the demographic characteristics of 64 patients with TTP monitored from the mid-1980s to the present at the "K. Markakis" Apheresis Unit of "Laiko" General Hospital, Athens. The collection and processing of epidemiological data and laboratory tests of the above patients were carried out in order to systematically record and create a registry. In addition, the activity of ADAMTS-13 and its inhibitor in 56 patients, both in the acute phase of the syndrome and remission were measured. The methods used were the fluorescence resonance energy transfer (FRET) and the quantitative immunoenzymatic human autoantibody (IgG) detection assay against ADAMTS-13, respectively. Finally, in 11 patients, both in acute phase and remission, the levels of soluble IL-2 receptor were measured by a quantitative sandwich immunoassay technique. All measurements were carried out in the blood donation laboratories of the "Laiko" General Hospital, Athens

**RESULTS:** 56 patients were divided into 2 groups, 35 patients with relapsing TTP (group A) and 21 with no recurrences (group B). In the acute phase of the first group 29 had ADAMTS-13 activity <15% (18/25, <5%) and 5 patients 15% -30% (no data for 1 patient in acute phase). A positive inhibitor against ADAMTS-13 (>15 U/mL) was found in 29 out of 35 patients in 3 patients the values were in the gray zone (12-15 U/mL), while 2 patients had a negative inhibitor (<12U/mL). In the remission, 30 had ADAMTS-13 activity >30% (23/30,>65%). In the remaining 5 patients the activity of the enzyme was 15%-30%. Negative inhibitor against ADAMTS-13 (<12 U/mL) was in 22 out of 35 patients. In 2 patients, the values were in the gray zone (12-15 U/mL), while 11 patients had a positive inhibitor (>15U/mL). In the acute phase of the second group (N=21), 18 had ADAMTS-13 activity <15% (15/18 <5%), in 1 patient 15% -30%, and in 2 30% -65%. Positive ADAMTS-13 inhibitor (>15 U/mL) had 18 out of 21 patients. In 1 patient the value was in the gray zone (12-15 U/mL), while 2 patients, both with ADAMTS-13 <5%, had a negative inhibitor (<12U/mL). In the remission, respectively, 20 had ADAMTS-13 activity >30% (14/20 >65%). Only 1 patient had an enzyme activity between 15%-30%. Negative ADAMTS-13 inhibitors (<12 U/mL) had 2/3 of the patients (N=14). 2 patients had inhibitory values in the gray zone (12-15 U/mL), while 5 patients had a positive inhibitor (>15U/mL). All 5 of these patients had ADAMTS-13 activity of 30% -65%. sIL-2Ra levels were measured in 11 TTP patients in both acute phase and remission. The 6 had higher levels in the acute phase, while 5 in the remission. All patients had higher values than the control group. There was a statistically significant difference ( $p = 0.024$  and  $p = 0.059$ , respectively) comparing sIL-r levels of TTP patients versus the control group. Acute phase levels versus remission levels, showed no statistically significant difference ( $p>0.5$ )

**CONCLUSIONS:** The results obtained from the analysis of the experimental data on the activity of ADAMTS-13 and its inhibitor are broadly consistent with the international literature, according to which in the acute phase of TTP, in the vast majority of patients, the activity of ADAMTS-13 is <10%, while there is a strong presence of its inhibitor. In remission, ADAMTS-13 activity is >65%, while (in the majority of patients) anti-ADAMTS-13 antibodies are not detected, respectively.[1] Creating an individual profile for the above parameters as well as studying vWF polymers will help to better understand the syndrome, optimize prognosis, and develop a personalized therapeutic strategy. Regarding sIL-2Ra

levels, further data analysis at larger group of patients may be an additional tool for better treatment of TTP.

**KEYWORDS:** Thrombotic Thrombocytopenic Purpura, ADAMTS-13, ADAMTS-13 inhibitor, vWF multimers, vWF propeptide, soluble IL-2R

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	<b>iii</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>1</b>
1.1 Εισαγωγή στη Θρομβωτική Θρομβοπενική Πορφύρα	2
1.2 Ιστορικά ορόσημα για την κατανόηση της ΘΘΠ	3
1.3 Ορισμός και παθοφυσιολογία	4
1.4 Διάγνωση	8
1.4.1 Κλινικά ευρήματα της ΘΘΠ	8
1.4.2 Διαφορική διάγνωση ΘΘΠ	11
1.5 Εργαστηριακή διερεύνηση της ΘΘΠ	13
1.5.1 Ρουτίνα	13
1.5.2 Διερεύνηση της ADAMTS-13	15
1.5.3 Λειτουργικές δοκιμασίες της ADAMTS-13	15
1.5.4 Ανοσοχημικές μέθοδοι	16
1.6. ΘΘΠ και κύηση	18
1.7 Ιδιοπαθής ΘΘΠ και δευτεροπαθής (σχετιζόμενη με άλλο αυτοάνοσο νόσημα) ΘΘΠ	19
1.8 ΘΘΠ σχετιζόμενη με HIV λοίμωξη	20
1.9 ΘΘΠ σχετιζόμενη με καρκίνο και μεταμόσχευση	20
1.11 Πρόγνωση και παρακολούθηση	22
1.12 Θεραπεία	23
1.12.1 Θεραπεία πρώτης γραμμής	23
1.12.1.1 Θεραπεία με πλάσμα	23
1.12.1.2 Κορτικοστεροειδή	26
1.12.1.3 Rituximab	26
1.12.1.4 Εναλλακτικά ανοσοκατασταλτικά	29
1.12.2 Σπληνεκτομή	30
1.12.3 Αντισταμοπεταλιακοί παράγοντες	31
1.12.4 Καινοτόμα φάρμακα	31
1.12.5 Αντιμετώπιση της ΘΘΠ κύησης	33
1.12.6 Αντιμετώπιση της ΘΘΠ σχετιζόμενη με HIV λοίμωξη	35
1.12.7 Αντιμετώπιση της ΘΘΠ σχετιζόμενη με καρκίνο και μεταμόσχευση	35

<b>1.13. Διαχείριση ανθεκτικών μορφών ΘΘΠ</b>	<b>36</b>
<b>1.14 Πρόληψη υποτροπών</b>	<b>37</b>
<b>2. ΤΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΤΟΥ VWF (VWF MULTIMERS)</b>	<b>40</b>
2.1 Βιολογία του παράγοντα von Willerbrand: σύνθεση και κατανομή του μεγέθους των πολυμερών	42
2.2 Φυσιολογία των πολυμερών υψηλού μοριακού βάρους του vWF: ο ρόλος στην αιμόσταση και η σημασία του μεγέθους των πολυμερών	46
2.3 Τα πολυμερή vWF στη ΘΘΠ	48
<b>3. ΠΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VON WILLEBRAND (vWF-PP)</b>	<b>51</b>
3.1 Ιστορική προοπτική: ταυτοποίηση του προπεπτιδίου του παράγοντα vonWillebrand (vWFpp)	51
3.2 Χρόνος ζωής του vWF και του vWFpp	52
3.3 Ο ρόλος του vWFpp στον πολυμερισμό του vWF	54
3.4 Δοκιμασία του vWFpp στο πλάσμα: κλινική χρησιμότητα	55
<b>4. Η ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-2 (IL-2) ΚΑΙ Ο ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ IL-2</b>	<b>58</b>
4.1 Υποδοχέας IL-2 – διαλυτή μορφή της α υπομονάδας (sIL-2Ra)	61
4.2 Αυξημένα επίπεδα sIL-2Ra σε μη κακοήθη νοσήματα	62
4.3 sIL-2Ra και ΘΘΠ	63
<b>5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>65</b>
<b>5.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ</b>	<b>66</b>
<b>5.2 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ADAMTS-13</b>	<b>75</b>
<b>5.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ADAMTS-13</b>	<b>78</b>
<b>5.4 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ sIL-2Ra</b>	<b>82</b>
<b>6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>86</b>
6.1 Λειτουργικότητα ADAMTS-13 και τιμές ανασταλτή ADAMTS-13	86
6.2 Επίπεδα sIL-2Ra σε ασθενείς με ΘΘΠ	92
<b>7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>95</b>
<b>8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>103</b>
<b>9. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b>	<b>103</b>
<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>104</b>

# **1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

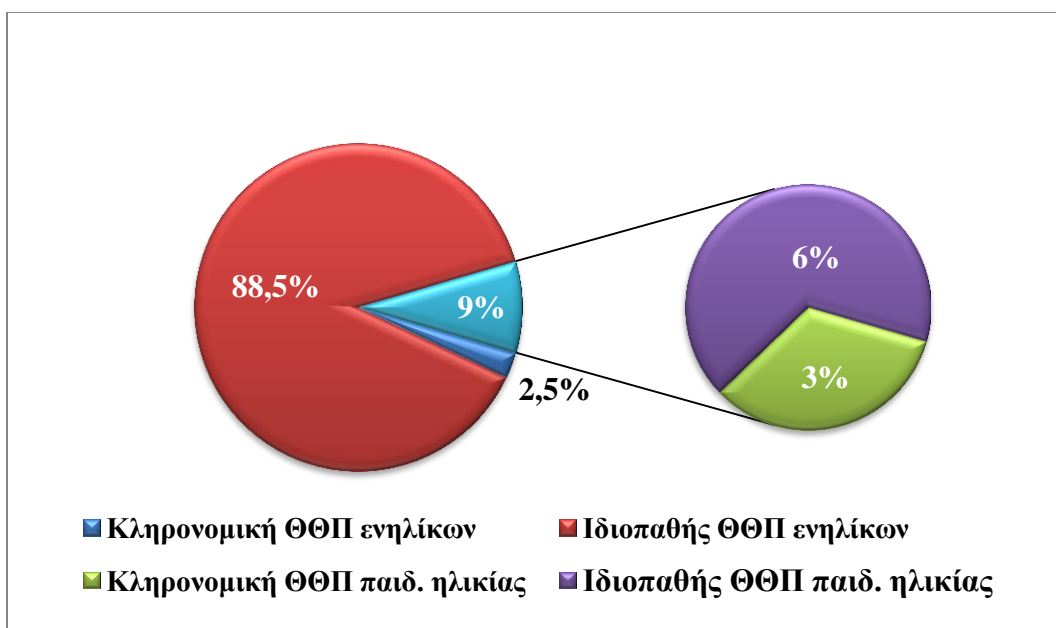
## **1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΘΡΟΜΒΩΤΙΚΗ ΘΡΟΜΒΟΠΕΝΙΚΗ ΠΟΡΦΥΡΑ**

Η Θρομβωτική Θρομβοπενική Πορφύρα (ΘΘΠ) είναι γνωστή σχεδόν έναν αιώνα. [2] Ανήκει στην ομάδα συνδρόμων Θρομβωτικής ΜικροΑγγειοπάθειας (ΘΜΑ) που χαρακτηρίζονται από:

- Μικροαγγειακή θρόμβωση με συστηματική συσσώρευση αιμοπεταλίων
- Θρομβοπενία
- Ενδαγγειακή αιμόλυση από μηχανικό κατακερματισμό ερυθροκυττάρων (σχιστοκύτταρα κατά τη διέλευσή από μερικώς αποφραγμένα αρτηρίδια & τριχοειδή)
- Ιστική ισχαιμία (υψηλή LDH) με προσβολή πολλών οργάνων [3]

Η ΘΘΠ αποτελεί μια σπάνια αιματολογική νόσο, με ετήσια συχνότητα δέκα (10) περιστατικών ανά εκατομμύριο κατοίκους και 1 πρωτοδιάγνωση ετησίως ανά εκατομμύριο κατοίκους.[4, 5] Το πρώτο οξύ επεισόδιο ΘΘΠ συμβαίνει συνήθως κατά την ενηλικίωση (90% όλων των περιστατικών), ωστόσο υπάρχει και ένα μικρό ποσοστό (10%) το οποίο εκδηλώνεται στην παιδική ηλικία ή κατά την εφηβεία (εικόνα 1). [6-14] Η ΘΘΠ προκαλείται κυρίως από έναν αυτοάνοσο μηχανισμό, αν και έχουν περιγραφεί και σπάνιες κληρονομικές μορφές της νόσου (Upshaw-Schulman syndrome [USS], εικόνα 1). Η ΘΘΠ παρουσιάζει διπλάσια συχνότητα εμφάνισης στις γυναίκες απ' ότι στους άνδρες και η κλινική της πορεία χαρακτηρίζεται από την τάση για υποτροπές. Θεωρείται απειλητική για τη ζωή νόσος, με το ποσοστό θνητότητας να πλησιάζει το 10%-20%, παρά τη σωστή θεραπευτική προσέγγιση.[15]

Τα τελευταία 20 χρόνια σημαδεύτηκαν από τη σύνδεσή της με ένα ένζυμο, την ADAMTS-13 (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 repeats, member 13).[16] Έχει γίνει μεγάλη πρόοδος για την καλύτερη κατανόηση αυτής της δυνητικά θανατηφόρου νόσου (λόγω του εκτεταμένου σχηματισμού θρόμβων στην μικροκυκλοφορία), χάρη στην καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της, αλλά και στην καταγραφή και αρχειοθέτηση περιστατικών ΘΘΠ παγκοσμίως. Αυτό οδήγησε σε σημαντική πρόοδο στη διάγνωση και τη θεραπευτική προσέγγιση περιστατικών.[6, 8-12, 17, 18]



**Εικόνα 1.** Η εμφάνιση της ΘΘΠ σε σχέση με την ηλικία εκδήλωσης και τον μηχανισμό διαταραχής της ADAMTS-13. Τα ποσοστά ΘΘΠ παιδικής ηλικίας/ενηλίκων και επίκτητης /κληρονομικής αντίστοιχα, έχουν υπολογιστεί με βάση τα δεδομένα του Αρχείου ΘΘΠ της Γαλλίας (840 ασθενείς).[12, 14] Υπάρχει ταύτιση αυτών των αποτελεσμάτων με διάφορα δημογραφικά δεδομένα που έχουν αναφερθεί και από άλλες ομάδες μελετητών.[6, 8-11, 18] Το διάγραμμα απεικονίζει 100 ασθενείς με ΘΘΠ, όπου το 91% πρωτοδιαγνώστηκε μετά τα 18 έτη, ενώ μόλις το 9% στην παιδική ηλικία. Αντίστοιχα, η επίκτητη ΘΘΠ αγγίζει το 94,5% των ασθενών σε αντίθεση με το 5,5% που είναι κληρονομικής αιτιολογίας (USS). Το ποσοστό εμφάνισης USS στους ενήλικες είναι μόλις 2,5%, ενώ στα παιδιά φτάνει το 33%.

## **1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΘΘΠ**

Η πρώτη κλινική περιγραφή της ΘΘΠ έγινε το 1924 από τον Eli Moschcowitz σε ένα 16χρονο κορίτσι το οποίο τελικά κατέληξε από θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια. Η εικόνα της ασθενούς περιελάμβανε αδυναμία, πυρετό, παροδικές εστιακές νευρολογικές εκδηλώσεις, βαριά θρομβοπενία και μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία λόγω της παρουσίας θρόμβων στη μικροκυκλοφορία.[2] Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1980, η αιτιολογία της ΘΘΠ παρέμενε άγνωστη. Η έλλειψη ειδικής θεραπείας είχε σαν αποτέλεσμα περίπου το 90% των περιστατικών να είναι θανατηφόρα.

Μόλις το 1982 άρχισε να ερευνάται ο ρόλος του παράγοντα vonWillebrand (vWF), μιας πολυμερούς γλυκοπρωτεΐνης, απαραίτητης για τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων υπό την πίεση της ροής του αίματος. Το γεγονός που οδήγησε την έρευνα στην κατεύθυνση αυτή, είναι ότι βρέθηκαν στους ασθενείς με ΘΘΠ μεγαλομόρια vWF με μεγάλη προσκολλητική



ικανότητα στα αιμοπετάλια.[19]

Το 1985, βρέθηκε σε ιστολογικά παρασκευάσματα ασθενούς, ο οποίος κατέληξε από ΘΘΠ, μεγάλος αριθμός πολυμερών του vWF (σε σχέση με το ινωδογόνο) σε σπλαχνικούς αιμοπεταλιακούς θρόμβους.[20] Η θεραπευτική πλασμαφαίρεση, που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1970[21-24] και από τη δεκαετία του 1990 αποτελεί θεραπεία εκλογής [21, 23, 24], βελτίωσε θεαματικά τα ποσοστά επιβίωσης, φτάνοντας ακόμα και το 85%[25], πράγμα που οδήγησε στην υπόθεση ότι υπάρχει έλλειψη κάποιας πρωτεΐνης του πλάσματος, η οποία ρυθμίζει το μέγεθος των πολυμερών του vWF.

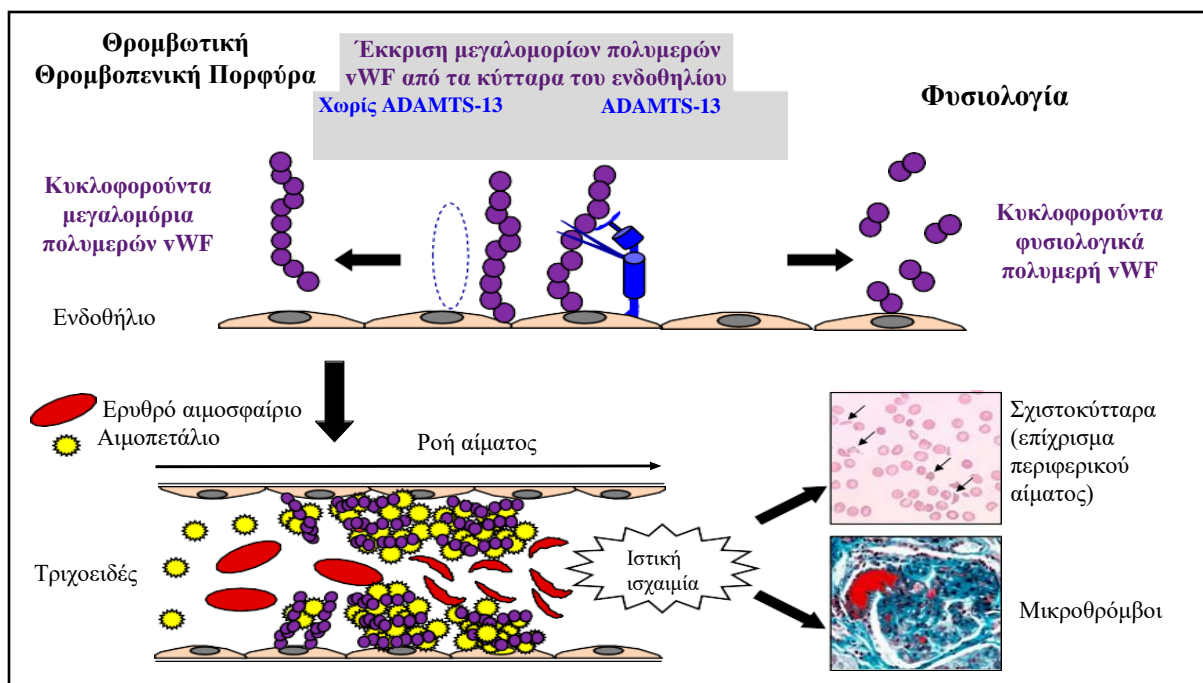
Το 1996, απομονώθηκε σε πλάσμα ανθρώπινης προέλευσης μία νέα μεταλλοπρωτεάση, η vWF-CP (vWF-Cleaving Protease), ικανή να διασπά ειδικά τον παράγοντα vW. [26] Το 1998, ανιχνεύθηκε σοβαρή λειτουργική ανεπάρκεια της vWF-CP. Η αιτία ήταν ειδικά αυτοαντισώματα, είτε συγγενούς είτε επίκτητης αιτιολογίας. [27, 28] Η vWF-CP αναγνωρίστηκε και ταυτοποιήθηκε ως ADAMTS-13, το 13<sup>ο</sup> μέλος της ομάδας των πρωτεϊνών ADAMTS που ανακαλύφθηκαν το 2001, μέσω κλωνοποίησης γονιδίων[16] και ανάλυσης αλληλουχίας πρωτεϊνών.[29] Έκτοτε, αρκετές μελέτες πάνω σε ασθενείς με διάφορες Θρομβωτικές ΜικροΑγγειοπάθειες (ΘΜΑ) έχουν δείξει ότι επίπεδα δραστηριότητας της ADAMTS-13 <10% παρουσιάζουν υψηλή ειδικότητα για τη ΘΘΠ. [30-32]

### **1.3 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ**

Ο ορισμός της ΘΘΠ έχει αλλάξει με τα χρόνια. Αρχικά, ένα οξύ επεισόδιο ΘΘΠ χαρακτηριζόταν με κλινικά κριτήρια (συμπτώματα πολυοργανικής ισχαιμίας, κυρίως στον εγκέφαλο) και βασικά βιολογικά κριτήρια (μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία και σοβαρή θρομβοπενία) που προέκυπταν απουσία άλλων προφανών αιτίων. Πρόσφατα, σε αυτόν τον ορισμό προστέθηκε και η σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13 (δραστηριότητα <10%), που είναι ο μόνος βιολογικός δείκτης με μεγάλη ειδικότητα στη ΘΘΠ. [15]

Η σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13 προκαλεί τη συγκέντρωση πολύ μεγάλων πολυμερών του vWF τα οποία παρουσιάζουν υψηλή προσκολλητική ικανότητα με τα αιμοπετάλια, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία αιμοπεταλιακών θρόμβων στη μικροκυκλοφορία (Εικόνα 2). [15] Στην πλειονότητα των περιστατικών, ο μηχανισμός για τη

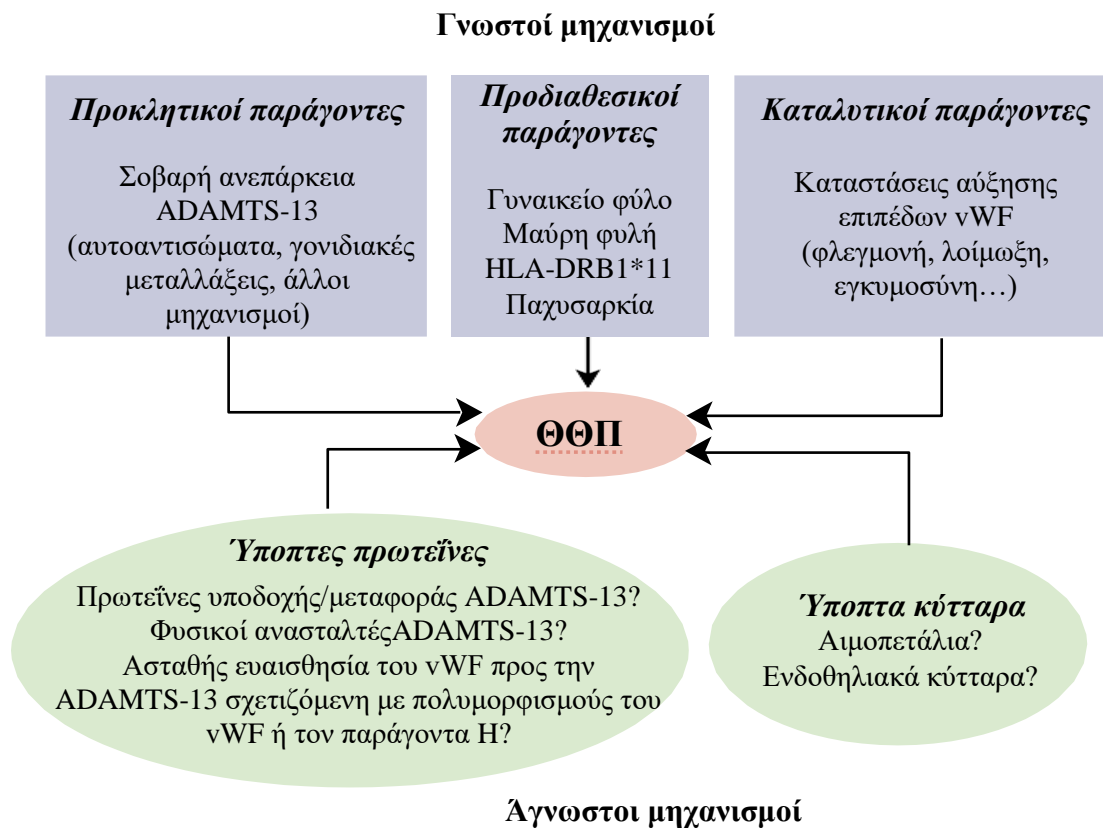
σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13 είναι ανοσολογικός και προκαλείται από αυτοαντισώματα έναντι της συγκεκριμένης μεταλλοπρωτεάσης, όπως έχει αποδειχθεί από την παρουσία θετικών αντι-ADAMTS-13 IgG αντισωμάτων στο περίπου 75% των περιστατικών ΘΘΠ οξείας φάσης (Εικόνα 3). [12, 15] Τα συγκεκριμένα αυτοαντισώματα συνήθως αναστέλλουν την πρωτεολυτική δραστηριότητα της ADAMTS-13 έναντι του vWF, ενώ έχουν βρεθεί στην κυκλοφορία σημαντικές ποσότητες ειδικών ανοσοσυμπλεγμάτων ADAMTS-13 (ICs) σε επίκτητες μορφές ΘΘΠ. Και οι δύο αυτοί μηχανισμοί οδηγούν στη σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13. [33] Επιπλέον, τα αντισώματα έναντι της ADAMTS-13 είναι πολυκλωνικά, με επιτόπους που στοχεύουν την περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη και μια ενδιάμεση περιοχή (Cystein-rich/spacerdomain) της ADAMTS-13. [34] Υπάρχουν σπάνιες αναφορές παρουσίας αντι-ADAMTS-13 IgM και IgA συσχετισμένα με αντι-ADAMTS-13 IgG σε περιστατικά οξείας ΘΘΠ. Επίσης, αντι-ADAMTS-13 IgG αντισώματα μπορεί να μην ανιχνεύονται στο 20%-25% των οξείων ΘΘΠ, εγείροντας την υπόθεση ότι η σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13 σε αυτούς τους ασθενείς μπορεί να οφείλεται σε άλλους, ασαφείς ακόμη, μηχανισμούς (Εικόνα 3). [12, 15] Υπάρχουν πολλές υποθέσεις που μπορούν να εξηγήσουν τη σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13 σε αυτές τις περιπτώσεις: χαμηλή ευαισθησία των δοκιμασιών ανίχνευσης αντι-ADAMTS-13 IgG στον προσδιορισμό αντισωμάτων που έχουν εγκλωβιστεί σε ανοσοσυμπλέγματα [35], συμμετοχή και άλλων Ig ισοτύπων [36], χαμηλή σύνθεση/έκκριση ADAMTS-13 (π.χ., οξεία ηπατική ανεπάρκεια) [37], αποδόμηση της ADAMTS-13 από ένζυμα, όπως οι καλπαΐνες, οι ελαστάσες, η θρομβίνη ή η πλασμίνη [38-40] και η καταλυτική αναστολή της ADAMTS-13 από την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη ή τις ιντερλευκίνες. [40]



**Εικόνα 2.** Η παθοφυσιολογία της ΘΘΠ. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η ADAMTS-13 διασπά τα μεγαλομόρια των πολυμερών του vWF, τα οποία εκκρίνονται από τα κύτταρα του ενδοθηλίου, σε μικρότερα τμήματα που έχουν μικρότερη προσκολλητική ικανότητα με τα αιμοπετάλια. Στην ΘΘΠ, η απουσία λειτουργικής ADAMTS-13 (είτε από κληρονομικούς παράγοντες, είτε λόγω παρουσίας ειδικού αυτοαντισώματος), δεν διασπά τα μεγαλομόρια του vWF που βρίσκονται στην κυκλοφορία και συνδέονται αυθόρμητα με τα αιμοπετάλια, σχηματίζοντας σωρούς σε διάφορα αγγεία, ακόμα και στα τριχοειδή. Αυτοί οι σωροί αιμοπεταλίων-vWF είναι αρκετά μεγάλοι ώστε να δημιουργήσουν μικροθρόμβους που προκαλούν ιστική ισχαιμία, κατανάλωση αιμοπεταλίων και μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία (παρουσία σχιστοκυττάρων στο επίχρισμα περιφερικού αίματος).

Άλλος ένας, σπάνιος (<2% των περιστατικών), μηχανισμός που οδηγεί σε σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13 είναι γενετικής αιτιολογίας μετάλλαξη γονιδίου της ADAMTS-13, που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα, προκαλώντας συγγενή ΘΘΠ ή USS (Εικόνα 3). [16] Έχουν αναφερθεί παγκοσμίως περίπου 150 διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου της ADAMTS-13, με χαμηλού βαθμού αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των ηπείρων. [41] Αυτές οι μεταλλάξεις εκτίνονται σε όλο το μήκος του γονιδίου της ADAMTS-13, με τις περισσότερες να εντοπίζονται στην αμινοτελική περιοχή. Το 70% είναι παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense) και το 30% μεταλλάξεις τερματισμού (nonsense – truncating mutation) (δεν έχει αναφερθεί ποτέ ολική διαγραφή του γονιδίου). Ο χαρακτηρισμός της ανασυνδυασμένης μεταλλαγμένης πρωτεΐνης ADAMTS-13,

απέδειξε ότι η επίπτωση των γονιδιακών μεταλλάξεων της ADAMTS-13 είναι κυρίως ποσοτικής φύσεως. [42] Η κλινική διεύθυνση αυτών των μεταλλάξεων ποικίλλει. Στο USS που εκδηλώνεται κατά την παιδική ηλικία, οι πολυάριθμες αυτές μεταλλάξεις διαφέρουν σε σχέση με το USS των ενηλίκων, στο οποίο προεξάρχει μία συγκεκριμένη μετάλλαξη, που οδηγεί στην αντικατάσταση της p.Arg1060Trp. [12, 43, 44] Αυτά τα αυτοάνοσα και γενετικά αίτια έχουν αποδειχθεί επαρκώς σε μοντέλα ποντικών και μπαμπούνων αντίστοιχα. [45, 46]



**Εικόνα 3.** Γνωστοί και άγνωστοι μηχανισμοί που σχετίζονται με την εμφάνιση ΘΘΠ. Μεταξύ των γνωστών μηχανισμών, και μέχρι τώρα ο μοναδικός που έχει αναγνωριστεί επισήμως, βρίσκεται η σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13, είτε επίκτητη, λόγω παρουσίας ειδικών αυτο-αντισωμάτων, είτε κληρονομική, λόγω γονιδιακών μεταλλάξεων. Άλλοι προδιαθεσικοί παράγοντες που έχουν αναγνωριστεί επαρκώς είναι το γυναικείο φύλο, η μαύρη φυλή, το HLA-DRB1\*11 και η παχυσαρκία. Υπάρχουν επίσης ορισμένες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπου αυξάνονται τα επίπεδα του vWF στο πλάσμα, όπως πχ, φλεγμονή, σήψη ή εγκυμοσύνη, οι οποίες μπορούν να επισπεύσουν το χρόνο και τη συχνότητα εμφάνισης οξείων επεισοδίων του συνδρόμου. Υπό διερεύνηση βρίσκονται και κάποιοι “άγνωστοι” παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση ΘΘΠ. Σε αυτούς περιλαμβάνονται πρωτεΐνες του συστήματος ADAMTS-13/vWF και ίσως κάποια κυτταρικά μοντέλα, όπως τα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Μέχρι τώρα, η μόνη, αποδεδειγμένη, αιτία εμφάνισης ΘΘΠ είναι η σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13. Η μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου, αν και θεωρείται απαραίτητη συνθήκη για την πρόκληση ΘΘΠ, από μόνη της δεν φτάνει ώστε να εκδηλωθεί κλινικά το σύνδρομο. [1] Ωστόσο, ορισμένα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη μειωμένη δραστηριότητα της ADAMTS-13, μπορεί να θεωρηθούν παράγοντες κινδύνου για την επίκτητη ΘΘΠ (πχ, το γυναικείο φύλο,[8, 12, 47] η μαύρη φυλή, [8, 47, 48] το HLA-DRB1\*11, [49] και η παχυσαρκία), σε αντίθεση με το HLA-DRB1\*04 που αποτελεί προστατευτικό παράγοντα (Εικόνα 3). [8, 47] Επιπλέον, παθοφυσιολογικές καταστάσεις οι οποίες αυξάνουν τα επίπεδα του vWF στο πλάσμα έχουν ενοχοποιηθεί ως πιθανοί παράγοντες που μπορούν να πυροδοτήσουν οξεία επεισόδια ΘΘΠ (Εικόνα 3). [17]

## **1.4 ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

### **1.4.1 Κλινικά ευρήματα της ΘΘΠ**

Σήμερα, η κλασική πεντάδα συμπτωμάτων που χαρακτηρίζει τη ΘΘΠ (πυρετός, θρομβοπενία, μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία, νευρολογικά συμπτώματα και έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας) θεωρείται ξεπερασμένη, αφού αρκετές μεγάλες αναδρομικές μελέτες έχουν αποδείξει με ξεκάθαρο τρόπο ότι αυτά τα πέντε συμπτώματα εμφανίζονται ταυτόχρονα σε μόλις 10% των περιστατικών οξείας ΘΘΠ.[6, 9, 11, 12, 18, 50] Τα πιο σταθερά σημεία της νόσου παραμένουν η βαριά θρομβοπενία ( $<30 \times 10^9/L$ ) και η μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία που χαρακτηρίζεται από την παρουσία των σχιστοκυττάρων στο επίχρισμα περιφερικού αίματος, συχνά ακολουθούμενη από αντίστοιχες εκδηλώσεις (πετέχιες, αδυναμία, δύσπνοια) (Πίνακας 1). Συμπτώματα που σχετίζονται με οργανική ισχαιμία/έμφρακτα, απαντώνται κυρίως στον εγκέφαλο (~60% των ασθενών παρουσιάζουν νευρολογικές διαταραχές με μεγάλο εύρος, από απλό πονοκέφαλο και σύγχυση, μέχρι εγκεφαλικό επεισόδιο, κώμα, σπασμούς). [6, 8-12, 18] Αρκετά συχνή είναι και η καρδιακή ισχαιμία (~25% των ασθενών που παρουσιάζουν από μεμονωμένες ανωμαλίες στο ηλεκτροκαρδιογράφημα, μέχρι έμφραγμα του μυοκαρδίου),[51] όπως επίσης και η ισχαιμία του μεσεντερίου που προκαλεί πόνο και μερικές φορές και διάρροιες. [12] Η νεφρική δυσλειτουργία περιλαμβάνει συνήθως μεμονωμένη πρωτεϊνουρία/αιματουρία, αφού

η οξεία νεφρική ανεπάρκεια δεν είναι συνηθισμένη στη ΘΘΠ (σε ασθενείς που βρίσκονται σε σύνδρομο, οι τιμές κρεατινίνης ορού είναι συνήθως <2 mg/dL). Παρόλα αυτά, η οξεία νεφρική ανεπάρκεια δε θα πρέπει να αποκλείσει πιθανή ΘΘΠ, δεδομένου ότι σε μερικές μελέτες που περιελάμβαναν ασθενείς με ΘΘΠ (επιβεβαιωμένη δραστικότητα ADAMTS-13 <10%) αναφέρθηκε οξεία νεφρική ανεπάρκεια σε ποσοστό 10%-27%. [52]

**Πίνακας 1.** Συμπτώματα και σημεία στην οξεία ΘΘΠ [53]

Θρομβοπενία	Επίσταξη, μώλωπες, πετέχιες, ουλορραγία, αιματουρία, μηνορραγία, γαστρορραγία, αιμορραγία αμφιβληστροειδούς και αιμόπτυση
Κεντρικό νευρικό σύστημα – συχνά παροδικά και μεταβαλλόμενα 70–80%	Σύγχυση, πονοκέφαλος, πάρεση, αφασία, δυσαρθρία, προβλήματα όρασης, εγκεφαλοπάθεια, κώμα (10%)
Πυρετός (>37,5 °C)	
Μη ειδικά συμπτώματα	Ωχρότητα, ίκτερος, κόπωση, αρθραλγία ή μυαλγία
Ίκτερος	Λόγω μικροαγγειοπαθητικής αιμολυτικής αναιμίας
Έκπτωση νεφρικής λειτουργίας	Πρωτεϊνουρία, μικροαιματουρία
Καρδιακά συμπτώματα	Στηθάγχη, καρδιακή ανεπάρκεια, υπόταση
Γαστρεντερικό σύστημα	Κοιλιακό άλγος

Εκτός των προαναφερθεισών εκδηλώσεων που σχετίζονται με τη διασπορά ή και την εναπόθεση των μικροθρόμβων, κάποιοι ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν συμπτώματα που συνάδουν με προϋπάρχουσα ή συνυπάρχουσα με τη ΘΘΠ κλινική κατάσταση. Το ποσοστό αυτών των δευτεροπαθών ΘΘΠ ανέρχεται μέχρι και στο 50% όλων των περιστατικών ΘΘΠ. Οι βακτηριακές λοιμώξεις και τα αυτοάνοσα νοσήματα (κυρίως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος [ΣΕΛ], αλλά και το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο [APS] και το σύνδρομο Sjogren) είναι οι πιο συχνές κλινικές οντότητες που σχετίζονται με τη ΘΘΠ. [6, 8-12, 18]

Άλλες αιτίες που πυροδοτούν το μηχανισμό εκδήλωσης του συνδρόμου είναι η κύηση, διάφορα φάρμακα (mitomycin C, κυκλοσπορίνη, κινίνη, κλοπιδογρέλη, τικλοπιδίνη), η HIV λοίμωξη, η παγκρεατίτιδα, οι κακοήθειες και οι μεταμοσχεύσεις οργάνων (Πίνακας 2). Το υπόλοιπο 50% των περιστατικών ΘΘΠ είναι ιδιοπαθούς αιτιολογίας. [6, 8-12, 18]

**Πίνακας 2.** Οι κύριες σχετιζόμενες κλινικές συνθήκες αναγνωρισμένες κατά το πρώτο οξύ επεισόδιο ΘΘΠ σε αναφορές με τουλάχιστον 50 ασθενείς (ενήλικες και παιδιά)

Αναφορά (έτος)	USS %	Ιδιοπα θές %	Λοίμωξη * και HIV %	Αυτοάν οση νόσος %	Ca και/ή ΜΑΑΚ/μετ αμόσχευση οργάνων %	Εγκυμοσό νη και λοχεία%	Άλλα %	Φάρμ ακα, %
<b>Scully et al (2008)</b> [N=176]	5	77	<1 και 7	—	2	5†	4	1
<b>Kremer Hovinga et al (2010)</b> <b>Deford et al (2013)</b> [N= 60]	0	77	7	5	2 και 2	5	3	0
<b>Lotta et al (2010)</b> [N=136]	0	79	0	7	0	9	1	4
<b>Fujimura et al (2010)</b> [N=326]	12	60	0	14	2 και 0	1	4	7
<b>Jang et al (2011)</b> [N=66]	0	59	9	6	8 και 1	6	3	8
<b>Blombery et al (2016)</b> [N=57]	0	75	3 και 0	18	0	2	0	2
<b>Coppo et al (2016)</b> [N=772]	3	49	12 και 3	11	9 και 4	5	3	1

HIV: human immunodeficiency virus, ΜΑΑΚ: μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, N: αριθμός ασθενών.

\*Συγκεκριμένη διάγνωση.

†Εγκυμοσύνη και συνδυασμένα αντισυλληπτικά χάπια.

### 1.4.2 Διαφορική διάγνωση ΘΘΠ

Η πιο σημαντική διαφορική διάγνωση της ΘΘΠ είναι η διάκρισή της από το ΑΟΣ (Αιμολυτικό Ουραιμικό Σύνδρομο [HUS-hemolytic uremic syndrome]) που αποτελεί μια ΘΜΑ συνδεδεμένη με την παρουσία στελεχών *E. coli* που παράγουν την τοξίνη shiga ή με διαταραχές των πρωτεϊνών της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος (άτυπο HUS). [54] Για πολλά χρόνια ΘΘΠ και άτυπο HUS θεωρούνταν ως ίδια νόσος. Σήμερα όμως, είναι γνωστό ότι τόσο η παθοφυσιολογία τους όσο και οι θεραπείες, είναι τελείως διαφορετικές.

Οι άλλες διαφορικές διαγνώσεις περιλαμβάνουν άλλα σύνδρομα ΘΜΑ που οφείλονται σε κακοήθειες, μεταμόσχευση, σήψη και εγκυμοσύνη (κυρίως προεκλαμψία και σύνδρομο HELLP). Επίσης στη διαφορική διάγνωση της ΘΘΠ πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν διάφορες αιματολογικές διαταραχές (σύνδρομο Evans, θρομβοπενία, αιμολυτική αναιμία) και ισχαιμικές εκδηλώσεις λόγω αυτοάνοσων νόσων (ΣΕΛ, άνοση θρομβοπενία με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο). (Πίνακας 3) [15]

Η διάκριση της ΘΘΠ από τις άλλες ΘΜΑ είναι άκρως σημαντική διότι, οι ασθενείς με σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13 ανταποκρίνονται άριστα στις θεραπευτικές πλασμαφαιρέσεις, ενώ σε όσους τα επίπεδα της μεταλλοπρωτεάσης είναι φυσιολογικά, απαιτείται διαφορετική προσέγγιση. [15] Εξάιρεση αποτελούν οι ΘΜΑ κύησης στις οποίες οι θεραπευτικές πλασμαφαιρέσεις αποδεικνύονται ωφέλιμες σε περιπτώσεις συνδρόμου HELLP. Η σωστή και έγκαιρη διάγνωση της ΘΘΠ είναι ζωτικής σημασίας για την έκβαση των ασθενών, καθώς και την περαιτέρω παρακολούθησή τους. [55]



**Πίνακας 3.** Διαφορική διάγνωση ΘΘΠ από άλλες παθολογικές καταστάσεις

Σύνδρομο	Κοινά σημεία και συμπτώματα	Διαφορικά σημεία και συμπτώματα
<b>ΘΘΠ</b>	Θρομβοπενία Αιμολυτική αναιμία	Πολυοργανική ισχαιμία, Coombs (-)
<b>HUS</b>	Θρομβοπενία Αιμολυτική αναιμία	Λοίμωξη ΓΕΣ (E. coli 0157: H7 ή Sh. dysenteriae) με αιμορραγική διάρροια, σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια ισχαιμικής προέλευσης ιδιαίτερα σε βρέφη και μικρά παιδιά, μέτρια αύξηση προϊόντων αποικοδόμησης ινωδογόνου (FDP, D-D)
<b>aHUS (atypical HUS)</b>	Θρομβοπενία Αιμολυτική αναιμία	Κληρονομικό: Σε βρέφη και μικρά παιδιά και 1/3 των περιπτώσεων σε ενήλικες. Σοβαρή βλάβη της νεφρικής λειτουργίας χωρίς διάρροια. Επίκτητο: Σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια ισχαιμικής προέλευσης. Γενικά, απουσία νευρολογικών συμπτωμάτων
<b>Σύνδρομο HELLP</b>	Θρομβοπενία Αιμολυτική αναιμία	Αύξηση ηπατικών ενζύμων (>3 φορές φ.τ)
<b>Σύνδρομο Evans</b>	Θρομβοπενία Αιμολυτική αναιμία	Παρουσία αντιαιμοπεταλιακών και αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων, Coombs (+), χωρίς ισχαιμία περιφερειακών οργάνων
<b>ΔΕΠ</b>	Θρομβοπενία Αιμολυτική αναιμία (σπάνια)	Σημαντική αύξηση των προϊόντων αποικοδόμησης ινωδογόνου (FDP, D-D), υποϊνωδογοναιμία, παράταση χρόνων πήξης
<b>(Προ) εκλαμψία</b>	Θρομβοπενία Αιμολυτική αναιμία (σπάνια)	Υπέρταση (δεύτερο μισό της εγκυμοσύνης), περιφερικό οίδημα, αυξημένο ουρικό οξύ, αύξηση προϊόντων αποικοδόμησης ινωδογόνου (FDP, D-D),
<b>Καταστροφικό ΑΦΣ</b>	Θρομβοπενία	Παρουσία αντιπυρηνικών και αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων, αντιπηκτικό του λύκου, θρόμβωση μεγάλων αρτηριακών και φλεβικών αγγείων
<b>HIT</b>	Θρομβοπενία	Αιμοπεταλιακοί θρόμβοι, απουσία αιμόλυσης και σχιστοκυττάρων, παρουσία αντισωμάτων PF4: ηπαρίνης
<b>ITP</b>	Θρομβοπενία	Απουσία σχιστοκυττάρων και συστηματικών συμπτωμάτων, παρουσία αντισωμάτων συνδεδεμένων με αιμοπετάλια

## **1.5 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΘΘΠ**

### **1.5.1 Ρουτίνα**

Εκτός της μικροαγγειοπαθητικής αναιμίας και της θρομβοπενίας λόγω «κατανάλωσης» αιμοπεταλίων, οι κλασικές παράμετροι αιμόλυσης δείχνουν αυξημένο αριθμό ΔΕΚ, υψηλά επίπεδα LDH (δείκτης αιμόλυσης) και σχεδόν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα απτοσφαιρινών ορού. [56] Το σήμα κατατεθέν της νόσου όμως, αναμφίβολα, αποτελεί η παρουσία σχιστοκυττάρων στο επίχρισμα περιφερικού αίματος. Πρόκειται για θραύσματα ερυθροκυττάρων, γνωστά και ως κρानιοκύτταρα, λόγω του σχήματος που παίρνουν καθώς «στριμώνονται» μεταξύ των μικροθρόμβων κατά τη διέλευσή τους στα τριχοειδή αγγεία. Η άμεση Coombs είναι αρνητική, εκτός από κάποιες περιπτώσεις όπου συνυπάρχουν αυτοάνοσα σύνδρομα (ΣΕΛ). Ο βασικός έλεγχος πήξης είναι συνήθως φυσιολογικός, με ήπιες παρατάσεις χρόνου. (Πίνακας 4) Ο έλεγχος νεφρικής λειτουργίας μπορεί να δείξει κάποιου βαθμού πρωτεϊνουρία, αιματουρία και σε ορισμένες περιπτώσεις αυξημένα επίπεδα ουρίας και κρεατινίνης. Στο 60% περίπου των περιστατικών παρατηρείται αύξηση της τροπονίνης (0,1mg/L), χωρίς όμως να εμφανίζονται συμπτώματα καρδιακής δυσλειτουργίας. [51] Στο 10% των περιπτώσεων παρατηρούνται αλλαγές στο ηλεκτροκαρδιογράφημα (συνήθως διαταραχές επαναπόλωσης). [56]

Προκειμένου να αξιολογηθεί και να προβλεφθεί η ανεπάρκεια της ADAMTS-13, έχουν προταθεί κάποια συστήματα βαθμολόγησης που βασίζονται σε συγκεκριμένα σημεία της ΘΘΠ. Μερικά από αυτά τα σημεία είναι ο αριθμός των αιμοπεταλίων, τα επίπεδα της κρεατινίνης ορού, ο αριθμός των ΔΕΚ, η έμμεση χολερυθρίνη [57] και η ανίχνευση αντιπυρηνικών αντισωμάτων ή δ-διμερών.[58]

**Πίνακας 4.** Έλεγχοι και αναμενόμενα αποτελέσματα σε ασθενείς με υποψία ΘΘΠ. Τα δείγματα θα πρέπει να αποσταλούν για εξέταση πριν την πρώτη ΘΠΑ.

<b>Για τη διάγνωση</b>	
Γενική αίματος και επίχρισμα περιφερικού αίματος	Αναιμία, θρομβοπενία, σχιστοκύτταρα
Αριθμός ΔΕΚ	αυξημένος
Απτοσφαιρίνες	μειωμένες
Έλεγχος πήξης και ινωδογόνο	Κ.φ. (ήπιες παρατάσεις)
Ουρία και ηλεκτρολύτες	Έκπτωση νεφρικής λειτουργίας
Τροπονίνη T / Τροπονίνη I	Έλεγχος καρδιακής συμμετοχής
Έλεγχος ηπατικής λειτουργίας	Συνήθως κ.φ.
Ασβέστιο	Μπορεί να μειωθεί λόγω ΘΠΑ
Γαλακτική αφυδρογονάση (LDH)	Αυξημένη λόγω αιμόλυσης
Εξέταση ούρων	Πρωτεΐνες
Άμεση Coombs	Αρνητική
Προσδιορισμός ομάδας αίματος	Εξασφάλιση επάρκειας παραγώγων αίματος
Ιολογικός έλεγχος βάσης (HCV, HBV, HIV)	Αποκλεισμός συμμετοχής ιογενούς λοίμωξης
Τεστ κύησης (σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας)	
Δοκιμασία ADAMTS 13 (δραστικότητα / αυτοαντισώματα και ανασταλτές)	Άμεση έναρξη ΘΠΑ σε υποψία ΘΘΠ, (πριν βγουν τα αποτελέσματα)
Ηλεκτροκαρδιογράφημα	Παρακολούθηση καρδιακής λειτουργίας ή/και βλάβης
CT/MRI εγκεφάλου	Προσδιορισμός εγκεφαλικής λειτουργίας/συμμετοχής
<b>Για πιθανό υποκείμενο νόσημα</b>	
Έλεγχος θυροειδούς	Αποκλεισμός νόσου Graves
Έλεγχος αυτοαντισωμάτων (ANA/RF/LA/ACLA), συμπεριλαμβανομένου αντιπηκτικού του λύκου	Αποκλεισμός πιθανού αυτοάνοσου νοσήματος
Καλλιέργεια κοπράνων	Έλεγχος για <i>E.coli</i> (σε διάρροια)
CT θώρακος/κοιλίας/λεκάνης (αν ενδείκνυται) ± καρκινικοί δείκτες	Υποψία υποκείμενης κακοήθειας

ΘΠΑ, θεραπευτική πλασμαφαίρεση; CT, computerized tomography (αξονική τομογραφία); MRI, magnetic resonance imaging (μαγνητική τομογραφία); ANA, antinuclear antibody (αντιπυρηνικά αντισώματα); RF, rheumatoid factor (ρευματοειδής παράγοντας); LA, lupus antibody (αντίσωμα λύκου); ACLA, anticardiolipin antibodies (Αντισώματα καρδιολιπίνης); ΘΘΠ, θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα.

Δεδομένου ότι οι προαναφερθέντες έλεγχοι δεν είναι ειδικοί για την ΘΘΠ, αλλά αναφέρονται και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες θα πρέπει να διαφοροδιαγνωστούν από τη ΘΘΠ, είναι απαραίτητη η ανάλυση των επιπέδων της ADAMTS-13, του μοναδικού αξιόπιστου σε ευαισθησία και ειδικότητα δείκτη της ΘΘΠ.

### **1.5.2 Διερεύνηση της ADAMTS-13**

Ο έλεγχος της ADAMTS-13 θα πρέπει να πραγματοποιείται άμεσα. Επίπεδα δραστηριότητας <10% επιβεβαιώνουν ισχυρά τη διάγνωση ΘΘΠ. Υπάρχουν διαθέσιμες πολλές δοκιμασίες μέτρησης δραστηριότητας της ADAMTS-13 που βασίζονται στην αρχή της αποδόμησης ενός υποστρώματος vWF (είτε πλήρους μήκους [59, 60], είτε ένα μικρό πεπτίδιο [61-63]) από τη μεταλλοπρωτεάση του ασθενούς που βρίσκεται σε δείγμα πλάσματος με κιτρικό αντιπηκτικό. Οι τιμές εκφράζονται συνήθως σε ποσοστό επί τοις εκατό δραστηριότητας, σε σχέση με τις τιμές φυσιολογικού πλάσματος από δεξαμενή δοτών (pooled plasma) και, ιδανικά, προσαρμοσμένο στο διεθνές πρότυπο της ADAMTS-13 πλάσματος του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας.[64]

Στόχος είναι να ακολουθήσουν έρευνες που θα τεκμηριώσουν τη σπουδαιότητα του μηχανισμού της ADAMTS-13: δοκιμασίες για τα αυτοαντισώματα έναντι της μεταλλοπρωτεάσης, έρευνα για πιθανό ανασταλτή [27, 28, 30] και, σε μερικές περιπτώσεις, γονιδιακή αλληλούχιση (gene sequencing) της ADAMTS-13 για ταυτοποίηση γενετικών μεταλλάξεων.

### **1.5.3 Λειτουργικές δοκιμασίες της ADAMTS-13**

Μέθοδοι αναφοράς της λειτουργικότητας της μεταλλοπρωτεάσης παραμένουν κυρίως οι in-house μέθοδοι, οι οποίες απαιτούν πολύ καλού επιπέδου εργαστηριακές ικανότητες και εξειδίκευση, ειδικά λόγω προαναλυτικών και αναλυτικών περιορισμών, ώστε να παρέχουν αξιόπιστα αποτελέσματα, υψηλής διαγνωστικής αξίας.[65]

Δύο κατηγορίες δοκιμασιών είναι αυτές που ξεχωρίζουν: δραστηριότητα σύνδεσης κολλαγόνου (CBA: collagen-binding activity) [61, 66] και φθορίζουσα απεικόνιση μεταφοράς ενέργειας ενός συνθετικού αμινοπεπτιδίου (FRET-vWF73: fluorescence resonance energy transfer), η οποία είναι πιθανότατα ακριβέστερη της πρώτης μεθόδου. [67] Οι συγκεκριμένες

μέθοδοι είναι σημαντικά χρονοβόρες, ενώ ακόμα και για την πιο σύντομη εξ αυτών (FRET-WF73) [61] απαιτούνται αρκετές ώρες στο εργαστήριο ώστε να παραδοθούν εγκαίρως τα αποτελέσματα. Συνέπεια αυτών είναι οι συγκεκριμένες μέθοδοι αναφοράς να περιορίζονται, παγκοσμίως, σε ειδικά εργαστήρια μόνο (συνήθως ένα με δύο εργαστήρια ανά χώρα εξειδικεύονται και ασχολούνται με το βιολογικό ρόλο της ADAMTS-13 στις ΘΜΑ). Η εφαρμογή ταχέων μεθόδων δραστηκότητας της ADAMTS-13, οι οποίες θα είναι καταλυτικές για την έγκαιρη διάγνωση, θα βοηθήσουν επίσης και στην αποφυγή θεραπευτικών πλασμαφαίρεσεων σε περιστατικά όπου δεν τεκμηριώνεται ΘΘΠ. [68]

Στα ανωτέρω, χρήσιμες έχουν αποδειχθεί και οι δοκιμασίες ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων έναντι της μεταλλοπρωτεάσης, όπου πλάσμα ασθενών προς εξέταση επωάζεται με φυσιολογικό πλάσμα και στη συνέχεια μετράται η δραστηκότητα στις ADAMTS-13. [27, 28, 30]

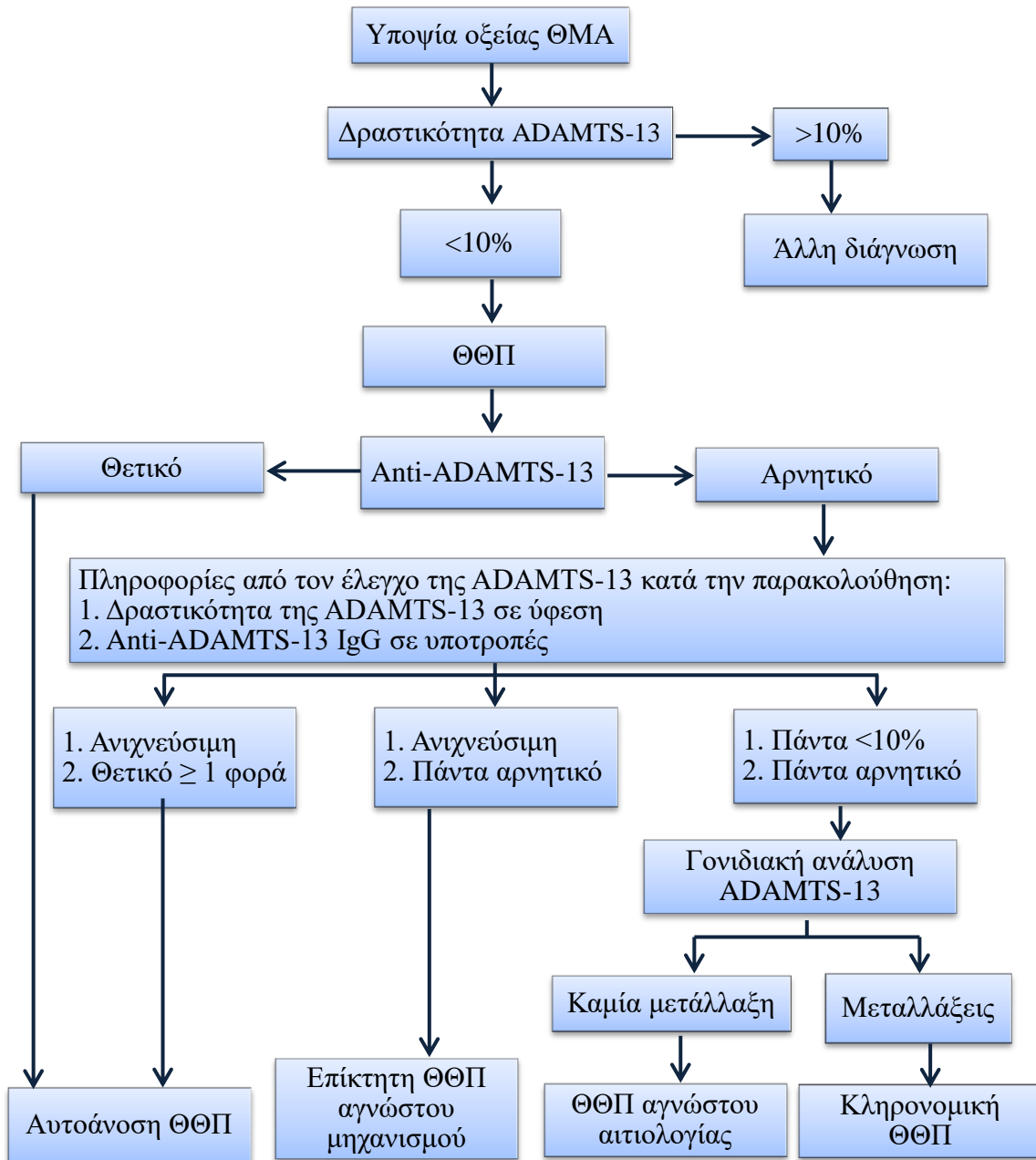
#### **1.5.4 Ανοσοχημικές μέθοδοι**

Τελευταία έχουν αναπτυχθεί διάφορες ταχείες μέθοδοι Elisa για τη μέτρηση δραστηκότητας της ADAMTS-13, οι οποίες θα μπορούσαν να εφαρμοστούν σε τοπικά εργαστήρια, ωστόσο υπολείπονται σε αξιοπιστία των μεθόδων αναφοράς. [62, 63, 69] Απλές στην εκτέλεση είναι αντίστοιχα και οι δοκιμασίες ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων έναντι της ADAMTS-13. Χρησιμοποιούνται διάφορα εμπορικά kits τα οποία ουσιαστικά τιτλοποιούν τα επίπεδα των αντι-ADAMTS-13 IgG [44], που αν και παίζουν δευτερεύοντα ρόλο στην τεκμηρίωση της ιδιοπαθούς ΘΘΠ, όταν μετρώνται κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης του συνδρόμου επιβεβαιώνουν ισχυρά τη διάγνωση.

Λόγω των όσων αναφέρθηκαν, δεν είναι εύκολη η πρόσβαση στα αποτελέσματα της ADAMTS-13 κατά τη διάρκεια μιας επείγουσας κατάστασης [15], χωρίς αυτό όμως να αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την έναρξη της θεραπείας του συνδρόμου. Οι θεράποντες ιατροί βασίζονται στην κλινική εικόνα του ασθενούς ώστε να τεκμηριώσουν τη διάγνωση και να ξεκινήσουν τη θεραπεία. [15, 70] Μία συνήθης πρακτική σε τέτοιες περιπτώσεις είναι η λήψη δείγματος από τον ασθενή με ΘΜΑ πριν την έναρξη της θεραπευτικής πλασμαφαίρεσης (προκειμένου να μην επηρεαστούν τα αποτελέσματα από την πλασμαφαίρεση) και εξέτάσή του σε δεύτερο χρόνο, με σκοπό να ενισχύσει ή να

αποδυναμώνει τη διάγνωση. [15]

Αν και η διερεύνηση δραστηριότητας της ADAMTS-13 παραμένει ένα ισχυρό όπλο για τη διάγνωση της ΘΘΠ, εντούτοις, η επείγουσα θεραπευτική προσέγγιση βασίζεται στα κλινικά συμπτώματα που παρουσιάζει ο ασθενής.



Εικόνα 4. Αλγόριθμος διερεύνησης της ADAMTS-13 στη ΘΘΠ.

Η διερεύνηση της ADAMTS-13 είναι υποχρεωτική στη διαχείριση των ΘΜΑ, καθώς αποτελεί το μοναδικό αξιόπιστο δείκτη που ισχυροποιεί τη διάγνωση της ΘΘΠ. Η μέτρηση της δραστηριότητας της ADAMTS-13 αποτελεί μια δοκιμασία διάκρισης (screening assay). Όταν η δραστηριότητά της βρεθεί <10% η κλινική υποψία για ΘΘΠ επιβεβαιώνεται. Έτσι, προκειμένου να τεκμηριωθεί ο μηχανισμός σοβαρής ανεπάρκειας ADAMTS-13, ακολουθεί σε δεύτερο χρόνο η δοκιμασία ανίχνευσης anti-ADAMTS-13 IgG αντισωμάτων, ενώ στο τέλος (και σπανίως) πραγματοποιείται η γονιδιακή αλληλουχία της μεταλλοπρωτεάσης και μόνο σε επιλεγμένες ενδείξεις. Τα δεδομένα που συλλέγονται από τις μετρήσεις της ADAMTS-13 κατά την παρακολούθηση των ασθενών, αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο ώστε να διασαφηνιστούν όλοι οι πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν στη σοβαρή έλλειψή της. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, το συγκεκριμένο πάνελ εξετάσεων που πραγματοποιείται από το πρώτο επεισόδιο του συνδρόμου, αλλά και στη μετέπειτα παρακολούθηση, επιτρέπουν στην επιστημονική κοινότητα να αναγνωρίσει τους τρεις τύπους ΘΘΠ: επίκτητη αυτοάνοση ΘΘΠ, επίκτητη ΘΘΠ αγνώστου μηχανισμού (που δεν συνδέεται με αυτό-αντισώματα) και κληρονομική ΘΘΠ (USS). Σπανίως, σε κάποια περιστατικά ΘΘΠ ο μηχανισμός παραμένει άγνωστος.

## **1.6. ΘΘΠ ΚΑΙ ΚΥΗΣΗ**

Η ΘΘΠ κύησης εκδηλώνεται συνήθως κατά το δεύτερο μισό της κύησης. Σε περίπτωση USS, η νόσος εμφανίζεται από την πρώτη κιάλας κύηση, ενώ στην επίκτητη μορφή μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιαδήποτε κυοφορία. Σε αναδρομικές μελέτες που έχουν γίνει, το ποσοστό απώλειας κυήματος είναι ιδιαίτερα υψηλό (~40%), ωστόσο σε αυτά τα νούμερα συμπεριλαμβάνονται και πολλές έγκυες που δεν είχαν διαγνωστεί εγκαίρως με ΘΘΠ. [71]

**Πίνακας 5.** Διαφορική διάγνωση και τυπικά συμπτώματα στις μικροαγγειοπάθειες κύησης

	ΜΑΑΑ	Θρομβο πενία	Διαταρα χή πήξης	Υπέρ ταση	Κοιλιακά συμπτώμ ατα	Έκπτωση νεφρικής λειτουργίας	Νευρολογικά συμπτώματα
<b>ΠΕ</b>	+	+	±	+++	±	±	++
<b>HELLP</b>	+	++	±	+	+++	+	±
<b>ΘΘΠ</b>	++	+++	-	±	+	++	+++
<b>ΑΟΣ</b>	+	++	±	++	+	+++	±
<b>ΟΛΗΚ</b>	±	+	++++	+	+++	++	+
<b>ΣΕΛ</b>	+	+	±	+	±	++	+
<b>ΑΦΣ</b>	+	++	±	±	±	±	±

ΠΕ, προεκλαμψία; HELLP, hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets; ΘΘΠ, Θρομβωτική Θρομβοπενική πορφύρα; ΑΟΣ, Αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο; ΟΛΗΚ: Οξύ λιπώδες ήπαρ κύησης; ΣΕΛ, Συστηματικός ερυθριματώδης λύκος; ΑΦΣ, Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (καταστροφικό), ΜΑΑΑ, Μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία.

Σε αντίθεση με άλλες ΘΜΑ κύησης (προεκλαμψία ή σύνδρομο HELLP) (Πίνακας 5) η διακοπή της κύησης δεν φαίνεται να εξαλείφει τα συμπτώματα της ΘΘΠ, συνεπώς, εφ' όσον δεν παρατηρηθούν ανωμαλίες στην ανάπτυξη του εμβρύου, η κύηση πρέπει να συνεχιστεί και η ασθενής να αντιμετωπιστεί όπως επιτάσσουν τα θεραπευτικά πρωτόκολλα της ΘΘΠ. Μεταξύ των περιστατικών στους ενήλικες, η ΘΘΠ κύησης εμφανίζει υψηλό ποσοστό USS (περίπου 33%), ενώ φτάνει μέχρι το 50% όσον αφορά την πρώτη κύηση. [71]

### **1.7 ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΘΘΠ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΟΠΑΘΗΣ (ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗ ΜΕ ΑΛΛΟ ΑΥΤΟΑΝΟΣΟ ΝΟΣΗΜΑ) ΘΘΠ**

Και οι δύο αυτές μορφές ΘΘΠ έχουν δύο κοινά γνωρίσματα που καταδεικνύουν το ισχυρό αυτοάνοσο υπόβαθρο της νόσου: την «κυριαρχία» των γυναικών στα περιστατικά (2,5 γυναίκες, έναντι 1 άνδρα) και υψηλά επίπεδα αντι-ADAMTS-13 αντισωμάτων κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης. [6, 9, 11, 12, 18] Επιπλέον, το 10% των ασθενών με ιδιοπαθή ΘΘΠ, κατά την παρακολούθηση, αναπτύσσουν και άλλα αυτοαντισώματα, είτε μεμονωμένα, είτε σχετιζόμενα κλινικά συμπτώματα άλλου αυτοάνοσου νοσήματος (κυρίως anti-DNA και ΣΕΛ) [72]



## **1.8 ΘΘΠ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗ ΜΕ HIV ΛΟΙΜΩΞΗ**

Η ΘΘΠ μπορεί κατά κανόνα να αποκαλύψει μια HIV λοίμωξη που χρήζει άμεσης ταυτοποίησης. Η HIV λοίμωξη δε μεταβάλλει την καλή πρόγνωση της ΘΘΠ και την απάντηση στη θεραπεία με πλάσμα, καθώς τα ποσοστά ύφεσης και επιβίωσης είναι συγκρίσιμα με εκείνα των ασθενών με ιδιοπαθή ΘΘΠ. Τέτοιοι ασθενείς μπορούν επομένως να επωφεληθούν από τα συνήθη μέτρα για την αντιμετώπιση της ΘΘΠ (π.χ. εντατική και πιθανώς παρατεταμένη θεραπευτική πλασμαφαίρεση) μαζί με ιδιαίτερα ενεργή αντιρετροϊκή θεραπεία. Σε εκείνους με σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13, υπάρχει ομαλοποίηση στη δραστηριότητα της ADAMTS-13, καθώς ο αριθμός των CD4 ανακάμπτει και το ιικό φορτίο του HIV πέφτει, μετά από θεραπεία με HAART (Highly Active AntiRetroviral Therapy) και ΘΠΑ. Περιστασιακά, απαιτείται περαιτέρω θεραπεία, για παράδειγμα με rituximab ή στεροειδή, τα οποία δεν προκαλούν σημαντική αύξηση των ευκαιριακών λοιμώξεων. [73]

Πρακτικά, η HAART θα πρέπει να χορηγείται αμέσως μετά τη ΘΠΑ για να παρατείνεται ο χρόνος απορρόφησης.

## **1.9 ΘΘΠ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ**

Σε υποψία ΘΜΑ σε καρκινοπαθείς και σε ασθενείς με μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ή μεταμόσχευση οργάνων, εκείνοι των οποίων η δραστηριότητα της ADAMTS-13 είναι μη ανιχνεύσιμη στην εμφάνιση του συνδρόμου είναι λίγοι. Αυτές οι μορφές της ΘΘΠ συμβαίνουν ισάριθμα σε άνδρες και γυναίκες, έχουν μεγαλύτερη ηλικία εκδήλωσης της ασθένειας, δεν είναι το αποτέλεσμα μιας ανοσοεπαγόμενης (immune-mediated) ανεπάρκειας της ADAMTS-13 και προμηνύουν μια χειρότερη πρόγνωση συγκρινόμενες με άλλες μορφές ΘΘΠ. [74] Η ΘΘΠ σχετιζόμενη με καρκίνο και με μεταμόσχευση οργάνων έχει κακή ανταπόκριση στην πλασμαφαίρεση (TPE). Επιπλέον ο καρκίνος μπορεί είτε να είναι μια γνωστή προϋπάρχουσα κατάσταση ή να διαγνωστεί ταυτόχρονα (με τη νόσο). Η ΘΠΑ δεν έχει κανένα όφελος. [75] Η θεραπεία της υποκείμενης κακοήθειας είναι το επίκεντρο της θεραπείας.

Στη ΘΘΠ σχετιζόμενη με μεταμόσχευση η αντιμετώπισή της είναι δύσκολη, καθώς η διακοπή της κυκλοσπορίνης A ή η αλλαγή σε άλλο ανοσοκατασταλτικό, όπως το tacrolimus, μπορεί να επιδεινώσει την GVHD (Graft Versus Host Disease). Δεν έχει αποδειχθεί κανένα

πλεονέκτημα με τη ΘΠΑ. Πράγματι, σε μια αναδρομική ανασκόπηση συνδέθηκε με αυξημένη θνησιμότητα. [76] Υπάρχει, ανεπίσημη, εμπειρία επιτυχούς χρήσης του defibrotide. [77, 78]

### **1.10 ΘΘΠ ΣΕ ΠΑΙΔΙΚΗ ΚΑΙ ΕΦΗΒΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ**

Αντιπροσωπεύει λιγότερο του 10% των όλων των περιπτώσεων ΘΘΠ. Εξαιτίας της σπανιότητάς της, η ΘΘΠ σε παιδιά συχνά διαγιγνώσκεται λανθασμένα (30% της αρχικής εσφαλμένης διάγνωσης ως αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS), αυτοάνοση θρομβοπενία, σύνδρομο EVANS) [13, 14], γεγονός που δυσχεραίνει την πρόγνωση. Σε αντίθεση με την εμφάνιση της ΘΘΠ σε ενήλικες, η επίπτωση του συνδρόμου Urshaw-Schulman (USS) είναι σημαντική στην παιδική ηλικία. [79, 80] Μια πρόσφατη έρευνα του Γαλλικού Κέντρου Αναφοράς για ΘΜΑ, ανέφερε, μεταξύ 68 καλά μελετημένων περιστατικών ΘΘΠ σε παιδιά που καταγράφηκαν εντός μιας περιόδου 16 ετών, τα 23 με σύνδρομο Urshaw-Schulman (33%) και τα 45 με επίκτητη ΘΘΠ (67%). [14] Εκτός από έναν ξεχωριστό μηχανισμό για σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13, το σύνδρομο Urshaw-Schulman και η επίκτητη ΘΘΠ στα παιδιά έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. [81, 82]

Το σύνδρομο Urshaw-Schulman στα παιδιά, είναι στην πραγματικότητα αρκετά καλά μελετημένο χάρη στα αρχεία για τις σπάνιες γενετικές παθήσεις (π.χ. <http://www.ttpregistry.net>). Το αρχικό επεισόδιο USS συμβαίνει κατά τη βρεφική ηλικία (νεογνική περίοδος) ή στην πρώιμη παιδική ηλικία (<10 ετών) και σπανίως κατά την εφηβεία. [83] Η σοβαρότητα της ασθένειας (πχ η εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων κατά τα οξέα περιστατικά και η συχνότητα των υποτροπών) ποικίλει και μπορεί να σχετίζεται με συγκεκριμένες μεταλλάξεις της ADAMTS-13 [84] (π.χ. μετατόπιση c.717\_del και μια παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη c.3655C>T) [85] και επιπρόσθετους γενετικούς παράγοντες. Έχει αναφερθεί κάποιες φορές ετερογένεια των συμπτωμάτων του USS μεταξύ αδελφών, σε αντίθεση με τους γονείς, οι οποίοι αν και είναι φορείς ετερόζυγης μετάλλαξης της ADAMTS 13, είναι κλινικά ασυμπτωματικοί. [45]

Η εμφάνιση της ΘΘΠ στην παιδική και εφηβική ηλικία αναφέρεται λιγότερο στη βιβλιογραφία. [13, 14] Στην πιο πρόσφατη μελέτη κοόρτης (cohort study) που περιγράφει την αρχική φάση και την παρακολούθηση (follow-up) 45 ασθενών [12], η εμφάνιση της ΘΘΠ στα παιδιά, περιέργως, φαίνεται αρκετά όμοια με την εμφάνιση της ΘΘΠ στους

ενήλικες: η κατανομή μεταξύ ιδιοπαθούς και δευτεροπαθούς εμφάνισης είναι 55% / 45%, οι σχετιζόμενες κλινικές εκδηλώσεις της δευτεροπαθούς ΘΘΠ είναι κυρίως λοιμώξεις και αυτοάνοσα νοσήματα, και ο πιο κοινός μηχανισμός για την επίκτητη σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13 είναι τα αντισώματα ADAMTS-13 (80%). Η ιδιοπαθής ΘΘΠ χαρακτηρίζεται από εμφάνιση στην εφηβεία, κυριαρχία στο γυναικείο φύλο, και ένα υψηλό ποσοστό από θετικά αυτό-αντισώματα ADAMTS-13 (96%). Αντιθέτως η δευτεροπαθής ΘΘΠ χαρακτηρίζεται από νεαρότερη ηλικία (<10 ετών), μια –συχνότερα– σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια, και μικρότερο ποσοστό θετικών αυτό-αντισωμάτων της ADAMTS-13 (65%). [12]

### **1.11 ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ**

Με την άμεση έναρξη της πλασμαφαίρεσης, ο μέσος δείκτης επιβίωσης από το πρώτο επεισόδιο της ΘΘΠ είναι 80% με 90%. [86] Σε μεγαλύτερη ηλικία, η πολύ αυξημένη τιμή της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) (>10x φυσιολογική τιμή), απαντάται κυρίως σε οργανική βλάβη, και μια αυξημένη τιμή τροπονίνης (>0,25 ng/mL) σχετίζονται με θάνατο και ανθεκτικότητα στη θεραπεία (treatment refractoriness). [87, 88]

Παρά τις φυσιολογικές κλινικές εξετάσεις και εργαστηριακές παραμέτρους [89] μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, ένα σημαντικό ποσοστό των επιζώντων από ΘΘΠ ανέφερε ανεπαρκή αποκατάσταση, με μειονεκτήματα στην ποιότητα της υγείας τους. [90] Νευρογνωστικές διαταραχές, υπέρταση και μείζονα κατάθλιψη αναφέρονται να κυριαρχούν σε επιζώντες από ΘΘΠ, συγκριτικά με τον υγιή πληθυσμό, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει αυξημένη θνησιμότητα. [10] Επιπλέον οι ασθενείς με ΘΘΠ είναι πιο επιρρεπείς να αναπτύξουν ασθένειες του συνδετικού ιστού (κυρίως ΣΕΛ και σύνδρομο Sjögren) το οποίο απαιτεί άμεση ταυτοποίηση κατά την παρακολούθηση (follow-up). [72]

Η μακροπρόθεσμη παρακολούθηση των ασθενών με ΘΘΠ, που περιλαμβάνει ιατρική συμβουλευτική, τακτικό εργαστηριακό έλεγχο και παρακολούθηση της δραστηριότητας της ADAMTS-13, δικαιολογείται επίσης και από τον κίνδυνο υποτροπής της νόσου. Στο 40% των περιπτώσεων, οι ασθενείς με αυτοάνοση ΘΘΠ, θα παρουσιάσουν μια ή περισσότερες υποτροπές. [91] Οι υποτροπές προκύπτουν από σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13 που προκαλείται από την εμμονή ή την επανεμφάνιση των anti-ADAMTS-13

αντισωμάτων. [36] Μέχρι στιγμής, η ADAMTS-13 είναι ο μόνος ειδικός βιολογικός δείκτης ικανός να προβλέψει τις υποτροπές της ΘΘΠ κατά την παρακολούθηση της ύφεσης. [91]

## **1.12 ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Η ολοκληρωμένη ανταπόκριση στη θεραπεία ορίζεται από αριθμό αιμοπεταλίων  $>150 \times 10^9/L$  για 2 διαδοχικές μέρες, μαζί με φυσιολογική LDH και κλινική αποκατάσταση. Η ανθεκτική ανταπόκριση στη θεραπεία διαρκεί τουλάχιστον 30 μέρες από τη διακοπή της πλασμαφαίρεσης (TPE). Η επανεμφάνιση της ασθένειας εντός 30 ημερών από την ανταπόκριση στη θεραπεία αποτελεί επιδείνωση, ενώ η επανεμφάνιση σε 30 ή περισσότερες μέρες μετά την απάντηση στη θεραπεία αποτελεί υποτροπή. Ανθεκτική νόσος καθορίζεται από τη μη-ανταπόκριση στη θεραπεία έως την 30η μέρα ή/και καθόλου απάντηση έως την 60η μέρα. [92] Υπάρχει ωστόσο εξατομίκευση ασθενών ανά κέντρο και κατάλληλη αντιμετώπιση των περιστατικών ΘΘΠ.

### **1.12.1 Θεραπεία πρώτης γραμμής**

Η ΘΘΠ απαιτεί ταχεία διάγνωση και επείγουσα αντιμετώπιση, συνήθως σε Μ.Ε.Θ.

#### **1.12.1.1 Θεραπεία με πλάσμα**

Η πλασμαφαίρεση αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στην αντιμετώπιση της ΘΘΠ. [25] Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, [25, 93] η θεραπευτική πλασμαφαίρεση (συνήθως αντικατάσταση 1,5 όγκου πλάσματος αρχικά, ακολουθούμενη από συνεδρίες αντικατάστασης ενός όγκου) πρέπει να ξεκινήσει αμέσως μόλις η διάγνωση της ΘΘΠ τεθεί ή έστω υποπτευθεί. Η πλασμαφαίρεση εφαρμόζεται καθημερινά έως ότου υποχωρήσουν τα συμπτώματα που σχετίζονται με οργανική εμπλοκή (εγκεφαλικές εκδηλώσεις, νεφρική ανεπάρκεια, αυξημένη τιμή τροπονίνης, κοιλιακό άλγος προερχόμενο από γαστρεντερίτιδα ή παγκρεατίτιδα), η τιμή των αιμοπεταλίων να έχει σταθερά διορθωθεί και η αιμόλυση να έχει υποχωρήσει. Κάποιες ερευνητικές ομάδες πρότειναν προοδευτική μείωση των συνεδριών ΘΠΑ εντός 3 εβδομάδων για την αποφυγή σοβαρών επιδεινώσεων. [94] Ωστόσο, αυτή η τακτική παραμένει αμφιλεγόμενη, ιδιαίτερα καθώς η αυξημένη χρήση rituximab φαίνεται να προλαμβάνει καλύτερα τέτοιες επιπλοκές.

Για την πλασμαφαίρεση χρησιμοποιούνται διάφορα είδη παρασκευασμάτων πλάσματος: FFP (fresh frozen plasma / φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα), FP (frozen plasma / κατεψυγμένο πλάσμα), αδρανοποιημένο από ιούς πλάσμα με τη μέθοδο διαλύτη και απορρυπαντικού [solvent/detergent (OctaplasLG, Octapharma)], αδρανοποίηση με ψωραλένιο [amotosalen plasma (Intercept, Cerus)] ή με ριβοφλαβίνη (Mirasol, Rontis)]. Όλα αυτά τα πλάσματα θεωρούνται ισοδύναμα. [95] Έχει προταθεί μια θεωρητική υπεροχή του FP και του κρυοκαθιζήματος (cryoprecipitate), το οποίο είναι ελεύθερο από τα υψηλού μοριακού βάρους πολυμερή του vWF, χωρίς αυτό να έχει επιβεβαιωθεί. [96] Ωστόσο, σε μια μικρή τυχαία δοκιμή παρουσιάστηκε η ισοδυναμία με το πλάσμα. Παρόλα αυτά, το πλάσμα αυτό δεν είναι διαθέσιμο σε όλες τις χώρες, επομένως η γνωστή κλινική εμπορεία είναι περιορισμένη. [97] Σε πολλές περιπτώσεις προτιμάται ο όγκος αντικατάστασης να αποτελείται κατά 50% από ανθρώπινη αλβουμίνη και 50% πλάσμα, καθώς φαίνεται να έχει πολύ καλά αποτελέσματα.

Η θεραπευτική πλασμαφαίρεση (ΘΠΑ) σε καθημερινή βάση, προτιμώμενη με φυγοκέντρηση (και όχι με φίλτρα), αποτελεί το βασικό άξονα της θεραπείας και έχει μειωμένο ποσοστό θνησιμότητας, το οποίο από πάνω από 90% (προ ΘΠΑ) φτάνει το 10-20% (μετά ΘΠΑ). Επιτρέπει την αφαίρεση του αυτοαντισώματος και αναπληρώνει την ADAMTS-13. Η πλασμαφαίρεση παραμένει θεραπεία εκλογής, αλλά σε περιπτώσεις που δεν είναι δυνατή η άμεση έναρξη των συνεδριών της, θα πρέπει να χορηγούνται πλάσματα (10-15ml/kg ΣΒ) [11]. Έχει αποδειχθεί πως η ΘΠΑ είναι ανώτερη της χορήγησης με πλάσμα στο τέλος του πρώτου κύκλου της θεραπείας και στους 6 μήνες (ποσοστά ανταπόκρισης 47% και 78% έναντι 25% και 49%). [25]

Η διάρκεια της ΘΠΑ και ο αριθμός των συνεδριών που απαιτούνται για την επίτευξη της ύφεσης είναι σε μεγάλο βαθμό μεταβλητές, αλλά είναι μεγαλύτερη (η διάρκεια) στην αυτοάνοση ΘΘΠ. [98] Η βέλτιστη αγωγή δεν έχει καθοριστεί. Ακόμα πιο εντατική αφαίρεση πλάσματος, όπως είναι η ΘΠΑ 2 φορές ημερησίως, απαιτείται σε πιο ανθεκτικά περιστατικά, ιδιαιτέρως αν υπάρχει και νέα συμπτωματολογία, όπως νευρολογικά ή καρδιολογικά συμβάντα. Τα οφέλη από ένα ενισχυμένο σχήμα ΘΠΑ είναι δύσκολο να τεκμηριωθούν, καθώς και άλλες θεραπείες συχνά αρχίζουν ή εντείνονται ταυτόχρονα. [99]

Οι ΘΠΑ σε καθημερινή βάση θα πρέπει να συνεχίζονται για τουλάχιστον 2 μέρες μετά την πλήρη ύφεση, που ορίζεται από την επίτευξη φυσιολογικού αριθμού αιμοπεταλίων

(>150×10<sup>9</sup>/L). Η σταδιακή μείωση της συχνότητας ή/και του όγκου της ΘΠΑ δεν έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τα ποσοστά υποτροπής. [100] Το Υπουργείο Υγείας του Ηνωμένου Βασιλείου συνιστά τη χρήση πλάσματος αδρανοποιημένου με διαλύτη/απορρυπαντικό (S/D treated plasma) [101] σε ασθενείς με ΘΘΠ για τη μείωση του κινδύνου των μεταδιδόμενων με το αίμα νοσημάτων και άλλων ανεπιθύμητων ανοσολογικών αντιδράσεων. Το πλάσμα που έχει παραχθεί με τη μέθοδο διαλύτη/απορρυπαντικού περιέχει μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης S, αλλά δεν έχει αναφερθεί αυξημένο ποσοστό θρόμβωσης σε περιστατικά όπου χρησιμοποιήθηκε η θρομβοπροφύλαξη με χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη (LMWH) και χαμηλή δόση ασπιρίνης όταν ο αριθμός των αιμοπεταλίων ήταν >50×10<sup>9</sup>/L. [102]

Η δραστηριότητα της ADAMTS-13 εντοπίζεται σε φυσιολογικές ποσότητες στο FFP, στο SD πλάσμα, στο αδρανοποιημένο με κυανό του μεθυλενίου πλάσμα (MB-FFP) και στο αδρανοποιημένο με ψωραλένιο ή ριβοφλαβίνη πλάσμα.[103] Στη Μεγάλη Βρετανία το αδρανοποιημένο με κυανό του μεθυλενίου πλάσμα από μόνο δότη, είναι εκείνο που συνιστάται για όλες τις ενδείξεις στους γεννημένους μετά την 1η Ιανουαρίου 1996 , για την ελάττωση του κινδύνου μετάδοσης των prions. [101] Ωστόσο, αυτός ο τύπος πλάσματος σχετίζεται με αυξημένο αριθμό ΘΠΑ και μεγαλύτερη διάρκεια νοσηλείας στην ΘΘΠ. [104, 105] Μια προοπτική μελέτη που συνέκρινε το αδρανοποιημένο με ψωραλένιο πλάσμα συγκριτικά με το FFP έδειξε ίση αποτελεσματικότητα και ασφάλεια. [106]

Οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις που σχετίζονται με το πλάσμα, όπως οι αλλεργικές αντιδράσεις, η αναφυλαξία και η θρόμβωση του κεντρικού φλεβικού καθετήρα, φαίνεται να είναι πιο συχνές πριν από τη χρήση του αδρανοποιημένου πλάσματος με S/D. [102]

### ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ [93]

1. Η ΘΠΑ θα πρέπει να ξεκινά με 1,5 PV, χρησιμοποιώντας πλάσμα S/D σε όλες τις ηλικιακές ομάδες και να επανεκτιμάται καθημερινά (1B).
2. Ο όγκος της ΘΠΑ μπορεί να μειωθεί στο 1,0 PV εάν η κλινική κατάσταση και οι εργαστηριακές εξετάσεις σταθεροποιηθούν. (2C)
3. Σε καταστάσεις απειλητικές για τη ζωή, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ένταση στη συχνότητα της ΘΠΑ και ο όγκος στις διαδικασίες της. (2B)
4. Η καθημερινή ΘΠΑ θα πρέπει να συνεχιστεί για τουλάχιστον 2 μέρες αφότου ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι >150×10<sup>9</sup>/L και μετά να σταματήσει. (2B).

### **1.12.1.2 Κορτικοστεροειδή**

Η χρήση των στεροειδών στη θεραπεία της ΘΘΠ, αιτιολογείται δεδομένης της αυτοάνοσης φύσης τους. Τα κορτικοστεροειδή διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη των λευκοκυττάρων και συνδέονται σε ειδικούς κυτταροπλασματικούς υποδοχείς, τροποποιώντας τη μεταγραφή και την πρωτεϊνοσύνθεση. Με αυτόν το μηχανισμό, τα κορτικοστεροειδή αναστέλλουν τη δράση των λεμφοκυττάρων, επεμβαίνουν στους μεσολαβητές ανοσολογικής απάντησης και τελικά την καταστέλλουν. Υψηλή δόση methylprednisolone (10 mg/kg/ημέρα για 3 μέρες και μετά 2.5 mg/kg/ημέρα) δύναται να είναι πιο αποτελεσματική από την καθορισμένη δοσολογία σε συμπληρωματική θεραπεία στη θεραπευτική πλασμαφαίρεση σε ασθενείς διαγνωσμένους με ΘΘΠ. [107] Τα αποτελέσματα μελετών αποδεικνύουν ότι τα στεροειδή μπορούν να έχουν μια θέση στην αντιμετώπιση της ΘΘΠ συνδυαστικά με την πλασμαφαίρεση, παρότι ο τρόπος χορήγησής τους παραμένει αμφιλεγόμενος. Ελλείπει μελετών βασισμένων σε αποδεικτικά στοιχεία (evidence-based), η εμπειρική χρήση συνδυάζει τα στεροειδή με την πλασμαφαίρεση σε έλλειψη προφανών αντενδείξεων. Ωστόσο, το επίπεδο της αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας των στεροειδών στη θεραπεία της ΘΘΠ παραμένει χαμηλό. [108]

### **1.12.1.3 Rituximab:**

Η ριτουξιμάμπη (rituximab) είναι χημιακό αντίσωμα ποντικού/ανθρώπου το οποίο στρέφεται έναντι του αντιγόνου CD20 των Β-λεμφοκυττάρων των οποίων προκαλεί λύση.[109] Αρχικά συστήθηκε σε ασθενείς με μέτρια ανταπόκριση στη συμβατική θεραπεία για ΘΘΠ (π.χ. επιδείνωση ή αντοχή (refractoriness), παρά το γεγονός ότι η πλασμαφαίρεση συνεχιζόταν καθημερινά. [110, 111] Σε 4 αναδρομικές μελέτες [112-115], σε 57 ασθενείς με ΘΘΠ χορηγήθηκε rituximab (στις περισσότερες περιπτώσεις 375 mg/m<sup>2</sup> σε 4 εβδομαδιαίες δόσεις) μετά από μέτρια απάντηση στη συνήθη θεραπεία (Πίνακας 6 και 7). Ύφεση παρατηρήθηκε στα 51 από τα 57 περιστατικά (89%) , συνήθως σε λιγότερο από 4 εβδομάδες. 6 ασθενείς δεν αποκρίθηκαν στη θεραπεία, και 3 απεβίωσαν. Σε δυο προοπτικές μελέτες [94, 116] που περιλαμβάνουν 47 ασθενείς με ανθεκτική ή επαναλαμβανόμενη ασθένεια, χορηγήθηκε rituximab 375 mg/m<sup>2</sup> για χρονικό διάστημα 2 έως 3 εβδομάδων που είχε αποτέλεσμα την ύφεση στο 98% των περιστατικών μέσα στον πρώτο μήνα διάγνωσης

(Πίνακας 6 και 7). Καμία υποτροπή δεν παρατηρήθηκε κατά τον πρώτο χρόνο παρακολούθησης, αλλά υπήρχαν υποτροπές πέραν του πρώτου έτους.

**Πίνακας 6.** Υποτροπές και ανεπιθύμητα συμβάματα μετά τη θεραπεία με rituximab κατά την οξεία φάση αυτοάνοσης ΘΘΠ, σε αναφορές με τουλάχιστον 10 ασθενείς

Σειρά (έτος)	Υποτροπή (%)	Μ.Ο. χρόνου υποτροπής (εύρος)	Μ.Ο. επιβίωσης χωρίς υποτροπή* (μήνες), (εύρος)	Σοβαρά ανεπιθύμητα συμβάματα
Scully et al (2007)[116]	0	—	10 (1-33 μήνες)	1 θανατηφόρος πνευμονία, 1 ιλαροειδές εξάνθημα
Jasti et al (2008)[112]	8	23 μήνες	48.5 (1-79 μήνες)	1 εγκάρσια μυελίτιδα και εγκεφαλίτιδα λόγω VZV
Ling et al (2009)[113]	0	—	24 (13-84 μήνες)	0
de la Rubia et al (2010)[114]	12.5	29 μήνες (7-29 μήνες)	30 (7.5-64 μήνες)	0
Scully et al (2011)[111]	10	27 μήνες (17-31 μήνες)	>12	0
Froissart et al (2012)[94]	14	24 μήνες (20-36 μήνες)	33 ± 17.4	0
Page et al (2016)[115]	12.5*	2.5 και 9.9 έτη	—	0

VZV, varicella zoster virus.

\*Δύο υποτροπές.



Οι ενδείξεις για το rituximab στην επίκτητη ΘΘΠ στην οξεία φάση, είναι αμφιλεγόμενες. Το rituximab αρχικά συνδυάστηκε με την καθημερινή πλασμαφαίρεση σε ασθενείς με μέτρια ανταπόκριση στη συμβατική θεραπεία (ανθεκτικοί ασθενείς ή ασθενείς σε επιδείνωση). Ωστόσο τα υψηλά επίπεδα ανταπόκρισης σε αυτήν τη θεραπεία παρείχαν εμπιστοσύνη στη χρήση τους και ώθησαν τους ερευνητές να το χορηγήσουν νωρίτερα για την αντιμετώπιση της νόσου. Από αυτήν την άποψη η ομάδα UK [111] ανέφερε το 2011 ότι η θεραπεία πρώτης γραμμής είχε ως αποτέλεσμα συντομότερη νοσηλεία και λιγότερες υποτροπές αργότερα σε σχέση με μια ομάδα που δεν έλαβε rituximab (Πίνακας 6 και 7). Από το Γαλλικό Δίκτυο Κέντρου Αναφοράς ΘΜΑ [94] και το Αρχείο της Oklahoma για ΘΘΠ [115, 117] σε ασθενείς οι οποίοι αντιμετωπίστηκαν με rituximab παρατηρήθηκαν λιγότερες, αλλά και μετά από μεγαλύτερο χρονικό διάστημα υποτροπές. Συνεπώς η θεραπεία πρώτης γραμμής με rituximab είναι μια λογική ένδειξη, παρότι μπορεί να εκθέσει τους ασθενείς σε υπερβολική αγωγή σε έως και 50% των περιπτώσεων. [118] Περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να καθορίσουν αν σε σοβαρότερες μορφές της νόσου (π.χ. ασθενείς με εγκεφαλικές ή /και καρδιακές επιπλοκές) το rituximab συμβάλλει στη βελτίωση της κατάστασης των ασθενών. [87]

#### ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ [93]

1. Στην οξεία ιδιοπαθή ΘΘΠ με νευρολογική / καρδιολογική συμμετοχή, τα οποία σχετίζονται με υψηλή θνησιμότητα, συνιστάται η χορήγηση rituximab κατά την εισαγωγή, σε συνδυασμό με ΘΠΑ και στεροειδή (1B).
2. Ασθενείς με ανθεκτική ή υποτροπιάζουσα αυτοάνοση ΘΠΠ θα πρέπει να λαμβάνουν rituximab (1B).

**Πίνακας 7.** Θεραπεία με rituximab στην οξεία φάση αυτοάνοσης ΘΘΠ, σε αναφορές με τουλάχιστον 10 ασθενείς.

Σειρά (έτος)	N	μ.ο. ηλικίας (έτη), εύρος	% Γ	% Y	Αριθμός χορηγήσεων rituximab, εύρος	ΠΥ (%)	Ημέρες μέχρι ΠΥ, εύρος
Scully et al (2007) <sup>94</sup>	25	43 (17-67)	76	44	4 (2-8)	100	11
Jasti et al (2008) <sup>90</sup>	12	43 (19-59)	83	8	(1-13)	83	18 (14-41)
Ling et al (2009) <sup>91</sup>	13	42 (23-71)	69	54	ΧΔ	92	ΧΔ
de la Rubia et al (2010) <sup>92</sup>	24	(24-72)	71	42	4 (1-8)	87.5	14 (7-35)
Scully et al (2011) <sup>89</sup>	40	42 (21-76)	65	15	4 (2-8)	82.5	12
Froissart et al (2012) <sup>82</sup>	22	36.8 6 11	67	14	4	82	12 6 6.7
Page et al (2016) <sup>93</sup>	16	41 (20-79)	75	0	4 (1-4)	100	21* (5-76)

ΠΥ, πλήρης ύφεση (σταθερή απάντηση στη θεραπεία για τουλάχιστον 30 ημέρες μετά τέλος των θεραπευτικών πλασμαφαιρέσεων; Γ, γυναίκες; N, αριθμός ασθενών; ΧΔ, χωρίς δεδομένα; Y, υποτροπή ασθενών (υποτροπή της νόσου >30 ημέρες μετά την απάντηση στη θεραπεία);

\*Ημέρες από την πρώτη έως την τελευταία ΘΠΑ

#### **1.12.1.4 Εναλλακτικά ανοσοκατασταλτικά**

Η βινκριστίνη (vincristine) χρησιμοποιήθηκε κυρίως στην ανθεκτική ΘΘΠ στην προ-rituximab εποχή. Σε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση 56 μελετών και 105 ασθενών, σταθερή ύφεση επετεύχθη στο 73% των ασθενών που λάμβαναν βινκριστίνη ως δευτερεύουσα θεραπεία ή θεραπεία διάσωσης (salvage therapy). [119] Σήμερα, ωστόσο, η κυκλοσπορίνη προτιμάται στην επίκτητη ΘΘΠ [120] και σαν θεραπεία πρώτης γραμμής σε συνδυασμό με την πλασμαφαίρεση. Η κλινική ανταπόκριση συσχετίζεται με τη βελτίωση στην δραστηριότητα της ADAMTS-13 και στην καταστολή των anti- ADAMTS-13 αντισωμάτων. [121]

Η κυκλοσπορίνη Α χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς σε έναν ασθενή με υποτροπιάζουσα ΘΘΠ [122], αλλά εμφανίσθηκαν περαιτέρω υποτροπές μετά τη διακοπή της θεραπείας. Σε μια κλινική δοκιμή με ΘΠΑ και χορήγηση είτε στεροειδών, είτε με κυκλοσπορίνης Α (2-3 mg/kg δύο φορές ημερησίως), η αρχική ύφεση εμφανίστηκε στο 89%, το 14% υποτροπίασε ενώ βρισκόταν υπό κυκλοσπορίνη Α, ενώ στο 33% παρατηρήθηκε υποτροπή 6 μήνες μετά από διακοπή θεραπείας με κυκλοσπορίνη Α. Κανένας από τους οκτώ ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με κυκλοσπορίνη Α δεν υποτροπίασε στις πρώτες 30 ημέρες σε σύγκριση με το 60% των ασθενών που έλαβαν στεροειδή. Συνολικά, 16/18 ασθενείς πέτυχαν ύφεση με αύξηση της δραστηριότητας ADAMTS-13 και μείωση των αντισωμάτων έναντι της ADAMTS-13. [121, 123]

Σήμερα, παρόλα αυτά, το rituximab προτιμάται στην επίκτητη ΘΘΠ και η χρήση βινκριστίνης και κυκλοσπορίνης Α παραμένει για τους ανθεκτικούς ασθενείς σε άλλες θεραπευτικές γραμμές. Με την αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα, και τη σχετική ασφάλεια του rituximab, άλλα φάρμακα που είχαν χρησιμοποιηθεί προηγουμένως σε ανθεκτικά ή υποτροπιάζοντα περιστατικά, όπως η κυκλοφωσφαμίδη, (η χρήση της οποίας συνδέεται με σοβαρές παρενέργειες, και των οποίων η αποτελεσματικότητα έχει αποδειχθεί σε μικρό αριθμό ασθενών [124, 125], δεν συνιστώνται παρά μόνο ως μέρος κλινικής δοκιμής.

#### ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ [93]

Η κυκλοσπορίνη Α μπορεί να θεωρηθεί ως θεραπεία δεύτερης γραμμής σε ασθενείς με οξεία ή χρόνια υποτροπιάζουσα επίκτητη ΘΘΠ (1C).

#### 1.12.2 Σπληνεκτομή

Η θνησιμότητα της ανοικτής σπληνεκτομής σε οξεία ΘΘΠ αναφέρθηκε ότι είναι περίπου 40%. [126] Σε μια αναδρομική σειρά 33 περιστατικών ασθενών με σπληνεκτομή για οξεία ανθεκτική και υποτροπιάζουσα νόσο, η 10ετής επιβίωση χωρίς υποτροπές ήταν 70%. [125, 127]

#### ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ [93]

Η σπληνεκτομή συνιστάται σπάνια στη μη οξεία περίοδο της αυτοάνοσης ΘΘΠ αλλά έχει περιορισμένα αποδεδειγμένα οφέλη (2C).

### 1.12.3 Αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες

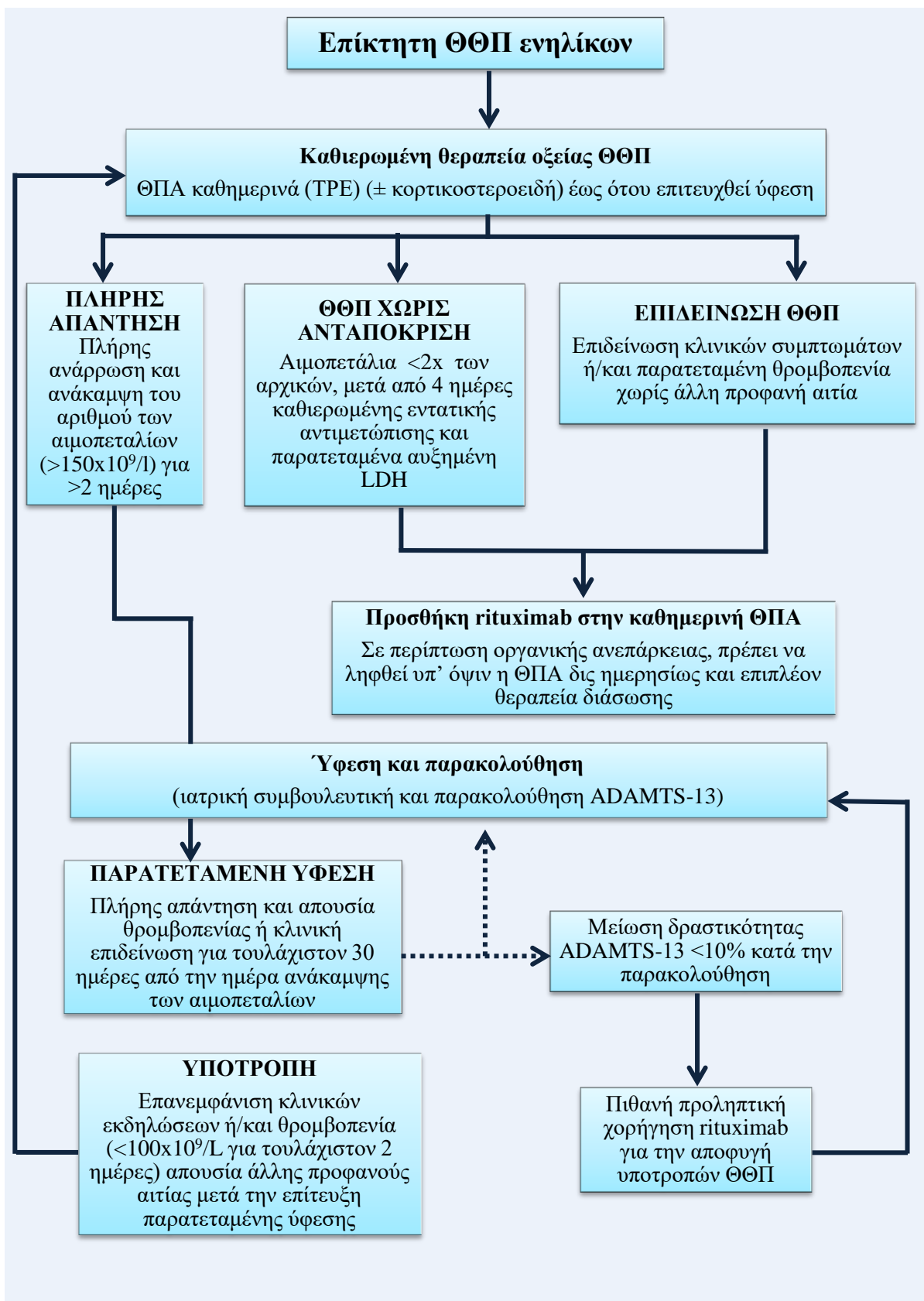
Η Italian Co-operative Group τυχαιοποίησε 72 ασθενείς με ΘΘΠ σε ΘΠΑ και στεροειδή με και χωρίς ασπιρίνη και διπυραμιδόλη. [128] Δεν υπήρχε διαφορά στο ποσοστό ανταπόκρισης ή υπερβολική αιμορραγία, καθώς και ασήμαντη μείωση ρυθμού πρόωρου θανάτου κατά τις πρώτες 15μέρες στην ομάδα που υποβλήθηκε σε αντιαιμοπεταλική αγωγή (13,5% έναντι 2,8%). [128]

#### ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ [93]

1. Η κλινική αποτελεσματικότητα των αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων στην ΘΘΠ δεν είναι αποδεδειγμένη αλλά είναι σχετικά ασφαλής (1B).
2. Μπορεί να χορηγηθεί χαμηλή δόση ασπιρίνης (75 mg OD) κατά την ανάκτηση αιμοπεταλίων (αριθμός αιμοπεταλίων  $>50 \times 10^9/L$ ) (2B).

### 1.12.4 Καινοτόμα φάρμακα

Στα επόμενα χρόνια, τα νέα φάρμακα που θα προκύψουν από την καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της ΘΘΠ προσδοκούνται να συμπληρώσουν το θεραπευτικό «οπλοστάσιο». Αυτά περιλαμβάνουν την N-acetylcysteine που παρεμποδίζει την συγκόλληση των αιμοπεταλίων στα προσδεδεμένα στο ενδοθήλιο διαλυτά μεγαλομόρια του vWF μειώνοντας το μέγεθός τους [129], η βορτεζομίμη (bortezomib), ένας αναστολέας πρωτεασώματος που στοχεύει στη μείωση των πλασματοκυττάρων [130] και την ανασυνδυσμένη ADAMTS-13 (BAX930) [131, 132], η εκτίμηση της οποίας διερευνάται (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02216084). Πρόσφατα ένας αναστολέας της γλυκοπρωτεΐνης 1b vWF (caplacizumab) αξιολογήθηκε στις μελέτες TITAN (πολυκεντρική τυχαιοποιημένη, versus placebo, φάσης II σε ασθενείς με επίκτητη ΘΘΠ) και HERCULES (πολυκεντρική μελέτη φάσης III). [133] Με το caplacizumab ο χρόνος αποκατάστασης των αιμοπεταλίων ήταν συντομότερος, και οι βιοδείκτες που αντανακλούν ισχαιμική καταστροφή τείνουν να εξομαλυνθούν πιο γρήγορα. Επιπλέον, η συχνότητα των υποτροπών μειώθηκε. Τα αιμορραγικά περιστατικά ήταν ηπιότερα. Δεδομένου ότι το caplacizumab δεν απευθύνεται στην υποκείμενη αυτοάνοση παθοφυσιολογία, σημειώθηκε μεγάλος βαθμός υποτροπής μετά τη διακοπή του για 30 μέρες μετά την τελευταία συνεδρία TPE. [133] Το caplacizumab πρόσφατα πήρα άδεια κυκλοφορίας από το FDA.



**Εικόνα 5.** Ο αλγόριθμος της θεραπευτικής προσέγγισης της επίκτητης ΘΘΠ των ενηλίκων. Η καθιερωμένη θεραπεία στην επίκτητη ΘΘΠ ενηλίκων είναι η άμεση έναρξη θεραπευτικής πλασμαφαίρεσης, άπαξ ημερησίως, ( $\pm$ κορτικοστεροειδή). Η συγκεκριμένη θεραπευτική προσέγγιση πρώτης γραμμής έχει καλή ανταπόκριση και συνήθως οδηγεί σε ύφεση του συνδρόμου, ωστόσο αυτό δεν συμβαίνει στο σύνολο των ασθενών και μάλιστα ορισμένοι παρουσιάζουν και επιδείνωση. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, έχει δοκιμαστεί η πλασμαφαίρεση δις ημερησίως και ταυτόχρονη χορήγηση rituximab. Μάλιστα, η χρήση του rituximab ως θεραπεία δεύτερης γραμμής οδηγεί σε πλήρη ύφεση του συνδρόμου. Η παρακολούθηση των ασθενών που βρίσκονται σε ύφεση (που αποτελείται από ιατρική συμβουλευτική και τακτικό έλεγχο των επιπέδων της ADAMTS-13) μπορεί να δείξει διαρκή ύφεση ή υποτροπές που απαιτούν την καθιερωμένη θεραπεία (με ποικίλα αποτελέσματα, παρόμοια με αυτά της πρωτοδιάγνωσης). Σε μερικά περιστατικά, η παρακολούθηση της ADAMTS-13 αποκαλύπτει πτώση της δραστηριότητας της ADAMTS-13  $<10\%$ , χωρίς την παρουσία κλινικών συμπτωμάτων υποτροπής. Παρόλα αυτά, επειδή ο κίνδυνος υποτροπής είναι πολύ υψηλός, ίσως θα έπρεπε να ληφθεί υπ' όψιν η προληπτική θεραπεία με rituximab.

### 1.12.5 Αντιμετώπιση της ΘΘΠ κήσης

Εάν η ΘΘΠ αναπτυχθεί στο πρώτο τρίμηνο, η τυπική θεραπευτική πλασμαφαίρεση μπορεί να επιτρέψει τη συνέχιση και ολοκλήρωση της εγκυμοσύνης. [134-137] Ο τοκετός είναι η οριστική θεραπεία επιλογής για την εγκυμοσύνη που σχετίζεται με ΘΜΑ, αν και δεν εγγυάται την εξάλειψη της ΘΘΠ. Οι εξετάσεις της ADAMTS-13 πριν τη θεραπεία μπορούν να διακρίνουν τη συγγενή και την επίκτητη ΘΘΠ από άλλες ΘΜΑ που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη. Σε προεκλαμψία και στο σύνδρομο HELLP, η δραστηριότητα της ADAMTS-13 μειώνεται (διάμεση τιμή  $31\%$  με εύρος  $12-43\%$ ), αλλά δεν ανευρίσκονται αντισώματα της ADAMTS-13.

Θα πρέπει να υπάρχει στενή επαφή με έναν μαιευτήρα-γυναικολόγο με πείρα στη θρόμβωση και την εμβρυολογία. Θα πρέπει να πραγματοποιείται τακτικός εμβρυϊκός έλεγχος με υπερηχογραφήματα doppler της μήτρας για να εκτιμηθεί εάν υπάρχει επαρκής ανάπτυξη του εμβρύου και να εκτιμηθεί η ροή αίματος στον πλακούντα.

Οι χορηγήσεις πλάσματος θα πρέπει να είναι επαρκείς σε μητέρες με συγγενή ΘΘΠ. Ωστόσο κατά τον τοκετό η θεραπευτική πλασμαφαίρεση μπορεί να είναι απαραίτητη για να διατηρηθούν επαρκή επίπεδα της ADAMTS-13. Η ιδανική συχνότητα της πλασμαφαίρεσης στην εγκυμοσύνη είναι άγνωστη. [93]

Στην επίκτητη ΘΘΠ, είναι δύσκολο να προβλεφθούν μελλοντικές υποτροπές στην εγκυμοσύνη. Η μείωση της δραστηριότητας της ADAMTS-13 (<10%) κατά την έναρξη της εγκυμοσύνης μπορεί να απαιτεί εκλεκτική θεραπεία για την πρόληψη της μικροαγγειακής θρόμβωσης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (microvascular thrombosis). Το Rituximab έχει χρησιμοποιηθεί στην εγκυμοσύνη σε αυτοάνοσες διαταραχές και σε λέμφωμα. [138]

Η διάγνωση της ΘΘΠ κύησης είναι ιδιαίτερα δύσκολη αν αναπτυχθεί μετά τον τοκετό. Σε οποιαδήποτε μητέρα με ΘΜΑ και αβεβαιότητα ως προς τη διάγνωση (και αναγνωρίζοντας ότι η προεκλαμψία και το σύνδρομο HELLP μπορεί να εμφανιστούν την περίοδο μετά τον τοκετό), θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η θεραπευτική πλασμαφαίρεση. [93]

### ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ [93]

1. Αν μια ΘΜΑ δεν μπορεί να αιτιολογηθεί πλήρως ως (μη-ΘΘΠ) ΘΜΑ κύησης, τότε η διάγνωση της ΘΘΠ θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και η ΘΠΑ να ξεκινήσει. (2B).
2. Οι μητέρες με συγγενή ΘΘΠ θα πρέπει να παρακολουθούνται σε ειδικό κέντρο και να λαμβάνουν συμπληρώματα ADAMTS-13 τακτικά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της περιόδου μετά τον τοκετό (1A).
3. Σε μητέρες με ΘΘΠ απαιτείται στενή παρακολούθηση από μαιευτήρα-γυναικολόγο με ιδιαίτερες γνώσεις πάνω στην εμβρυολογία (1A).
4. Σε μητέρες με επίκτητη ΘΘΠ, η δραστηριότητα της ADAMTS-13 θα πρέπει να παρακολουθείται καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης για την περίπτωση που χρειαστεί συμπληρωματική θεραπεία, αλλά και για την έκβασή της.
5. Η προγεννητική συμβουλευτική συνιστάται για μεταγενέστερες εγκυμοσύνες και οι γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία πρέπει να ενημερώνονται για τους δυνητικούς κινδύνους εγκυμοσύνης και των αντισυλληπτικών (2B).

### **1.12.6 Αντιμετώπιση της ΘΘΠ σχετιζόμενη με HIV λοίμωξη**

#### **ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ [93]**

1. Αν ένας ασθενής με ΘΘΠ βρεθεί ότι πάσχει από HIV λοίμωξη τότε θα πρέπει να μετρηθεί το υικό φορτίο και να παρακολουθείται στενά από εξειδικευμένο λοιμωξιολόγο (1A).
2. Η ΘΘΠ θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε άτομο θετικό για HIV μαζί με μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία και θρομβοπενία (1A).
3. Η ΘΠΑ σε συνδυασμό με τη HAART (τριπλή ή τετραπλή θεραπεία) θα πρέπει να ξεκινήσει αμέσως μόλις γίνει η διάγνωση της σχετιζόμενης με τον HIV ΘΘΠ.(1B).
4. Η HAART πρέπει να χορηγείται αμέσως μετά τη ΘΠΑ για να μεγιστοποιηθεί ο χρόνος απορρόφησης (1A).
5. Η HAART θα πρέπει να συνεχιστεί μετά την ύφεση για να αποφευχθεί περαιτέρω υποτροπή (1B).
6. Στην ανθεκτική ΘΘΠ σχετιζόμενη με τον HIV, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το rituximab (2B).

### **1.12.7 Αντιμετώπιση της ΘΘΠ σχετιζόμενη με καρκίνο και μεταμόσχευση**

#### **ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ [93]**

1. Η ΘΠΑ δεν ενδείκνυται για την αντιμετώπιση της κακοήθειας και της ΘΜΑ που σχετίζεται με τη μεταμόσχευση μυελού των οστών. (1A)
2. Σε ΘΜΑ σχετιζόμενη με κακοήθεια, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη περαιτέρω θεραπεία για την υποκείμενη νόσο (1A).



### **1.13. ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΘΘΠ**

Υποομάδα ασθενών που παρουσιάζουν ΘΘΠ οι οποίοι στη συνέχεια έχουν αργή ή μη-ικανοποιητική ανταπόκριση στη ΘΠΑ ± κορτικοστεροειδή χαρακτηρίζεται ως ανθεκτική ΘΘΠ. [93] Η ανθεκτική ΘΘΠ είχε προηγουμένως –αυθαίρετα- οριστεί ως επίμονη θρομβοπενία ή αύξηση της LDH μετά από συνολικά επτά καθημερινές ΘΠΑ. Η LDH δεν είναι, ωστόσο, αξιόπιστος δείκτης της πορείας της νόσου. Ως εκ τούτου, η ανθεκτική νόσος έχει επαναπροσδιοριστεί ως εξέλιξη κλινικών συμπτωμάτων ή επίμονη θρομβοπενία παρά τη ΘΠΑ. Η εντατικοποίηση των ΘΠΑ με συνεδρίες ανά 12-ωρο ή διπλών όγκων αφαιρέσεων και η προσθήκη περαιτέρω στεροειδών, έχουν επιφέρει ορισμένα οφέλη. [99, 139, 140] Ο σύγχρονος παράγοντας εκλογής στην ανθεκτική νόσο είναι το rituximab. [116]

Το rituximab μπορεί να μην είναι αποτελεσματικό στη θεραπεία των μη ανταποκρινόμενων ΘΘΠ τις 2 πρώτες εβδομάδες, με αναφερθείσα καθυστέρηση στην έναρξη των συμπτωμάτων/ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων που μπορεί να φτάσει τις 27 ημέρες. [94] Δεν έχει επιτευχθεί ομοφωνία σχετικά με την καλύτερη προσέγγιση για τη θεραπεία των ανθεκτικών, απειλητικών για τη ζωή ΘΘΠ. [141] Αν ο ασθενής δεν ανταποκρίνεται στη συνήθη θεραπεία με πρεδνιζολόνη και θεραπευτική πλασμαφαίρεση, η τρέχουσα τακτική είναι η αύξηση της δόσης της θεραπείας προοδευτικά, ανάλογα με την κλινική πορεία προσθέτοντας rituximab, ακολουθούμενο από πλασμαφαίρεση δυο φορές ημερησίως (1,5 όγκος πλάσματος), ώσεις κυκλοφωσφαμίδη, bortezomib ακόμα και σπληνεκτομή σε πιο σοβαρές περιπτώσεις, με συνεχώς επιτυχή αποτελέσματα παρά τη σοβαρότητα της νόσου. [99, 142]

#### **ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ [93]**

Συνιστάται η εντατικοποίηση των ΘΠΑ και η προσθήκη του rituximab στην ανθεκτική ΘΘΠ. (1B).

## **1.14 ΠΡΟΛΗΨΗ ΥΠΟΤΡΟΠΩΝ**

Υποτροπή ορίζεται το επεισόδιο οξείας ΘΘΠ  $\geq 30$  ημέρες μετά την ύφεση και εμφανίζεται στο 20-50% των περιπτώσεων [100, 139, 143]. Η Canadian Apheresis Group εκτιμά ότι κατά τη διάρκεια μιας δεκαετούς παρακολούθησης, το 36% των ασθενών θα υποτροπιάσει. [138] Οι ασθενείς με δραστικότητα της ADAMTS-13  $< 10\%$  ή με anti-ADAMTS-13 αντισώματα σε ύφεση είχαν τριπλάσια αύξηση στην υποτροπή κατά τη διάρκεια ενός έτους. [144] Σε μια άλλη μελέτη, κατά ύφεση όταν η τιμή της ADAMTS-13 ήταν  $< 5\%$ , η υποτροπή εμφανίστηκε στο 38.5%, αλλά αν η δραστικότητα της ADAMTS-13 ήταν  $> 15\%$ , μόνο το 5% υποτροπίασε. [36]

Η χρήση του rituximab σε ένα οξύ επεισόδιο μειώνει και καθυστερεί τη συχνότητα υποτροπής. [111] Όλοι οι ασθενείς θα πρέπει να συμβουλευονται σχετικά με τον κίνδυνο, τα συμπτώματα και τα σημάδια υποτροπής, πριν λάβουν εξιτήριο από το νοσοκομείο.

Σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα ΘΘΠ και όπου παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας ADAMTS 13 σε  $< 5\%$ , η εκλεκτική θεραπεία με rituximab χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία, με εξομάλυνση της δραστικότητας της ADAMTS-13. [116, 145] Οι ασθενείς χρειάζονται μακροπρόθεσμη παρακολούθηση ελέγχοντας τα επίπεδα της ADAMTS 13.

Η κάθε υποτροπή είναι δυνητικά θανατηφόρος ή μπορεί να οδηγήσει σε επιπλοκές σχετικές με την πλασμαφαίρεση ή τη νοσηλεία στη Μ.Ε.Θ. [146] Συνεπώς, η πρόληψη των υποτροπών στην ΘΘΠ αποτελεί ένα μείζονα στόχο.

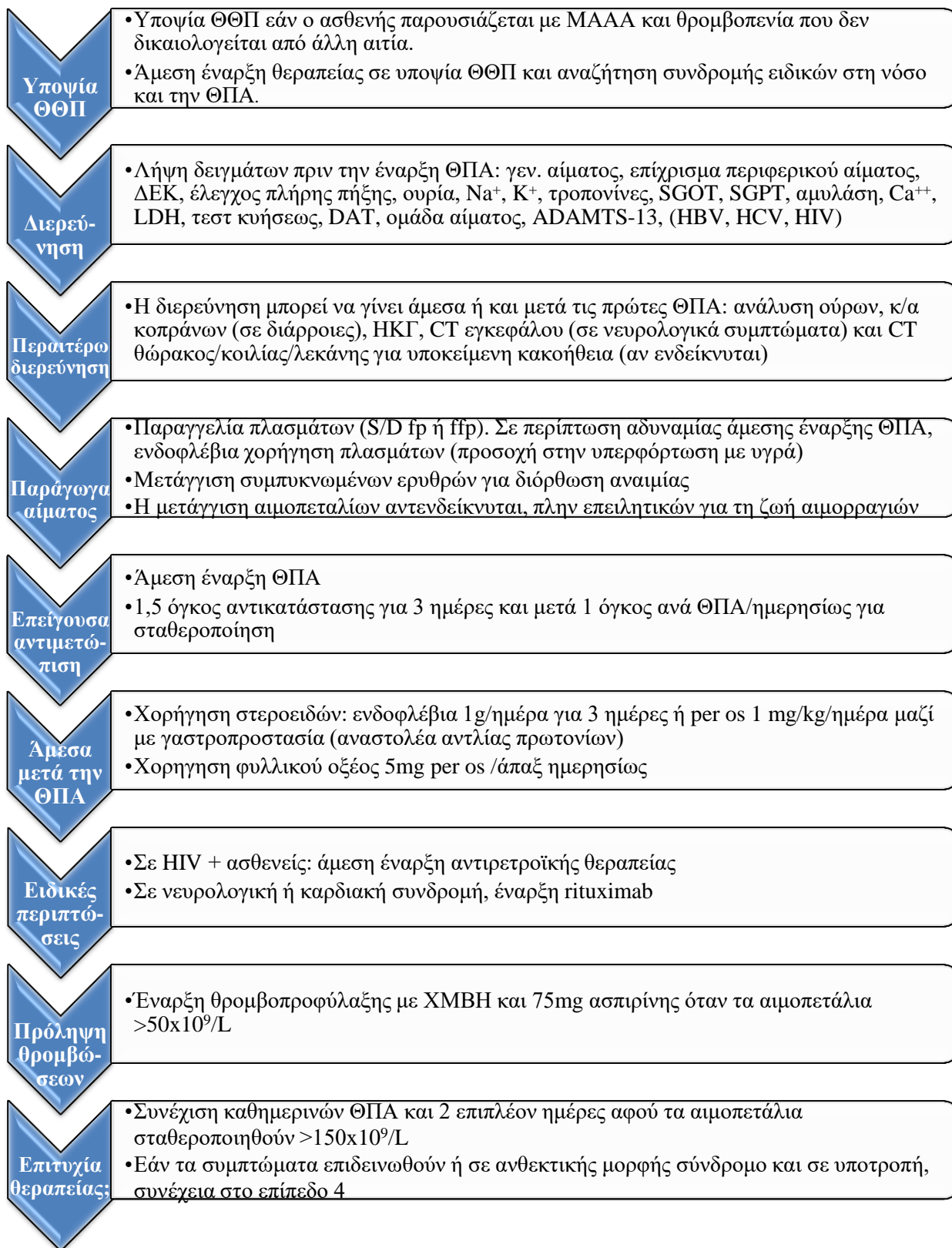
Με αυτά τα δεδομένα προκύπτει η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του rituximab στην αυτοάνοση ΘΘΠ ως προληπτική θεραπεία σε ασθενείς με κλινική ύφεση, αλλά με εμμένουσα σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13 ή σε εκείνους που η ADAMTS-13 παρακολουθείται τακτικά κατά το follow-up και παραμένει  $< 10\%$ . [91] Αποτελεί αντικείμενο προς μελέτη ότι το rituximab φαίνεται να μειώνει εντυπωσιακά τη συχνότητα για υποτροπή της ΘΘΠ, μειώνοντας την παραγωγή των anti-ADAMTS-13 αντισωμάτων και αποκαθιστώντας τη δραστικότητα της ADAMTS-13, η οποία συμπίπτει με τη μείωση των περιφερικών Β-κυττάρων. Ωστόσο στο 30% των ασθενών η αποκατάσταση της ADAMTS-13 δε διατηρείται, και απαιτούνται επιπλέον κύκλοι rituximab ώστε να διατηρηθεί σε καλά επίπεδα η δραστικότητα της ADAMTS-13. Παρότι οι πολλαπλές χορηγήσεις rituximab μπορούν να εκθέσουν τους ασθενείς σε λοιμώξεις ή άλλες μακροπρόθεσμες επιπλοκές, αυτοί

οι κίνδυνοι είναι μέχρι στιγμής ελάχιστοι. [91] Η σπληνεκτομή επίσης έχει αναφερθεί ότι μειώνει σημαντικά τις υποτροπές. [127, 147] Η σύγκριση της αποτελεσματικότητας της σπληνεκτομής έναντι του rituximab για την πρόληψη των υποτροπών, χρήζει περαιτέρω μελέτης. Στην κληρονομική ΘΘΠ (USS), οι χορηγήσεις πλάσματος είναι συνήθως επαρκείς για να αναστρέψουν τις πιθανές υποτροπές. Μόνο ορισμένοι ασθενείς με USS μπορεί να εξαρτώνται από τακτικές χορηγήσεις πλάσματος κάθε 2 έως 3 εβδομάδες. [148] Οι προφυλακτικές χορηγήσεις πλάσματος συνιστώνται επίσης σε έγκυες γυναίκες με USS για την πρόληψη υποτροπών, οι οποίες ενέχουν κινδύνους τόσο για τη μητέρα όσο και για το έμβρυο. Η θεραπεία με πλάσμα θα πρέπει να γίνει πιο εντατική για να καλύψει τους συχνότερους παράγοντες που πυροδοτούν οξεία επεισόδια ΘΘΠ σε ανήλικους ασθενείς με USS, όπως οι λοιμώξεις, οι χειρουργικές επεμβάσεις και οι εμβολιασμοί. [149] Η ανθρώπινη ανασυνδυασμένη ADAMTS-13 (rADAMTS-13) θα μπορούσε να είναι μια μελλοντική εναλλακτική θεραπεία αντικατάστασης για την κληρονομική ΘΘΠ. Μοντέλα ζώων στα οποία χρησιμοποιήθηκε η rADAMTS-13, έδειξαν υποσχόμενα αποτελέσματα. [132] Επιπλέον, μια διεθνής πολυκεντρική μελέτη φάσης I με στόχο την αξιολόγηση της ασφάλειας και της φαρμακοκινητικής της ADAMTS-13 (BAX 930) έχει ξεκινήσει σε ασθενείς με κληρονομική ΘΘΠ (Clinical Trials.gov identifier: NCT02216084).

Update: η συγκεκριμένη κλινική μελέτη βρίσκεται πλέον σε φάση III. [150]

#### ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ [93]

1. Η εντατικοποίηση των ΘΠΑ και/ ή χορήγηση rituximab είναι οι παράγοντες εκλογής στην υποτροπιάζουσα νόσο (1B).
2. Οι ασθενείς θα πρέπει να λαμβάνουν προφορικές και γραπτές οδηγίες για συμπτώματα, σημεία και κινδύνους υποτροπής πριν λάβουν εξιτήριο (1A).
3. Σε ασθενείς με σταθερή μείωση της δραστηριότητας του ADAMTS 13 <5%, συνιστάται εκλεκτική θεραπεία με rituximab (1B).



Εικόνα 6. Πορεία ενεργειών που ακολουθούνται κατά την αντιμετώπιση της ΘΘΠ

## **2. ΤΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΤΟΥ VWF (VWF MULTIMERS)**

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η αιμοστατική ισορροπία διατηρείται μέσω μιας πολύπλοκης αλληλεπίδρασης προπηκτικών, αντιπηκτικών και ινωδολυτικών παραγόντων. Ένα κύριο συστατικό του αιμοστατικού συστήματος είναι ο παράγοντας von Willebrand (vWF). Εκτεταμένες έρευνες τα τελευταία χρόνια έχουν αυξήσει την γνώση μας για τη δομή και τη λειτουργία του vWF, καθώς και τους μηχανισμούς στους οποίους βασίζεται η εμπλοκή του στη φυσιολογική αιμόσταση και στις παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με διαταραχές στην πήξη. [151]

Ο vWF είναι μια μεγάλη, εξαιρετικά κολλώδης, πολυμερική γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται κυρίως στο πλάσμα και παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μεγακαρυοκύτταρα, τα πρόδρομα κύτταρα των αιμοπεταλίων. [152-154] Ο vWF είναι πολύ σημαντικός για την αιμόσταση και το σχηματισμό του θρόμβου, δρα ως «γέφυρα» για τη φυσιολογική προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων στις θέσεις της αγγειακής βλάβης. [155] Επιπλέον, ο vWF αποτελεί ένα μόριο-φορέα για τον προπηκτικό παράγοντα VIII (FVIII), προστατεύοντας έτσι τον FVIII από ταχεία κάθαρση, αυξάνοντας έτσι την ημίσεια ζωή του στο πλάσμα. [156, 157] Με τον τρόπο αυτό, ο vWF είναι απαραίτητος τόσο για την πρωτογενή (προκαλούμενη από τα αιμοπετάλια), όσο και για τη δευτερογενή (προκαλούμενη από τους παράγοντες πήξης) αιμόσταση.

Ο vWF συντίθεται ως μια μονή προ-προ-πολυπεπτιδική αλυσίδα. Μετά την απομάκρυνση του σηματοδοτικού πεπτιδίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ο vWF διμερίζεται. Ο vWF στη συνέχεια υφίσταται περαιτέρω ωρίμανση στο trans-Golgi σύμπλεγμα και μετά στο σύμπλεγμα Golgi πολυμερίζεται. Ο νεοσυσταθείς vWF από τα ενδοθηλιακά κύτταρα είτε απελευθερώνεται απευθείας στο πλάσμα μέσω της ιδιοσυστατικής οδού (constitutive pathway) είτε αποθηκεύεται στα σωμάτια Weibel-Palade με το προπεπτίδιο του σε αναλογία 1:1. [158] Μόνο ο vWF, και όχι το προπεπτίδιο του, έχει ρόλο στην προσκόλληση αιμοπεταλίων στην επιφάνεια του ενδοθηλιακού κυττάρου. [159]

Αντιθέτως, ο vWF που συντίθεται από τα μεγακαρυοκύτταρα αποθηκεύεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων μέχρι την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την απελευθέρωσή του. Ο vWF που έχει αποθηκευτεί στα αιμοπετάλια έχει σε μεγάλο ποσοστό τη μορφή των πολυμερών υψηλού μοριακού βάρους (HMWM). [160] Ο βαθμός συμβολής του vWF από

τα ενδοθηλιακά κύτταρα ή τα αιμοπετάλια κατά την αιμόσταση, αποτελεί επί του παρόντος αντικείμενο έρευνας. [161] Θεωρείται ότι ο vWF που προέρχεται από τα αιμοπετάλια μπορεί να συμβάλλει στην αιμόσταση, αλλά δεν είναι απαραίτητο να συμβεί αυτό υπό φυσιολογικές συνθήκες. [160] Πράγματι, πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν ότι ο vWF που προέρχεται από τα αιμοπετάλια μπορεί να επιδεινώσει τις θρομβο-φλεγμονώδεις ασθένειες, όπως το εγκεφαλικό επεισόδιο. [151]

Ο vWF κυκλοφορεί υπό μορφή πολυμερών διαφόρων MB, που αναφέρονται ως πολυμερή vWF, και περιλαμβάνουν μορφές χαμηλού (L), ενδιάμεσου (I), υψηλού (H) και εξαιρετικά μεγάλου (UL) μοριακού βάρους. Ο vWF που είναι αποθηκευμένος στα σωμάτια Weibel-Palade των ενδοθηλιακών κυττάρων ή στα α-κοκκία των μεγακαρυοκυττάρων είναι πλούσιος σε πολυμερή που είναι εξαιρετικά μεγάλα και ονομάζονται UL-vWF πολυμερή. [162, 163] Τα UL-vWF πολυμερή δεν κυκλοφορούν συνήθως στο πλάσμα λόγω ταχείας πρωτεόλυσης που τα διασπά σε μικρότερα πολυμερή αμέσως μετά την έκκριση τους. (Πίνακας 8)

**Πίνακας 8. Τα πολυμερή του vWF και τα χαρακτηριστικά τους**

Πολυμερή (Μοριακό Βάρος)	Πολυμερή	Μέγεθος (kDa)	Κύρια κατανομή	Αιμοστατική δράση
Χαμηλό (Low)	1-5	500-2500	Πλάσμα	Μεταφορέας FVIII Χαμηλή δεσμευτική
Ενδιάμεσο (Intermediate)	6-10	3000-5000	Πλάσμα	συγγένεια AMΠ. Μεταφορέας FVIII
Υψηλό (High)	11-20	5500-10000	Πλάσμα	Υψηλή AMΠ-κη προσκόλληση και συσσώρευση. Μεταφορέας FVIII
Εξαιρετικά μεγάλο (Ultra Large)	>20	>10000	Αδιάσπαστη μορφή vWF αποθηκευμένη στα WPb και τα α-κοκκία	Διάσπαση σε μικρότερα πολυμερή

Από όλα τα πολυμερή του vWF, τα HMWM έχουν τη μεγαλύτερη δραστικότητα σχετικά με την αιμόσταση (ικανότητα δέσμευσης με το κολλαγόνο και τον γλυκοπρωτεϊνικό υποδοχέα των αιμοπεταλίων GP Ib και IIb / IIIa και τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων υπό συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης). [164, 165] Οποιοσδήποτε ανωμαλίες είτε στην ποσότητα είτε στην ποιότητα των πολυμερών του vWF, κυρίως των ιδιαίτερα ενεργών αιμοστατικά HMWM, δύναται να οδηγήσουν σε ανεπαρκή αιμόσταση.

## **2.1 Βιολογία του παράγοντα von Willerbrand: σύνθεση και κατανομή του μεγέθους των πολυμερών**

Ο vWF είναι μια μεγάλη πολυμερής γλυκοπρωτεΐνη που εντοπίζεται στο ανθρώπινο πλάσμα ως μία σειρά πολυμερών, που αποτελείται από έναν μεταβλητό αριθμό υπομονάδων οι οποίες συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο αριθμός των υπομονάδων σε κάθε πολυμερές ποικίλλει, με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από περίπου 500kDa για το διμερές, έως και πάνω από 10000kDa για το HMWM (Πίνακας 8, Εικόνα 7) [166, 167], σχηματίζοντας έτσι τη μεγαλύτερη γνωστή πρωτεΐνη που υπάρχει στο ανθρώπινο πλάσμα. [165] Κάθε υπομονάδα των πολυμερών του vWF έχει θέσεις πρόσδεσης για τον υποδοχέα GPIb σε μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και τον υποδοχέα GPIIb / IIIa σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια' αυτό διευκολύνει την πρόσδεση και τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, αντίστοιχα, καθιστώντας το πολυμερές HMWM σημαντικό για τη φυσιολογική λειτουργία των αιμοπεταλίων.

Το ανθρώπινο γονίδιο για το vWF βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 12 και αποτελείται από 178-180 κιλοβάσεις και 52 εξώνια. [168-170] Το γονίδιο του vWF κωδικοποιεί ένα μεγάλο πρόδρομο πολυπεπίδιο (προ-προ-vWF) που αποτελείται από ένα σηματοδοτικό πεπίδιο 22 αμινοξέων, ένα προπεπίδιο 741 αμινοξέων (επίσης γνωστό ως αντιγόνο II του vWF) και μια ώριμη (240-260kDa) υπομονάδα (βασικό μονομερές) 2050 αμινοξέων και έως 22 πλευρικές αλυσίδες υδατάνθρακα. [171]

Μετά τη σύνθεσή της, η πρόδρομη μορφή του vWF υπόκειται σε επεξεργασία προς δημιουργία μιας ώριμης υπομονάδας ή μονομερούς του vWF 220 kDa. Τα μονομερή αυτά υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως γλυκοζυλίωση, διμερισμό και στη συνέχεια πολυμερισμό και διάσπαση του προπεπτιδίου, με αποτέλεσμα να προκύψουν

πεπτίδια του vWF με έως και 40 ίδιες υπομονάδες (οι οποίες αποτελούν το σύνολο των κυκλοφορούντων πολυμερών του vWF), και πεπτίδια άνω των 10000kDa (εξαιρετικά μεγάλα πολυμερή) για τα αποθηκευμένα πολυμερή (Πίνακας 8, Πίνακας 9). [166, 167]

Μετά τη σύνθεσή τους, περίπου το 95% των ενδοθηλιακών πολυμερών του vWF (L, I και HMWM) εκκρίνονται ιδιοσυστατικά στο πλάσμα, ενώ τα υπόλοιπα (εξαιρετικά μεγάλου μοριακού βάρους πολυμερή - UL) αποθηκεύονται στα κυτταροπλασματικά κοκκία (σωμάτια Weibel-Palade) και στα α-κοκκία των μεγακαρυοκυττάρων. [172] Τα διμερή και τα πολυμερή μικρότερου μοριακού βάρους του vWF που προέρχονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν είναι πολύ αποτελεσματικά στην έναρξη της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε θρομβογενείς επιφάνειες υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ωστόσο, τα HMWM είναι πιο αποτελεσματικά για την προαγωγή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων, ιδιαίτερα μετά τη βλάβη του αγγείου και την επακόλουθη υψηλή διατμητική τάση. [173, 174]

Τα μεγαλύτερα αποθηκευμένα πολυμερή του vWF (εξαιρετικά μεγάλα πολυμερή - UL) μπορούν να εκκρίνονται στο πλάσμα μέσω μιας ρυθμιζόμενης οδού μετά από διέγερση από συγκεκριμένες εκκριτικές ουσίες. [172] Διάφορα ερεθίσματα για την απελευθέρωση αυτών των UL-vWF πολυμερών έχουν ανιχνευθεί μέσω της μελέτης καλλιέργειών κυττάρων και αιμοπεταλίων, και περιλαμβάνουν έκθεση σε φυσιολογικούς και φαρμακευτικούς παράγοντες όπως: αδρεναλίνη, διφωσφορική αδενοσίνη, κολλαγόνο, ινώδες, ισταμίνη, θρομβίνη, πρωτεΐνες συμπληρώματος και δεσμοπρεσίνη (DDAVP). [175, 176]

Τα πολυμερή UL-vWF που απελευθερώνονται από τα σωμάτια Weibel-Palade σχηματίζουν τους ισχυρότερους δεσμούς με τα αιμοπετάλια και την εξωκυττάρια ουσία [172] (Πίνακας 8). Μετά την απελευθέρωση του vWF, μερικά ενδοθηλιακά πολυμερή του, παραμένουν προσδεδεμένα στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, σχηματίζοντας δομές που μοιάζουν με χορδές, οι οποίες, υπό φυσιολογική ροή, επιμηκύνουν τα πολυμερή vWF από τη σφαιροειδή μορφή τους σε μορφή που μοιάζει με χορδή, εκθέτοντας έτσι τη θέση διάσπασης στην A2 επικράτεια της μεταλλοπρωτεάσης ADAMTS-13. [16, 177] Υπό συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης, οι δεσμευμένες σειρές των UL-vWF στο ενδοθήλιο, διασπώνται πολλές φορές από την ADAMTS-13 σε μικρά πολυμερή, τα οποία ωστόσο παραμένουν πολύ μεγάλα σε μέγεθος, υποδηλώνοντας ότι ο vWF υφίσταται περαιτέρω πρωτεόλυση στην κυκλοφορία που προκαλείται από την ADAMTS-13. [16, 178] Αυτή η περαιτέρω επεξεργασία των UL-vWF πολυμερών από την ADAMTS-13 καταλήγει στη



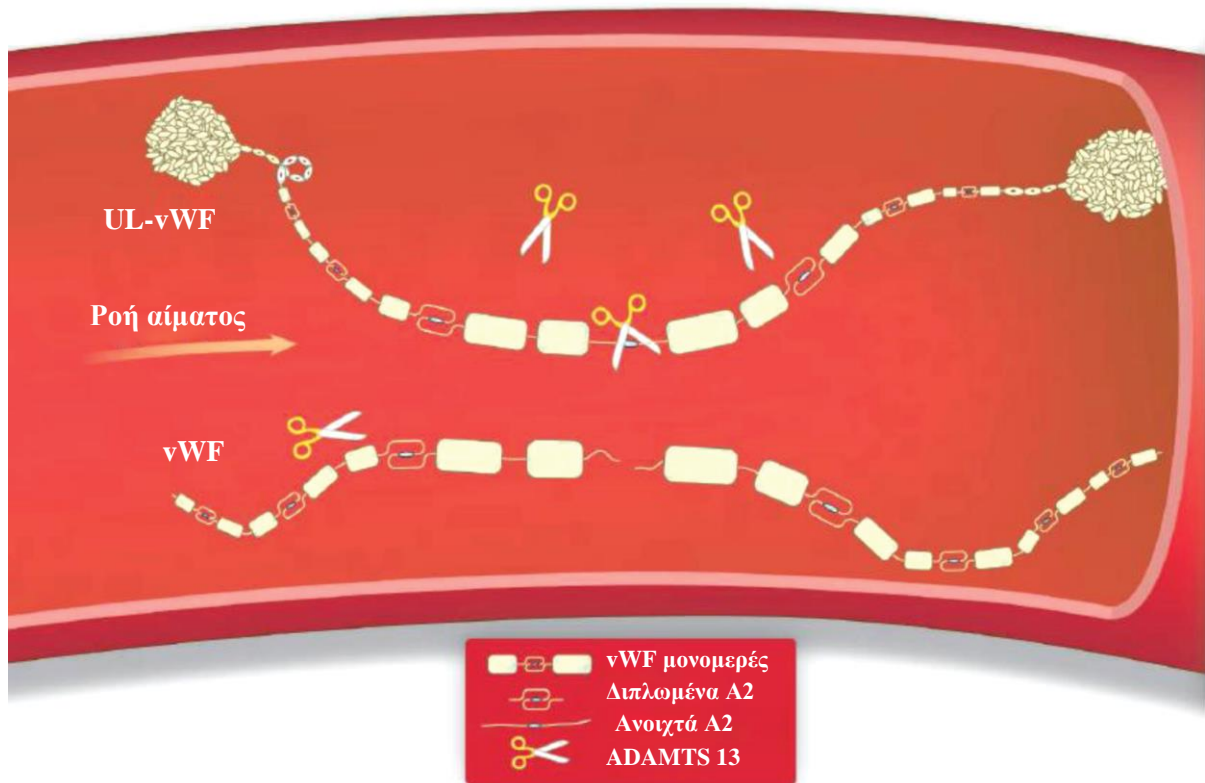
δημιουργία πολυμερών του vWF διαφορετικών μεγεθών που είναι χαρακτηριστικά της κυκλοφορούσας δεξαμενής vWF, που κυμαίνεται από ένα μόνο διμερές έως και 20 διμερή (10000 kDa) (εικόνα 7). [179-181]

**Πίνακας 9:** Τα χαρακτηριστικά του παραγόμενου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και από τα αιμοπετάλια vWF.

Μοριακό Βάρος (kDa)	Πλάσμα	Ενδοθήλιο	Αιμοπετάλιο	Αιμοστατική δράση
<b>Εξαιρετικά μεγάλο (&gt;10000)</b>	-	+	+	++++ (παθολογική)
<b>Μεγάλο (5500-10000)</b>	+	-	+	+++
<b>Ενδιάμεσο (3000-5000)</b>	+	-	+	++
<b>Χαμηλό (500-2500)</b>	+	-	+	+

Ο vWF από τα ενδοθηλιακά κύτταρα είτε απελευθερώνεται απευθείας στο πλάσμα, όπου κυκλοφορεί ως πολυμερή vWF χαμηλού, ενδιάμεσου ή μεγάλου μοριακού βάρους, ή αποθηκεύεται στα σωμάτια Weibel-Palade, κυρίως ως πολυμερή vWF εξαιρετικά μεγάλου μοριακού βάρους (UL). Τα UL πολυμερή του vWF αποθηκεύονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και συνήθως δεν κυκλοφορούν στο πλάσμα, όπου εμφανίζονται μόνο μετά από ρυθμισμένη απελευθέρωση από αγωνιστές. Ο vWF που προέρχεται από τα αιμοπετάλια είναι πλούσιος σε πολυμερή που είναι εξαιρετικά μεγάλα και ονομάζονται UL-vWF πολυμερή. Η δραστηριότητα του vWF εξαρτάται από το βαθμό και το είδος του πολυμερισμού.

Έχει προταθεί και ένας εναλλακτικός μηχανισμός για την επιμήκυνση των πολυμερών UL-vWF. [182] Πριν από τη διάσπαση από την ADAMTS-13, οι σειρές («χορδές») του vWF υφίστανται τοπική επιμήκυνση μεταξύ των προσκολλημένων αιμοπεταλίων στην ενδοθηλιακή επιφάνεια. [182] Η επιμήκυνση συμβαίνει σε διαφορετικές θέσεις κατά μήκος των σειρών του vWF και είναι ανεξάρτητη από την ADAMTS-13, υποδηλώνοντας ότι αυτό είναι ένα γενικό χαρακτηριστικό των περισσότερων σειρών του vWF υπό συνθήκες διάτμησης. [182]



**Εικόνα 7:** Κάθαρση των εξαιρετικά μεγάλου μοριακού βάρους πολυμερών (UL) του vWF. Τα πολυμερή UL του vWF εκκρίνονται ως εξαιρετικά μακριές αλυσίδες που αποτελούνται από πολλές εκατοντάδες μονομερή του vWF. Τα πολυμερή αυτά εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους τους, υφίστανται υψηλότερη διατμητική τάση από τα μικρότερα πολυμερή του vWF. Αυτές οι υψηλές διατμητικές τάσεις προκαλούν έκταση («τεντώμα») και ξετύλιγμα της A2 επικράτειας των μονομερών του vWF. Η A2 επικράτεια είναι η θέση στην οποία η μεταλλοπρωτεάση ADAMTS-13 κόβει τα UL-vWF σε μικρότερα πολυμερή, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να «τεντωθούν» (ενεργοποιηθούν) κάτω από συνθήκες διάτμησης που βρίσκονται σε σημεία τραυματισμού, αλλά δεν προκαλούν θρόμβωση μέσω πρόωρου τεντώματος υπό φυσιολογικές συνθήκες ροής αίματος. Έτσι, οι μηχανικές διατμητικές δυνάμεις ρυθμίζουν τόσο την ενεργοποίηση όσο και την αποικοδόμηση των αλυσίδων vWF.

## **2.2 Φυσιολογία των πολυμερών υψηλού μοριακού βάρους του vWF: ο ρόλος στην αιμόσταση και η σημασία του μεγέθους των πολυμερών**

Οι θέσεις της σύνθεσης και της αποθήκευσης του vWF μας προσφέρουν στοιχεία για το ρόλο της γλυκοπρωτεΐνης αυτής στην πρωτογενή αιμόσταση - ένας ρόλος στενά συνδεδεμένος με αυτόν των αιμοπεταλίων. [164] Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα πολυμερή του vWF κυκλοφορούν στο αίμα ως μια χαλαρά περιτυλιγμένη πρωτεΐνη που δεν αλληλεπιδρά με τα αιμοπετάλια ή με το τοίχωμα των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς η περιοχή δέσμευσης GPIb του vWF είναι καλυμμένη. [183, 184] Ωστόσο, ως απάντηση στον αγγειακό τραυματισμό ή στην υψηλή διατμητική τάση, ο vWF ξετυλίγεται, εκθέτοντας τις θέσεις πρόσδεσης του εντός της A1 επικράτειας που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με το GPIIb των αιμοπεταλίων. [185]

Το αιμοστατικό δυναμικό των πολυμερών του vWF εξαρτάται από το μέγεθος τους. [186] Μελέτες έχουν δείξει ότι καθώς το μέγεθος των πολυμερών του vWF μειώνεται προοδευτικά, σημειώνεται και συνακόλουθη απώλεια της λειτουργίας του vWF. [187] Ειδικότερα, η ικανότητα δέσμευσης του vWF με το κολλαγόνο (vWF:CB) και η λειτουργική ικανότητα του vWF να δεσμεύει τα αιμοπετάλια (δραστικότητα συμπαράγοντα ριστοσεΐνης vWF:RCo) μειώνεται καθώς μειώνεται το μέγεθος των πολυμερών του vWF. [167] Πιο πρόσφατα, η ανάλυση των πολυμερών ανασυνδυασμένου vWF υποδηλώνει ότι υπάρχει επίσης μια διαβάθμιση της ικανότητας σύνδεσης vWF:FVIII (FVIIIb) σύμφωνα με το μέγεθος του πολυμερούς, με μια σταδιακή μείωση του FVIIIb που επιδεικνύεται με πολυμερή μικρότερου μοριακού βάρους. [188] Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε λιγότερες θέσεις πρόσδεσης των μικρότερων πολυμερών και χαμηλότερη συγγένεια σύνδεσης μεταξύ των χαμηλού μοριακού βάρους πολυμερών και των αιμοπεταλίων, μειώνοντας τόσο την προσκόλληση των αιμοπεταλίων όσο και τη συσσώρευσή τους. [189] Αντίστροφα, τα πολυμερή HMWM είναι βάσει διαμόρφωσης πιο ευαίσθητα στο διατμητικό στρες, καθιστώντας πιο εύκολο το ξεδίπλωμα της μακράς αλυσίδας τους, καθώς και την έκθεση σε περισσότερες θέσεις δέσμευσης στον υποδοχέα GPIIb.

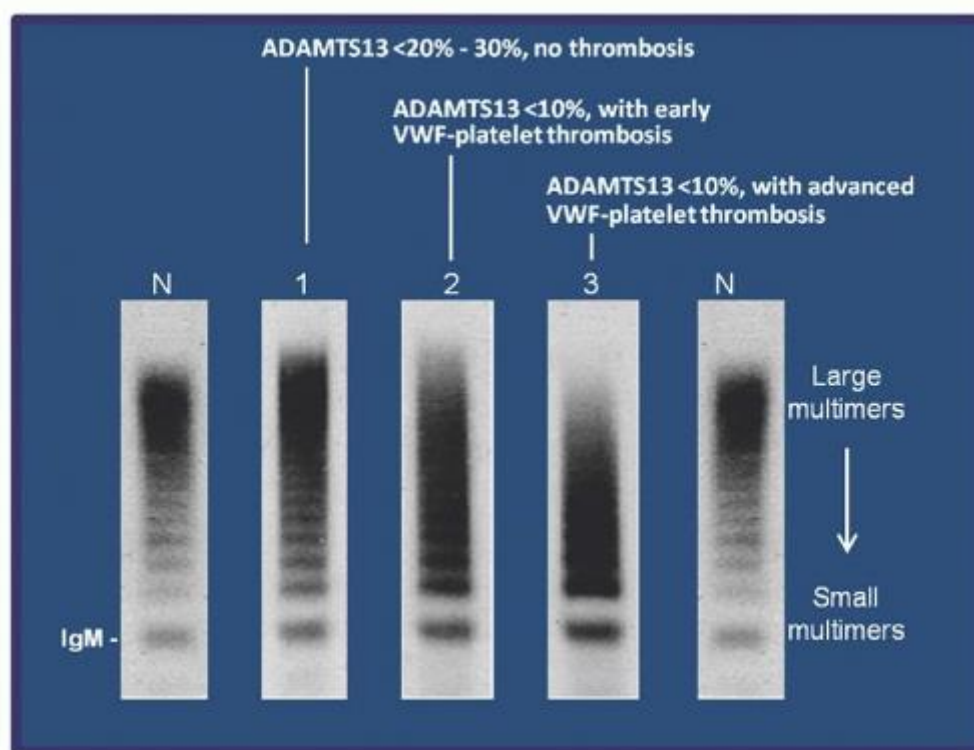
Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι έχει διεξαχθεί πρόσφατη δια-εργαστηριακή αξιολόγηση για τη σύγκριση της ευαισθησίας των προσδιορισμών του vWF βάσει της δραστικότητάς του, διερευνώντας τα αποτελέσματα τους μετά από προοδευτική έλλειψη των πολυμερών. [190] Αυτή η μελέτη έδειξε διαφορές στις ευαισθησίες των αντίστοιχων δοκιμασιών που χρησιμοποιήθηκαν: Οι δοκιμασίες vWF:CB και vWF:RCο είχαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην απώλεια των πολυμερών HMWM από ό, τι η δοκιμασία vWF:Act (δραστικότητα). [190]

Η ρύθμιση του μεγέθους των πολυμερών του vWF από την ADAMTS-13 είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική αιμοστατική λειτουργία, όπως αποδεικνύεται από τις παθολογικές καταστάσεις που προκύπτουν όταν η πρωτεόλυση του vWF είναι ελαττωματική: σε περιπτώσεις υπερβολικής πρωτεόλυσης του vWF από την ADAMTS-13, η αιμόσταση επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό λόγω της απουσίας των πολυμερών HMWM, με αποτέλεσμα την νόσο vWD τύπου 2A. Αντίθετα, η ανεπάρκεια της ADAMTS-13 έχει ως αποτέλεσμα μια ανώμαλη συσσώρευση των πολυμερών εξαιρετικά μεγάλου μοριακού βάρους, δηλαδή τα πολυμερή UL-vWF, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν αυτόματη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, οδηγώντας σε ΘΘΠ. [191]

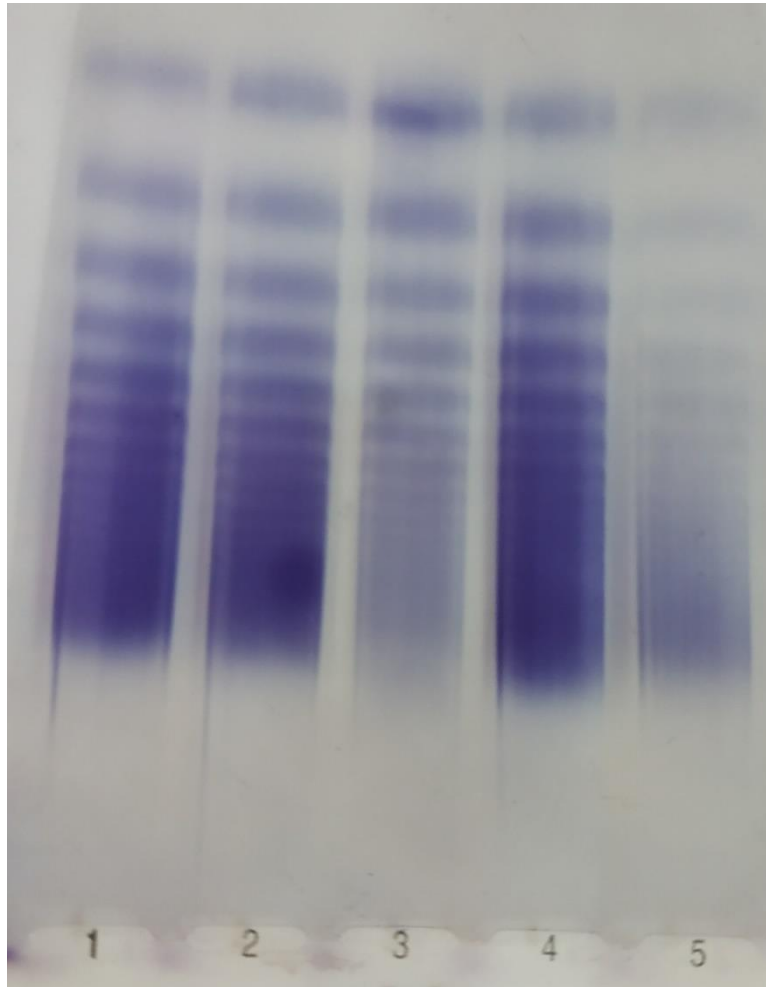
Εκτός από το ρόλο του στην πρωτογενή αιμόσταση, ο vWF διαδραματίζει επίσης ρόλο στη δευτερογενή αιμόσταση, που ενεργεί ως πρωτεΐνη-φορέας για τον FVIII στο πλάσμα. Ο σχηματισμός ενός συμπλέγματος vWF/FVIII σταθεροποιεί και προστατεύει την πηκτική δράση του FVIII. [151]

## 2.3 Τα πολυμερή vWF στη ΘΘΠ

Οι ανωμαλίες στα πολυμερή vWF είναι κοινές στη ΘΘΠ [192]. Το μέγεθος των πολυμερών vWF αλλάζει ταχέως κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης, αντανακλώντας την εξελισσόμενη ισορροπία μεταξύ της μειωμένης πρωτεόλυσης vWF, η οποία αυξάνει το μέγεθος του vWF και την αυξημένη δέσμευση των αιμοπεταλίων, τα οποία καταναλώνουν τα μεγάλα πολυμερή. Σε μια τυπική περίπτωση ΘΘΠ, μεγάλα πολυμερή vWF συχνά εξαντλούνται κατά το χρόνο της αρχικής οξείας φάσης (Εικόνα 8 και 9).



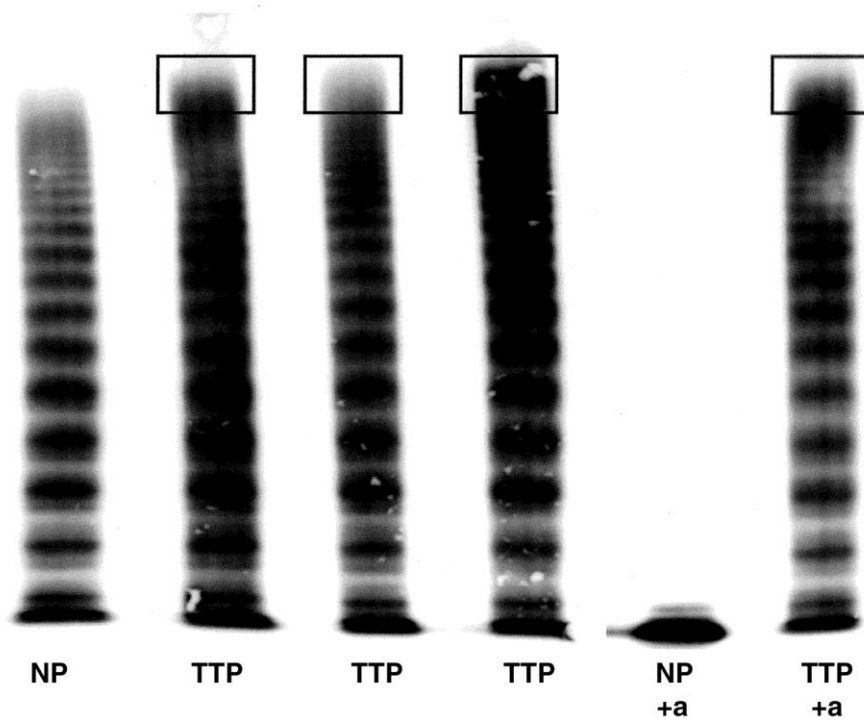
**Εικόνα 8:** Οι ανωμαλίες του vWF στη θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα αντανακλούν την ισορροπία της υποκείμενης ανεπάρκειας ADAMTS-13 και της σύνδεσης των αιμοπεταλίων με το vWF. Στη ΘΘΠ ανιχνεύονται τρεις τύποι ανωμαλιών vWF κατά τη διάρκεια της πορείας του συνδρόμου: Strip 1: Μετατόπιση του vWF σε πολύ μεγάλες μορφές συμβαίνει όταν η δραστηριότητα της ADAMTS-13 είναι <20% -30%. Strip 2: Τα εξαιρετικά μεγάλα και μεγάλα πολυμερή μειώνονται όταν η ADAMTS-13 είναι <10% και αρχίζει να παρατηρείται συσσώρευση αιμοπεταλίων-vWF. Strip 3: Τα εξαιρετικά μεγάλα πολυμερή εξαντλούνται και τα μεγάλα πολυμερή μειώνονται περαιτέρω σε ασθενείς που παρουσιάζουν εκτεταμένη θρόμβωση και σοβαρή θρομβοπενία.



**Εικόνα 9:** Ανάλυση πολυμερών vWF στο εργαστήριο αιμόστασης ΓΝΑ «Λαϊκό». Στα strips 1 και 2 απεικονίζονται τα πολυμερή σε υγιή άτομα. Στο strip 3 ασθενής με ΘΘΠ στην οξεία φάση (κατανάλωση πολυμερών vWF) και στο strip 4 ο ίδιος ασθενής σε ύφεση. Στο strip 5, ασθενής με νόσο vW (σχεδόν πλήρης απουσία πολυμερών vWF)

Η σοβαρότητα της εξάντλησης επηρεάζεται από τη σοβαρότητα και τη διάρκεια της θρομβοπενίας. Όταν ο ασθενής τίθεται υπό πλασμαφαιρέσεις, τα αυξανόμενα επίπεδα ADAMTS-13 καταστέλλουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων-vWF, οδηγώντας σε αύξηση του αριθμού αιμοπεταλίων και εμφάνιση εξαιρετικά μεγάλων πολυμερών vWF. Πολύ μεγάλα πολυμερή ενδέχεται να μην ανιχνευθούν εάν η ADAMTS-13 αυξηθεί γρήγορα σε >20-30% του φυσιολογικού. Τέτοιες σειριακές αλλαγές υποδηλώνουν ότι τα πολύ μεγάλα πολυμερή vWF δεν είναι η αιτία θρόμβωσης, απλώς αντανακλούν την ανεπαρκή πρωτεόλυση του vWF σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα ADAMTS-13. [193]

Σε έλλειψη ADAMTS-13 κληρονομικής αιτιολογίας (USS), παρατηρείται μόνιμη παρουσία UL-vWF πολυμερών στο πλάσμα ασθενών (εικόνα 10), τα οποία παρουσία κάποιου μηχανισμού πυροδότησης θα προκαλέσουν συσσώρευση και προσκόλληση αιμοπεταλίων στη μικροκυκλοφορία με επακόλουθη μικροαγγειοπάθεια, που τελικά θα οδηγήσει σε οργανική ανεπάρκεια και θάνατο αν δεν αντιμετωπιστεί εγκαίρως. [194]



**Εικόνα 10:** Εξαιρετικά μεγάλα πολυμερή vWF σε 3 αδέλφια με ΘΘΠ και κληρονομική ανεπάρκεια ADAMTS13 σε σύγκριση με το φυσιολογικό πλάσμα (NP). Η ενεργοποίηση της ADAMTS13 σε φυσιολογικό πλάσμα (NP + α) έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη πρωτεολυτική διάσπαση πολυμερών vWF, ενώ το vWF στον ασθενή με ΘΘΠ (TTP + α) παραμένει αμετάβλητο λόγω της έλλειψης ADAMTS13.

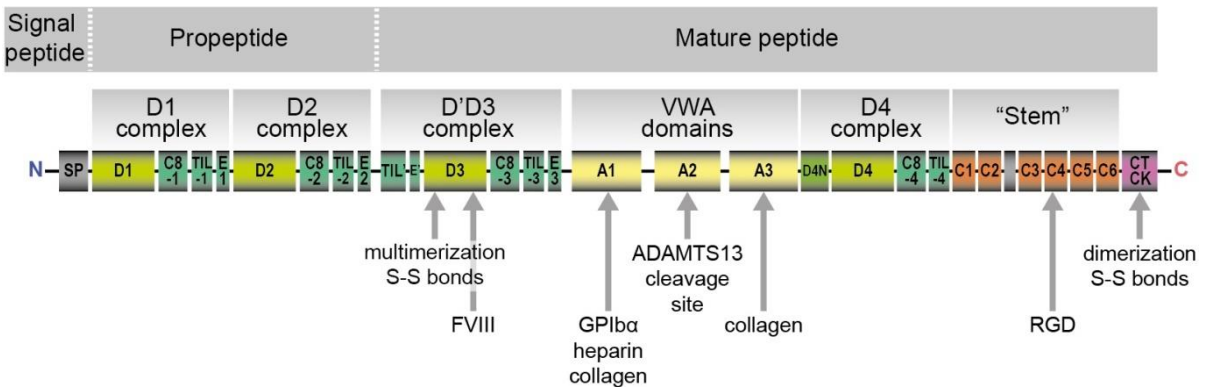
### **3. ΠΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VON WILLEBRAND (VWF-PP)**

#### **3.1 Ιστορική προοπτική: ταυτοποίηση του προπεπτιδίου του παράγοντα vonWillebrand (vWFpp)**

Ιστορικά, ο vWF είναι γνωστός και ως "αντιγόνο του παράγοντα VIII" (ή FVIII<sub>Ag</sub>). [195] Το vWFpp αρχικά ταυτοποιήθηκε από τους Montgomery και Zimmerman το 1978 ως ένα δεύτερο αντιγόνο του παράγοντα von Willerbrand (vW AgII) [196] το οποίο βρισκόταν σε έλλειψη στα αιμοπετάλια και το πλάσμα των ασθενών με βαριά νόσο von Willerbrand. Το vWFpp απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια κατά την ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης, επιδεικνύοντας την παρουσία του τόσο στα αιμοπετάλια, όσο και στο πλάσμα. Ο vWF και το vWFpp αποδείχθηκαν ανοσολογικά , οδηγώντας στο (πρόωρο) συμπέρασμα ότι οι δύο πρωτεΐνες δεν μοιράζονται μια σχέση πρόδρομης ουσίας – τελικού προϊόντος. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι το vWFpp εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια, μαζί με τον vWF. [197, 198]

Η κλωνοποίηση ακολουθιών πλήρους μήκους συμπληρωματικού DNA του ανθρώπινου vWF, αποκάλυψε την παρουσία μιας «προ-αλληλουχίας» που εκτιμήθηκε ότι ήταν ταυτόσημη με το vWFpp. [199, 200] Η αλληλούχιση (sequencing) του vWFpp και μιας κυκλοφορούσας γλυκοπρωτεΐνης 100 kDa του πλάσματος, αποδείχθηκε πως είναι ταυτόσημη με τις αλληλουχίες αμινοξέων που προβλέφθηκαν από το συμπληρωματικό κλώνο DNA που κωδικοποιεί το 5 'άκρο του vWF. [201] Η μελέτη αυτή επιβεβαιώνει πως το vWFpp είναι ένα μεγάλο προπεπτιδίο που διασπάται από το pro-vWF κατά τη διάρκεια ενδοκυτταρικών επεξεργασιών και στη συνέχεια απελευθερώνεται στο πλάσμα. Ο καθορισμός της ακολουθίας πλήρους μήκους του vWF και η ταυτοποίηση του vWFpp οδήγησαν σε περαιτέρω βιολογικές και κλινικές μελέτες (εικόνα 11).





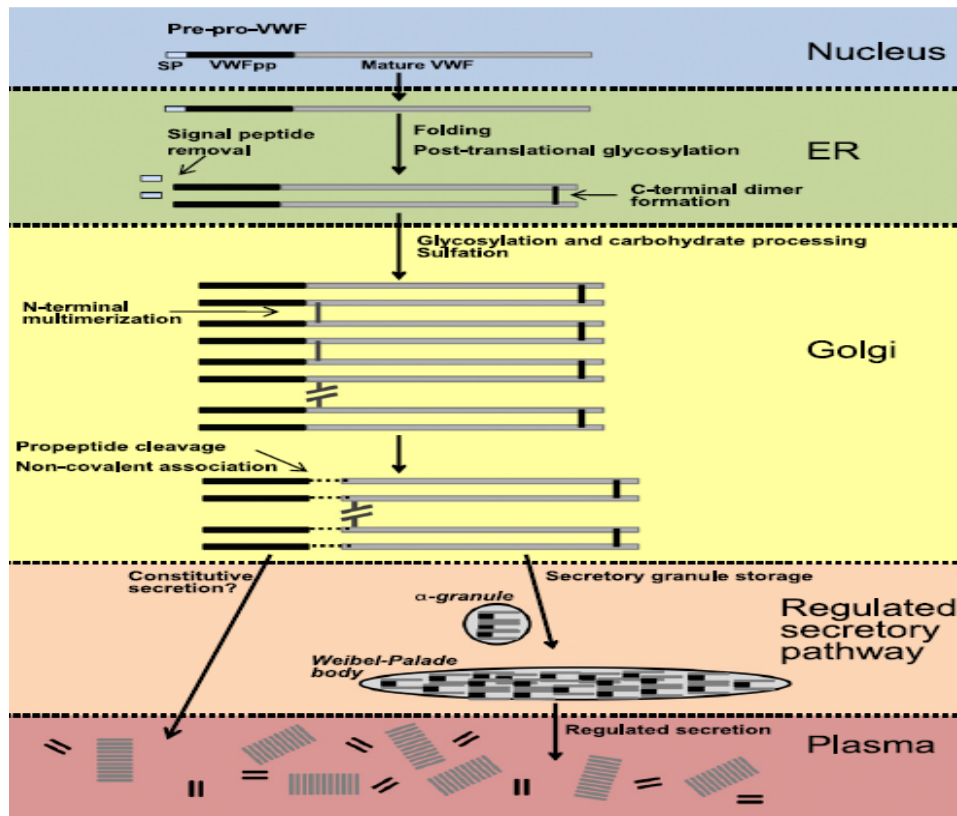
**Εικόνα 11:** Η δομή πολλαπλών τομέων του vWF. Είναι εμφανείς οι διάφορες λειτουργικές θέσεις για διμερισμό, αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών, πρωτεολυτική διάσπαση και άλλες, πολλές από τις οποίες είναι ευαίσθητες στη διατμητική τάση.

### 3.2 Χρόνος ζωής του vWF και του vWFpp

Ο vWF υπόκειται σε εκτεταμένες ενδοκυτταρικές διαδικασίες. [202] Μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) όπου το σηματοδοτικό πεπτίδιο αφαιρείται, η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται και σχηματίζονται δισουλφιδικοί δεσμοί που περιλαμβάνουν την πλειονότητα των 234 καταλοίπων κυστεΐνης του vWF (Εικόνα 12). Ο vWF γλυκοζυλιώνεται μετά-μεταφραστικά (posttranslationally) στις θέσεις της 17 αμινο-συνδεδεμένης γλυκοζυλίωσης (4 στο vWFpp και 13 στην ώριμη πρωτεΐνη vWF). [203] Προτού εγκαταλείψει το ενδοπλασματικό δίκτυο, ο vWF σχηματίζει ένα καρβοξυ-τελικό (C-τελικό) διμερές. Στο σύμπλεγμα Golgi, προστίθενται 10 O-συνδεδεμένες γλυκάνες, οι υδατάνθρακες υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία και λαμβάνει χώρα η διαδικασία της θείωσης. Τα C-τελικά διμερή σχηματίζουν αμινο-τελικά πολυμερή με μεταβλητό μοριακό βάρος, που κυμαίνεται από 500 έως 20.000 kDa. Το vWFpp διασπάται από τον ώριμο vWF με φουρίνη, αν και οι δυο πρωτεΐνες παραμένουν μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες. [204, 205] Ο vWF και τα vWFpp «πακετάρονται» στα ρυθμιστικά εκκριτικά σωμάτια Weibel-Palade (WPBs) στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα α-κοκκία των μεγακαρυοκυττάρων/αιμοπεταλίων. [206, 207]

Αν και οι αρχικές αναφορές σχετικά με την έκκριση vWF αναφέρονται τόσο στη συστατική (constitutive) όσο και στη ρυθμισμένη (regulated) έκκριση vWF, πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η ρυθμισμένη έκκριση από τα WPBs των ενδοθηλιακών κυττάρων μπορεί να είναι η κύρια οδός για την απελευθέρωση vWF και vWFpp στο

πλάσμα. [208] Στο πλάσμα, ο vWF και το vWFpp διαχωρίζονται και κυκλοφορούν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Το vWF δεσμεύει τον FVIII στο πλάσμα, προστατεύοντάς το από την αποδόμησή του. Ο vWF μπορεί να δεσμεύεται στο κολλαγόνο του εκτεθειμένου υπενδοθηλίου, να δεσμεύεται στα αιμοπετάλια στα σημεία του τραύματος, να προάγει την αλληλεπίδραση μεταξύ των αιμοπεταλίων, να αυτο-συνδέεται (self-associate) και να αποικοδομείται από την ADAMTS-13. [209, 210] Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την κάθαρση των vWF και vWFpp δεν είναι καθορισμένοι σαφώς και αποτελούν ενεργούς τομείς έρευνας. [211, 212]



**Εικόνα 12:** Ενδοκυτταρική επεξεργασία vWF. Ο vWF είναι μεταγράφεται ως προ-προ-vWF (πυρήνας, μπλε) και μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (πράσινο), όπου υφίσταται απομάκρυνση του πεπτιδίου σήματος, γλυκοζυλίωση και σχηματισμό διμερούς. Στο σύμπλεγμα Golgi (κίτρινο) προστίθενται O-συνδεδεμένες γλυκάνες, οι υδατάνθρακες επεξεργάζονται περαιτέρω, το vWF υπόκειται σε θείωση και πολυμερίζεται και το προπεπτίδιο διασπάται από το ώριμο vWF αλλά παραμένει μη ομοιοπολικά συνδεδεμένο. Ο vWF διακινείται προς τη ρυθμιζόμενη εκκριτική οδό (πορτοκαλί) και αποθηκεύεται στα σωμάτια WP ή στα α-κοκκία πριν από την απελευθέρωσή του στο πλάσμα (κόκκινο), όπου vWFpp και vWF διαχωρίζονται και κυκλοφορούν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο.

### 3.3 Ο ρόλος του vWFpp στον πολυμερισμό του vWF

Το προπεπτίδιο του vWF είναι απαραίτητο για την κατάλληλη ενδοκυτταρική επεξεργασία και τον πολυμερισμό του vWF. Η σύσταση των πολυμερών vWF αρχίζει στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου τα μονομερή του pro-vWF σχηματίζουν καρβοξυ-τελικά διμερή. Στο σύμπλεγμα Golgi, τα διμερή του pro-vWF συγκροτούνται σε μεγάλα πολυμερή μέσω των αμινο-τελικών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των αλυσίδων. Η έλλειψη (deletion) του vWFpp δεν εμποδίζει τον σχηματισμό των αμινο-τελικών διμερών, αλλά παρεμποδίζει τον αμινο-τελικό πολυμερισμό. [213, 214] Και οι δύο D περιοχές του vWFpp απαιτούνται για τον πολυμερισμό και η έλλειψη είτε της D1 είτε της D2 επικράτειας οδηγεί σε πλήρη αδυναμία του πολυμερισμού του vWF με το σχηματισμό μόνο του διμερούς vWF. [215]

Έχει αποδειχθεί ότι η συγκρότηση των πολυμερών του vWF πραγματοποιείται σε ένα σύστημα ελεύθερο κυττάρων, με βέλτιστο pH 5.8, σε μικρότερο βαθμό σε pH 6.2 και όχι σε pH 7.4, που αποτελεί τις τυπικές συνθήκες για το WPB, το σύμπλεγμα Golgi και το ενδοπλασματικό δίκτυο, αντίστοιχα. [216, 217] Το όξινο pH στο σύμπλεγμα Golgi, μαζί με την έλλειψη οξειδοοδουκτάσεων, αποτελούν ένα ακατάλληλο περιβάλλον για τον σχηματισμό των δισουλφιδικών δεσμών που απαιτούνται για τον πολυμερισμό. Ο vWF φαίνεται να ξεπερνά αυτούς τους περιορισμούς χρησιμοποιώντας το δικό του προπεπτίδιο με τρόπο παρόμοιο με εκείνον που χρησιμοποιείται από τις δισουλφιδικές ισομεράσες. [218]

Πιο πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το pH του πολυμερισμού εξαρτάται από την πρωτονίωση ενός ή περισσότερων καταλοίπων ιστιδίνης στο vWFpp. Με την αντικατάσταση της ιστιδίνης από αλανίνη, έχει αποδειχθεί ότι η αντικατάσταση της ιστιδίνης 395 ή 460 στο vWFpp προκαλεί ένα σημαντικό πρόβλημα στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των υπομονάδων, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα δύο κατάλοιπα στο vWFpp συμβάλλουν στην, εξαρτώμενη από το pH, ρύθμιση της δημιουργίας των πολυμερών vWF. [219] Επομένως το vWFpp διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον πολυμερισμό του vWF.

### 3.4 Δοκιμασία του vWFpp στο πλάσμα: κλινική χρησιμότητα

Μια από τις εξωκυτταρικές λειτουργίες του vWFpp είναι ως βιοδείκτης (biomarker). Το vWFpp και η ώριμη πρωτεΐνη του vWF απελευθερώνονται στο πλάσμα και κυκλοφορούν σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητα το ένα από το άλλο με διαφορετικούς χρόνους ημιζωής (περίπου 2 και 12 ώρες αντίστοιχα). [220, 221] Τα επίπεδα του vWFpp μπορούν να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της οξείας έκκρισης του vWF από το ενδοθήλιο. [221] Αργότερα περιέγραψαν τη χρησιμότητα του παράλληλου προσδιορισμού του vWF και του vWFpp ως δείκτη ενδοθηλιακής ενεργοποίησης στον διαβήτη.

Οι δοκιμασίες του vWFpp, όσο και του vWF μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να γίνει διάκριση μεταξύ οξείας και χρόνιας διαταραχής ενδοθηλιακών κυττάρων σε ασθενείς με ΘΘΠ, σηψαιμία και διαβήτη, καθώς και σε μια ομάδα ελέγχου που αποτελείται από υγιή άτομα που υποβάλλονται σε δεσμοπρεσίνη (DDAVP), ενδοτοξίνη χαμηλής δόσης ή άσκηση. [222]

Στους υγιείς μάρτυρες, η ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων vWFpp και vWF, που πιθανώς απελευθερώνονται από την αποθήκευση ενδοθηλιακών κυττάρων, ακολουθήθηκε από ταχεία μείωση του επιπέδου vWFpp, ενώ τα επίπεδα vWF επέστρεψαν αργά στα φυσιολογικά τους όρια. Κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της αγγειακής διαταραχής τόσο ο vWF όσο και το vWFpp ήταν αυξημένα. Σε μεταγενέστερα χρονικά σημεία, μόνο τα επίπεδα του vWF συνέχισαν να αυξάνονται.

Έτσι, τα υψηλά επίπεδα vWFpp, όπως και του vWF, υποδεικνύει οξεία, αλλά προσωρινή ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Σε ασθενείς με συμπτώματα οξείας αγγειακής νόσου, όπως η ΘΘΠ, το HUS και η σηψαιμία, τα επίπεδα vWFpp και vWF ήταν αυξημένα. [222, 223] Αντιθέτως, τα επίπεδα του vWFpp είναι ελαφρώς αυξημένα ακόμη και με αυξημένα επίπεδα vWF, σε ασθενείς με χρόνιες αγγειακές παθήσεις όπως ο διαβήτης, η ισχαιμική καρδιακή νόσος ή περιφερική αγγειακή νόσος, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα οριακά αυξημένα επίπεδα vWFpp σε συνδυασμό με αυξημένα επίπεδα vWF αποτελούν ένδειξη χρόνιας διέγερσης του ενδοθηλίου. Η αξιολόγηση του vWF και του vWFpp, μπορεί επίσης να είναι χρήσιμη στην εκτίμηση της επαγόμενης από φάρμακα αγγειακής βλάβης που προκαλείται από αγγειοδραστικούς παράγοντες, όπως η DDAVP, οι λιποπολυσακχαρίτες/ενδοτοξίνες, το fenoldopam, η ντοπαμίνη ή μέσω του διαύλου καλίου,

η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, διαταραχές ή βλάβες. [224] Αν και τα αυξημένα επίπεδα του vWFpp σε αυτές τις κλινικές καταστάσεις θεωρείται ότι οφείλονται στην απελευθέρωση του κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, δεν μπορεί ωστόσο να αποκλειστεί η απελευθέρωση του από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Επιπλέον, η οξεία απελευθέρωση των vWF και vWFpp από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας ή της επεξεργασίας του δείγματος, αποτελούν σημαντικές προ-αναλυτικές μεταβλητές που επηρεάζουν την ποιότητα του δείγματος.

Η παράλληλη ανάλυση (parallel assay) του vWFpp και του vWF έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες ότι αποτελεί έναν δείκτη για την οξεία ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων στη σοβαρή εγκεφαλική και μη εγκεφαλική ελονοσία. [225-228] Αυτά τα ευρήματα εμπλέκουν την οξεία, ρυθμιζόμενη απελευθέρωση WPBs των ενδοθηλιακών κυττάρων στην παθογένεση της ελονοσίας από το *Plasmodium falciparum*. Τα επίπεδα των vWFpp και vWF έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση της ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων στον διαβήτη. [229-231] Σημαντική αύξηση των vWF και vWFpp ταυτοποιήθηκαν σε ασθενείς με ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη με μικρολευκωματουρία ή εμφανή διαβητική νεφροπάθεια. [229, 232]

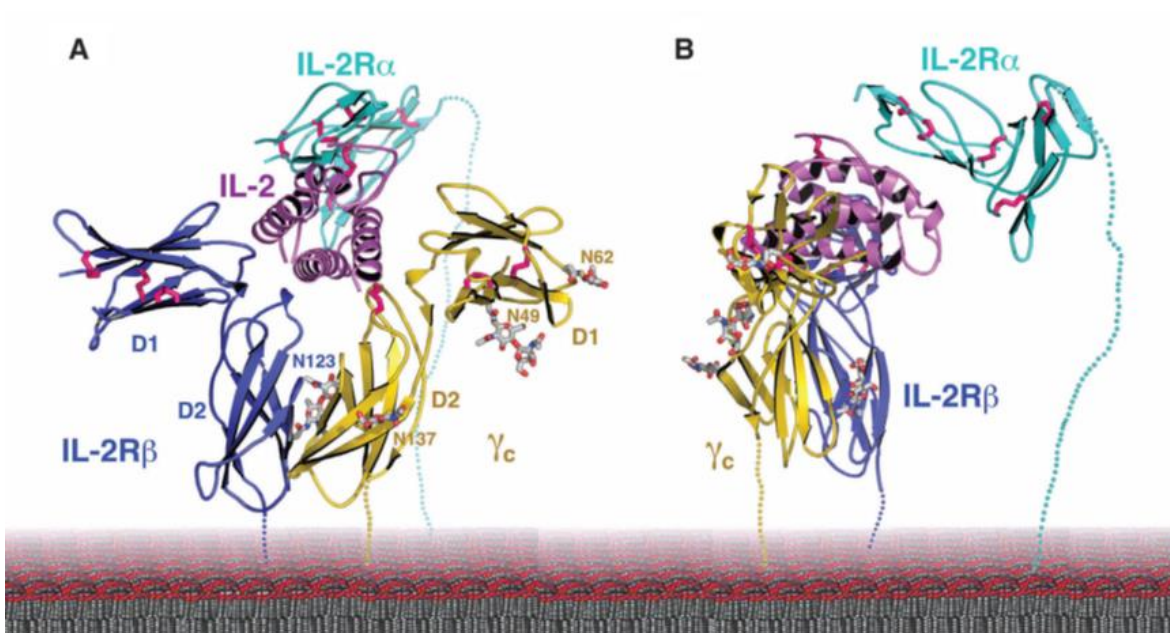
Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία προϋπάρχει τουλάχιστον για δύο χρόνια πριν από την ανάπτυξη εμμένουσας μικρολευκωματινουρίας. [229] Η ενδοθηλιακή ενεργοποίηση, όπως αποδεικνύεται από τα αυξημένα επίπεδα vWFpp, εμπλέκεται σε: χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, αορτική στένωση, ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, σηψαιμία, μηνιγγιτιδοκοκκική νόσο, Δάγκειο πυρετό, σκλήρυνση κατά πλάκας, δρεπανοκυτταρική νόσο, σύνδρομο HELLP και άσθμα. [233-241] Εκτός από τη χρησιμότητα στην ανίχνευση της ενδοθηλιακής ενεργοποίησης, τα vWFpp και ο vWF μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν με παρόμοιο τρόπο για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. [242] Υπό ορισμένες κλινικές συνθήκες, τα αυξημένα επίπεδα του vWFpp υποδεικνύουν την ενεργοποίηση τόσο των αιμοπεταλίων όσο και των ενδοθηλιακών κυττάρων. [243]

Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του vWFpp στηρίζεται στις βασικές αρχές μεθόδων ενζυμικής ανοσοπροσοφορικής ανάλυσης (Elisa). Πλάκες μικροτιτλοδότησης επικαλύπτονται με αντίσωμα CLB-Pro 35 όλη τη νύκτα στους 4°C και στη συνέχεια σταθεροποιούνται με 1% αλβουμίνη ορού βοοειδούς σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Στη συνέχεια, αραιωμένα δείγματα προς εξέταση επωάζονται για 2 ώρες στους 37 °C. Το

vWFpp ανιχνεύεται με αντίσωμα CLB-Pro 14.3 συζευγμένο με υπεροξειδάση. Χρησιμοποιείται pool πλάσμα για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης. [244] Σε άλλα kit Elisa, χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα, 239,2 και 239,3 για τη δέσμευση του vWFpp και για την ανίχνευσή του, πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-vWFpp κουνελιού. [245]

#### **4. Η ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-2 (IL-2) ΚΑΙ Ο ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ IL-2**

Η ιντερλευκίνη 2 (IL-2) (εικόνα 13) περιγράφηκε για πρώτη φορά ως αυξητικός παράγοντας Τ-λεμφοκυττάρων, που απομονώθηκε από καλλιέργεια μονοκυττάρων ενεργοποιημένων με φυτοαιματοσυγκολλητίνη, μια μιτογόνο λεκτίνη.[246] Η IL-2 έχει μορφή μίας μόνο πολυπεπτιδικής αλυσίδας μοριακού βάρους 15.5 kDa, και αποτελείται από 133 αμινοξέα.



**Εικόνα 13:** Η τεταρτοταγής δομή της IL-2 (στο A) και η ίδια δομή σε περιστροφή 90° στον κατακόρυφο άξονα. Η IL-2 εμφανίζεται σε βιολετί χρώμα και οι υποδοχείς εμφανίζονται σε κυανό (IL-2Rα), μπλε (IL-2Rβ) και χρυσό (γc). Οι δισουλφιδικοί δεσμοί φαίνονται με κόκκινο χρώμα.

Η IL-2 παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα CD4 Τ κύτταρα, αν και υπάρχουν αναφορές έκφρασης IL-2 από παίνε CD8 Τ κύτταρα, δενδριτικά και θυμικά κύτταρα.[247-249] Θεωρείται κυτοκίνη με ισχυρή ανοσοτροποποιητική δράση και παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην ενεργοποίηση όσο και διατήρηση ανοσολογικής απάντησης. Η IL-2 ενεργοποιεί μια σειρά από κύτταρα κλειδιά του ανοσοποιητικού συστήματος, δρώντας ως αυτοκρινής παράγοντας που οδηγεί στη εξάπλωση (expansion) του οροδιαλυτού υποδοχέα IL-2 (s IL-2Rα) στα αντιγόνο-ειδικά Τ κύτταρα, και ως παρακρινής παράγοντας ενισχύοντας τη δράση σε μια σειρά από άλλα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου των Β κυττάρων, των NK κυττάρων

(Natural killers-φυσικοί φονείς), ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων, κ.ά.[250-253] Στις αρχές του 21<sup>ου</sup> αιώνα, αποκαλύφθηκε μια μάλλον απρόβλεπτη λειτουργία της IL-2. Η υποστήριξη της επιβίωσης και της λειτουργικότητας των CD25CD4 ρυθμιστικών T κυττάρων. [254, 255]

Λόγω της ικανότητας της IL-2 να διεγείρει τα NK κύτταρα και τα CD8 T-κύτταρα οδηγώντας τα σε λύση καρκινικών στόχων, προέκυψε ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον για την IL-2 ως αντι-νεοπλασματικό βιολογικό παράγοντα. [248, 250, 251, 256, 257] Το ανασυνδυασμένο ανάλογο της ανθρώπινης IL-2 έχει πάρει ήδη έγκριση για τη θεραπεία του μεταστατικού μελανώματος και του μεταστατικού καρκίνου του νεφρού, με απόκριση που φτάνει το 15%. [258, 259]

Για να ασκήσει τη βιολογική της δράση, η IL-2 πρέπει να αλληλεπιδράσει με τον ειδικό της υποδοχέα (IL-2R – Interleukin 2 receptor). Μεταξύ των υπολοίπων αυξητικών παραγόντων, ο υποδοχέας κυτταρικής μεμβράνης IL-2R έχει μια μοναδική δομή. Αποτελείται από τρεις διακριτές γλυκοπεπτιδικές υποομάδες που ονομάζονται α (IL-2Rα), β (IL-2Rβ) και γ (IL-2Rγ) αλυσίδες. [251, 260, 261]

Η α αλυσίδα, γνωστή και ως ελαφρά αλυσίδα και CD25 [στο παρελθόν αναφερόταν και ως Tac (T activated cell – T ενεργοποιημένο κύτταρο) αντιγόνο] είναι μια πρωτεΐνη 55 kDa. Η αρχική της δομή δεν παρουσιάζει συγγένεια με άλλους γνωστούς πρωτεϊνικούς υποδοχείς. Η IL-2Rα στερείται δομικά χαρακτηριστικά παρόντα σε στα μέλη της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών και δεν ανήκει και στην ομάδα των υποδοχέων κυτταροκινών. Αποτελείται από 251 αμινοξέα συμπεριλαμβανομένου ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου 21 αμινοξέων. Τα τρία τμήματα του α υποδοχέα: εξωμεμβρανικό, ενδομεμβρανικό και ενδοκυτταρικό αποτελούνται από 219, 19 και 13 αμινοξέα αντίστοιχα. [249, 251, 260, 261] Το ενδοκυτταρικό τμήμα είναι πολύ μικρό για να δράσει ως σημαντική θέση μεταγωγής σήματος και στερείται συναινετικής ακολουθίας για διακυτταρική σηματοδότηση. [252, 262]

Η β αλυσίδα, γνωστή και ως βαριά αλυσίδα (IL-2Rβ, CD122), είναι μια πρωτεΐνη βάρους 75 kDa. Η πλήρους μήκους IL-2Rβ αποτελείται από 551 αμινοξέα και ένα αμινοτελικό σηματοδοτικό πεπτίδιο 26 αμινοξέων στη δομή της. Το εξωμεμβρανικό τμήμα της β αλυσίδας περιλαμβάνει 214 αμινοξέα, το ενδομεμβρανικό 25 και το ενδοκυτταρικό (κυτταροπλασματικό), το μεγαλύτερο από όλα – 286 αμινοξέα. Το τελευταίο τμήμα της IL-2Rb χωρίζεται σε τρεις διακριτές υποπεριοχές: την «πλούσια σε σερίνη» περιοχή (υπεύθυνη για την μιτωτική μεταγωγή σήματος), την «πλούσια σε προλίνη» περιοχή και την «όξινη»



περιοχή, υπεύθυνη για την φυσική σύνδεση με μια src-οικογένεια κινασών της τυροσίνης, μετά την διέγερση της IL-2. [247, 249, 263]

Η  $\gamma$  υπομονάδα του IL-2R (p64, CD132) αποτελείται από ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο 22 αμινοξέων και 347 αμινοξέα της ώριμης μορφής του IL-2R $\gamma$ . Σε αυτή την αλυσίδα, τμήματα μήκους 232, 29 και 86 αμινοξέων συγκροτούν τις εξωμεμβρανικές, ενδομεμβρανικές και κυτταροπλασματικές περιοχές αντίστοιχα. Το εξωκυτταρικό τμήμα περιέχει ορισμένα μοτίβα που είναι παρόντα και σε άλλους υποδοχείς κυτταροκινών, όπως της IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, του αυξητικού παράγοντα μακροφάγων [granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)], της προλακτίνης, της αυξητικής ορμόνης και της ερυθροποιητίνης. Αυτό υποδηλώνει ότι η IL-2R $\gamma$  ανήκει στη μεγάλη οικογένεια των υποδοχέων κυτταροκινών και ότι είναι απαραίτητη για την εσωτερικοποίηση μέσω υποδοχέων της IL-2. [249, 261, 264]

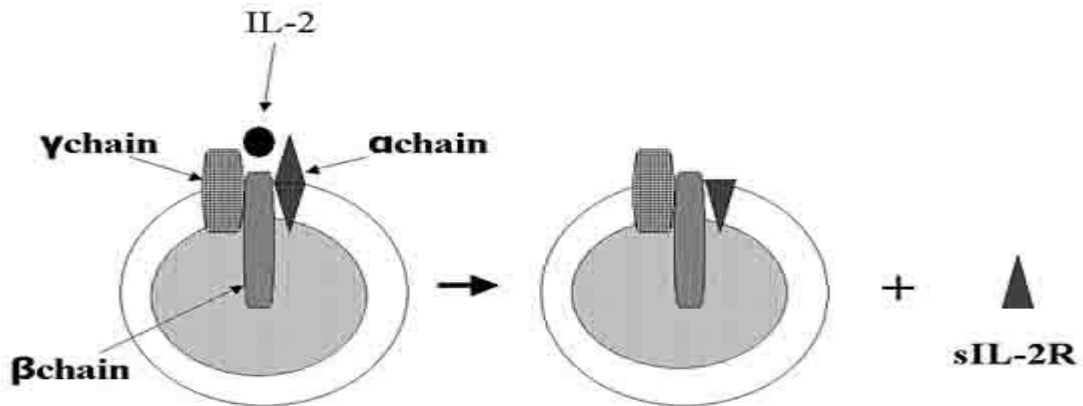
Η κάθε υπομονάδα του IL-2R είναι ικανή να δεσμεύσει ανεξάρτητα το συνδέτη είτε με χαμηλή (IL-2R $\alpha$ ) είτε με ενδιάμεση (IL-2R $\beta$  και  $\gamma$ ) συγγένεια. Διαφορετικοί συνδυασμοί των  $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\gamma$  αλυσίδων σχηματίζουν τρεις διαφορετικές τάξεις του υποδοχέα IL-2. [249, 250, 261] Έχει αποδειχθεί ότι ο αυξημένης συγγένειας υποδοχέας IL-2 αποτελείται και από τρεις υπομονάδες συνδεδεμένες μη-ομοιοπολικά και ότι η παρουσία της  $\alpha$  αλυσίδας είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του συγκεκριμένου υποδοχέα. [250, 265] Η ταχεία επαγωγή και έκφραση της  $\alpha$  αλυσίδας συμβαίνει μετά την ενεργοποίηση των μονοπύρηνων κυττάρων, σε αντίθεση με τις  $\beta$  και  $\gamma$  αλυσίδες που εκφράζονται τόσο από τα ανώριμα, αλλά και τα ώριμα B και T λεμφοκύτταρα, τα μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα [large granular lymphocytes (LGL)], τα μονοπύρηνια και τα NK κύτταρα. Εκτός μιας μικρής κατηγορίας NK κυττάρων, τα μη-διεγερμένα λεμφοκύτταρα δεν εκφράζουν σε μετρήσιμα επίπεδα υποδοχείς αυξημένης συγγένειας. Η πλειονότητα των NK κυττάρων, τα ουδετερόφιλα και τα ανώριμα ή διεγερμένα από την IL-2 μονοκύτταρα εκφράζουν μόνο ενδιάμεσης συγγένειας υποδοχείς. Τα μονοπύρηνια διεγερμένα από προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες εκφράζουν υποδοχείς αυξημένης συγγένειας αλλά σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα από ότι τα NK κύτταρα ή τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα. [250]

Αποτελεί σημαντικό στοιχείο ότι η  $\beta$  και η  $\gamma$  υπομονάδες συμμετέχουν και σε άλλους υποδοχείς ιντερλευκινών. Η  $\gamma$  αλυσίδα είναι γνωστή και ως «κοινός υποδοχέας  $\gamma$ », αφού είναι παρούσα σε τουλάχιστον άλλους εφτά υποδοχείς κυτταροκινών. [264] Η  $\beta$  αλυσίδα

αποτελεί μέρος του υποδοχέα IL-15, η οποία μοριακά μοιάζει με την IL-2. [247, 249, 263] Αυτός ο «διαμοιρασμός» υποδοχέων είναι υπεύθυνος για την ποικιλομορφία των λειτουργιών του δικτύου κυτταροκινών. Εξηγεί επίσης το εύρημα ότι παρά την εξάλειψη του γονιδίου IL-2 στα ποντίκια, το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να λειτουργήσει με μια μόνο μικρή αποδιοργάνωση. [252]

#### 4.1 Υποδοχέας IL-2 – διαλυτή μορφή της $\alpha$ υπομονάδας (sIL-2Ra)

Εκτός του IL-2Ra μεμβρανικής έκφρασης, βρέθηκε και μια διαλυτή μορφή αυτού του υποδοχέα που απελευθερώνεται αυθόρμητα στο υπερκείμενο *in vitro* καλλιέργειας διεγερμένων με λεκτίνη και μιτογόνα T-λεμφοκυττάρων. Έχει αποδειχθεί ότι αυτή η διαλυτή μορφή της  $\alpha$  αλυσίδας είναι μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη μεμβρανική (45 έναντι. 55 kDa), έχει όμως την ικανότητα να δεσμεύσει επαρκώς την IL-2 (Εικόνα 14). [266, 267] Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της διαλυτή μορφής του μορίου CD25 έχει χρησιμοποιηθεί από το 1991 μέθοδος ELISA με χρήση αντισωμάτων έναντι του ανθρώπινου IL-2Ra (αντι-Tac και 7G7/B6). [260, 268] Πλέον υπάρχει πληθώρα εμπορικά διαθέσιμων μεθόδων ELISA, απλές και καθόλου χρονοβόρες, για τη μέτρηση του διαλυτού υποδοχέα (sIL-2Ra) σε διάφορα υγρά του σώματος.



Εικόνα 14: Η ιντερλευκίνη-2 και η διαδικασία σχηματισμού του διαλυτού υποδοχέα της.

Ο sIL-2Ra έχει ανιχνευθεί στον ορό και άλλα υγρά υγιών ατόμων και τα επίπεδά του (περίπου 100-500 U/ml; 1 IU=3.3 pg) αντανακλούν την ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης υπό φυσιολογικά ερεθίσματα. [267] Η απελευθέρωση του διαλυτού CD25 είναι ανάλογη της μεμβρανικής έκφρασής του. [269] Εκκρίνεται και

καταβολίζεται από τους νεφρούς και ο χρόνος ημιζωής του στον ορό είναι 0.62 ώρες. Σε νεφρική ανεπάρκεια, τα επίπεδά του είναι αυξημένα λόγω του μειωμένου καταβολισμού. [247]

Οι τιμές sIL-2Ra στον ορό υγιών παιδιών είναι υψηλότερες σε σχέση με τους ενήλικες. [270] Αυτό το φαινόμενο επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια και από άλλους ερευνητές. [271, 272] Δεν έχουν παρατηρηθεί ιδιαίτερες διαφορές στα επίπεδα του sIL-2Ra όσον αφορά το φύλο. [273] Επιπλέον, τα επίπεδα του sIL-2Ra στο πλάσμα δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ του νυχτερινού ύπνου και της νυχτερινής εγρήγορσης. Η μελέτη του Haack και συν. επίσης, δεν κατέδειξε σημαντικές ημερήσιες διακυμάνσεις στα επίπεδα του. [274]

#### **4.2 Αυξημένα επίπεδα sIL-2Ra σε μη κακοήθη νοσήματα**

Αυξημένα επίπεδα sIL-2Ra έχουν βρεθεί σε πληθώρα αυτοάνοσων και φλεγμονωδών νοσημάτων (Πίνακας 9), όπως στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, πολλαπλή σκλήρυνση, ΣΕΛ, μυασθένεια Gravis, απλαστική αναιμία, νόσο του Crohn, σαρκοείδωση, άσθμα, κ.ά. [275-284] Οι τιμές του διαλυτού IL-2Ra αυξάνουν επίσης σε ιικές ή βακτηριακές λοιμώξεις, όπως στη χρόνια ηπατίτιδα Β και C, εμπύρετη ουδετεροπενία, πνευμονία, βρουκέλλωση, νόσο του Lyme, κ.ά. [79, 285-289] Η καθημερινή παρακολούθηση κατά τη διάρκεια της πρώιμης μετεγχειρητικής περιόδου μετά από μεταμόσχευση ήπατος έχει καταδείξει την κλινική συσχέτιση του sIL-2Ra ως δείκτη για την οξεία απόρριψη του μοσχεύματος. [290] Υπάρχει επίσης συσχέτιση του sIL-2Ra με τη σοβαρότητα της νόσου μοσχεύματος έναντι ξενιστή λήπτη (GVHD - graft-versus-host disease) μετά από μεταμόσχευση μυελού. [291] Ο sIL-2Ra αποτελεί ένα εξαιρετικά σημαντικό και πολύτιμο δείκτη για την έκβαση στην ιστοκύττωση κυττάρου Langerhans σε παιδιά. [292]

Στις προαναφερθείσες καταστάσεις, παραμένει ασαφής ο λόγος για τον οποίο είναι αυξημένα τα επίπεδα του sIL-2Ra και μπορεί να αντιπροσωπεύει μια μη-ειδική απάντηση στη φλεγμονή και το στρες. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι συνεχείς μετρήσεις των επιπέδων του sIL-2Ra θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην παρακολούθηση της σοβαρότητας της νόσου και επίσης, στην πρόβλεψη και την αξιολόγηση της απάντησης στις αντιφλεγμονώδεις θεραπείες. [285, 290]

**Πίνακας 9.** Νοσήματα που συνδέονται με αυξημένα επίπεδα sIL-2Ra[293]

Αυτοάνοσα νοσήματα	Νεοπλασίες	Απόρριψη μοσχεύματος	Λοιμώξεις	Άλλα
Απλαστική αναιμία Άσθμα Σύνδρομο Behcet Διπολική διαταραχή Νόσος του Crohn ITP P.A. Νόσος Kawasaki Πολλαπλή σκλήρυνση Μυασθένεια Gravis Νεφρωτικό σύνδρομο Σαρκοείδωση Σκληρόδερμα Σύνδρομο Sjogren ΣΕΛ Αγγειίτιδα Κοκκιομάτωση Wegener	<b>Λευχαιμίες</b> (ΟΜΛ, Τ-λευχαιμία ενηλίκων, ΧΛΛ, ΧΜΛ, ΟΛΛ Λευχαιμία τριχωτών κυττάρων) <b>Λεμφώματα</b> Τ-λέμφωμα Non-Hodgkin's λέμφωμα Λέμφωμα Hodgkin's Τ-περιφερικό λέμφωμα Πολλαπλούν μυέλωμα <b>Συμπαγείς κακοήθεις όγκοι:</b> Κακόηθες μελάνωμα Σάρκωμα μαλακών μορίων Όγκοι στο κεφάλι και τον αυχένα Ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα Καρκίνος μαστού, πνεύμονα, οισοφάγου, παγκρέατος, στομάχου, νεφρού, ήπατος Καρκίνος ωοθηκών, παχέος εντέρου <b>Νεοπλασίες παιδών</b> ΟΛΛ, Hodgkin's και non-Hodgkin's λεμφώματα Σάρκωμα οστών και μαλακών μορίων Αιμοφαγοκυτταρικό σύνδρομο	Νεφρός Ήπαρ Καρδιά Μυελός των οστών	Χρόνια ηπατίτιδα Β και C, εμπύρετη ουδετεροπενία, πνευμονία, βρουκέλλωση, νόσος του Lyme HIV/AIDS Λοιμώδης μονοπυρήνωση Rubella Σήψη	<b>Φάρμακα</b> In vivo χορήγηση IL-2 In vivo χορήγηση G-CSF Γενική αναισθησία Νεφρική νόσος τελικού σταδίου Θρομβοεμβολική νόσος GVHD Ιστιο-κύτωση κυττάρου Langerhans Εγκαύματα

#### 4.3 sIL-2Ra και ΘΘΠ

Σε αναζητήσεις στον ιστότοπο Pubmed, με τους όρους «sIL-2r[All Fields] AND ttp[All Fields]» ή «sIL-2r[All Fields] AND ("purpura, thrombotic thrombocytopenic"[MeSH Terms] OR ("purpura"[All Fields] AND "thrombotic"[All Fields] AND "thrombocytopenic"[All Fields]) OR "thrombotic thrombocytopenic purpura"[All Fields] OR ("thrombotic"[All Fields] AND "thrombocytopenic"[All Fields] AND "purpura"[All Fields]))», δεν επέστρεψαν αποτελέσματα, ενώ η αναζήτηση με όρους «soluble[All Fields] AND ("receptors, interleukin-2"[MeSH Terms] OR ("receptors"[All Fields] AND "interleukin-2"[All Fields]) OR "interleukin-2 receptors"[All Fields] OR ("il"[All Fields]

AND "2r"[All Fields]) OR "il 2r"[All Fields]) AND ("purpura, thrombotic thrombocytopenic"[MeSH Terms] OR ("purpura"[All Fields] AND "thrombotic"[All Fields] AND "thrombocytopenic"[All Fields]) OR "thrombotic thrombocytopenic purpura"[All Fields] OR ("thrombotic"[All Fields] AND "thrombocytopenic"[All Fields] AND "purpura"[All Fields]))», επέστρεψε μόνο δύο αποτελέσματα, μιας ομάδας ιαπόνων ερευνητών στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Ανοσολογικοί μηχανισμοί (όπως η ενεργοποίηση μακροφάγων) και οι βλάβες των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, εμπλέκονται στην παθογένεση της ΘΘΠ και αντικατοπτρίζονται στα επίπεδα κυτοκινών πλάσματος. [294, 295] Συνεπώς, τα επίπεδα του sIL-2Ra στην ΘΘΠ είναι πεδίο προς διερεύνηση για πιθανή σχέση του με την πρόγνωση και την πορεία της νόσου.

## **5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 5.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Από τα μέσα τις δεκαετίας του 1980 αντιμετωπίστηκαν στο ΓΝΑ «Λαϊκό» περισσότεροι από 80 ασθενείς με ΘΘΠ, είτε ως πρωτοδιάγνωση, είτε σε φάση υποτροπών. Από αυτούς τους ασθενείς, οι 64 ήταν υπό συστηματική παρακολούθηση στη Μονάδα Αφαιρέσεων «Κ. Μαρκάκης» και η μεγάλη πλειονότητα αυτών, εξακολουθεί να παρακολουθείται και σήμερα (πίνακας 10).

**Πίνακας 10:** Γενικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΘΘΠ που παρακολουθούνται στο ΓΝΑ «Λαϊκό»

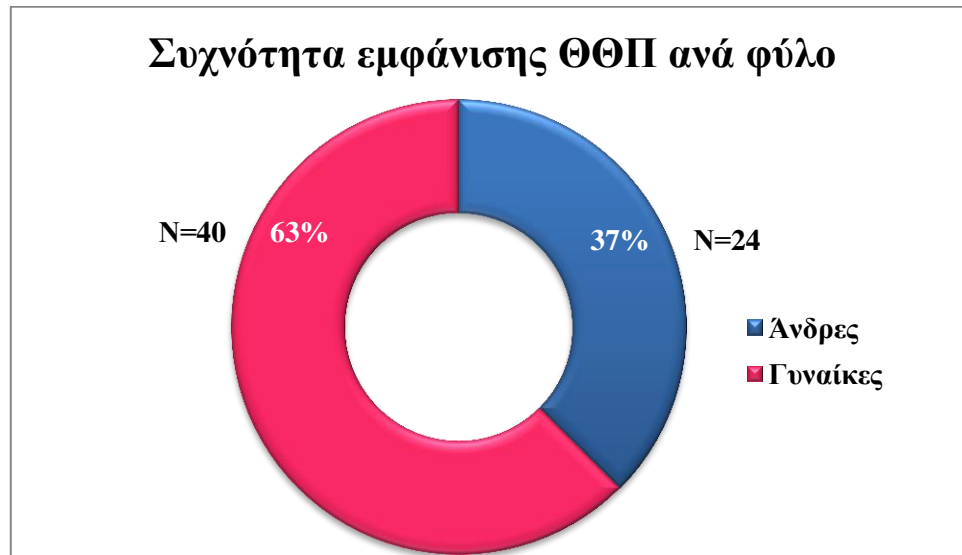
A/A	Φύλο	Έτος γέν.	Ηλικία διάγνωσης	Ιδιοπαθές Β' παθές	Υποτροπή	Rituximab	Σπλην/μή
1	Θήλυ	1961	54	Ιδιοπαθές	Όχι	Όχι	Όχι
2	Άρρεν	1974	42	Ιδιοπαθές	Όχι	Όχι	Όχι
3	Θήλυ	1959	55	Ιδιοπαθές	Όχι	Ναι	Όχι
4	Θήλυ	1983	36	Ιδιοπαθές	Όχι	Ναι	Όχι
5	Άρρεν	1959	58	Ιδιοπαθές	Όχι	Ναι	Όχι
6	Άρρεν	1978	35	B' (ναρκωτικά)	Όχι	Όχι	Όχι
7	Θήλυ	1977	35	Ιδιοπαθές	Όχι	Όχι	Όχι
8	Θήλυ	1972	45	Ιδιοπαθές	Όχι	Ναι	Όχι
9	Άρρεν	1959	57	Ιδιοπαθές	Όχι	Όχι	Όχι
10	Θήλυ	1984	34	Ιδιοπαθές	Όχι	Όχι	Όχι
11	Θήλυ	1974	37	Ιδιοπαθές	Όχι	Ναι	Όχι
12	Θήλυ	1981	29	B' (κύηση)	Όχι	Όχι	Όχι
13	Άρρεν	1972	44	B' (P.A.)	Όχι	Ναι	Όχι
14	Άρρεν	1970	47	Ιδιοπαθές	Όχι	Όχι	Όχι
15	Θήλυ	1972	40	Ιδιοπαθές	Όχι	Όχι	Όχι
16	Θήλυ	1968	48	Ιδιοπαθές	Όχι	Όχι	Όχι
17	Άρρεν	1979	37	Ιδιοπαθές	Όχι	Όχι	Όχι
18	Άρρεν	1977	33	B' (ψύχωση)	Όχι	Ναι	Όχι
19	Θήλυ	1993	23	Ιδιοπαθές	Όχι	Όχι	Όχι
20	Άρρεν	1972	46	B' (παγκρεατίτιδα)	Όχι	Όχι	Όχι
21	Άρρεν	1967	51	Ιδιοπαθές	Όχι	Όχι	Όχι
22	Άρρεν	1979	35	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
23	Θήλυ	1967	38	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
24	Άρρεν	1952	24	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
25	Θήλυ	1964	44	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Ναι
26	Άρρεν	1954	44	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Ναι

27	Άρρεν	1982	30	Β' (ψύχωση)	Ναι	Όχι	Όχι
28	Θήλυ	1975	27	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
29	Άρρεν	1991	20	Ιδιοπαθές	Ναι	Ναι	Όχι
30	Θήλυ	1962	38	Β' (νόσος κολλαγόνου)	Ναι	Όχι	Όχι
31	Άρρεν	1970	40	Ιδιοπαθές	Ναι	Ναι	Όχι
32	Άρρεν	1980	25	Ιδιοπαθές	Ναι	Ναι	Ναι
33	Άρρεν	1978	33	Ιδιοπαθές	Ναι	Ναι	Όχι
34	Άρρεν	1967	37	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
35	Θήλυ	1982	9	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Ναι
36	Θήλυ	1969	47	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
37	Άρρεν	1968	41	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
38	Άρρεν	1965	45	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
39	Θήλυ	1982	17	Ιδιοπαθές	Ναι	Ναι	Όχι
40	Θήλυ	1966	37	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
41	Άρρεν	1973	28	Ιδιοπαθές	Ναι	Ναι	Ναι
42	Θήλυ	1969	38	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
43	Θήλυ	1949	63	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
44	Θήλυ	1987	20	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
45	Θήλυ	1980	18	Ιδιοπαθές	Ναι	Ναι	Όχι
46	Θήλυ	1961	35	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
47	Θήλυ	1962	44	Ιδιοπαθές	Ναι	Ναι	Όχι
48	Θήλυ	1954	63	Ιδιοπαθές	Ναι	Ναι	Όχι
49	Θήλυ	1974	32	Ιδιοπαθές	Ναι	Ναι	Όχι
50	Άρρεν	1977	31	Ιδιοπαθές	Ναι	Ναι	Όχι
51	Θήλυ	1947	61	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
52	Θήλυ	1964	28	Ιδιοπαθές	Ναι	Ναι	Ναι
53	Θήλυ	1979	20	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Ναι
54	Θήλυ	1949	49	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Ναι
55	Άρρεν	1972	40	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
56	Θήλυ	1970	28	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
57	Θήλυ	1971	24	Ιδιοπαθές	Όχι	Όχι	Όχι
58	Θήλυ	1972	24	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Ναι
59	Θήλυ	1963	39	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
60	Θήλυ	1958	46	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
61	Θήλυ	1974	36	Ιδιοπαθές	Ναι	Ναι	Όχι
62	Θήλυ	1955	43	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Ναι
63	Θήλυ	1950	41	Ιδιοπαθές	Ναι	Όχι	Όχι
64	Θήλυ	1951	50	Β' (μεικτή νόσος συνδ. ιστού)	Όχι	Όχι	Όχι

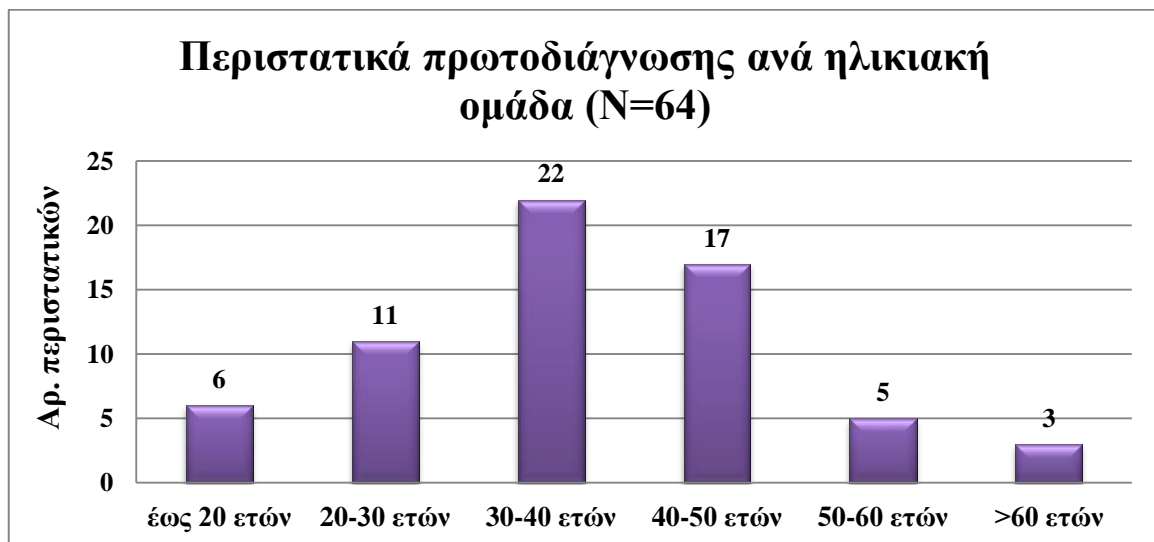


Από αυτούς τους ασθενείς, οι 24 είναι άνδρες και οι 40 γυναίκες, σε ποσοστό 37% και 63% αντίστοιχα και αναλογία 1:1,67. (διάγραμμα 1). Ο μέσος όρος ηλικίας πρωτοδιάγνωσης είναι τα 37,8 έτη (διάμεση τιμή 37,5). Στις γυναίκες όμως είναι λίγο μικρότερη, στα 37 έτη, ενώ στους άνδρες στα 39 έτη. Τα περισσότερα περιστατικά πρωτοδιάγνωσης της νόσου, πράγματι, εντοπίζονται στις ηλικιακές ομάδες 30-40 ετών και ακολουθούν η 40-50 ετών και 20-30 ετών, αντίστοιχα (διάγραμμα 2)

**Διάγραμμα 1.** Συχνότητα εμφάνισης ΘΘΠ ανά φύλο



**Διάγραμμα 2.** Κατανομή περιστατικών πρωτοδιάγνωσης ΘΘΠ ανά ηλικιακή ομάδα.



Η κύρια αιτία εμφάνισης της νόσου είναι ιδιοπαθής, σε ποσοστό 87% (N=56), ενώ μόλις το 13% (N=8) είναι δευτεροπαθούς αιτιολογίας (διάγραμμα 3). Οι μηχανισμοί πυροδότησης του συνδρόμου είναι η ψύχωση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η νόσος κολλαγόνου, τα ναρκωτικά, η παγκρεατίτιδα, η κύηση και η μεικτή νόσος συνδετικού ιστού (πίνακας).

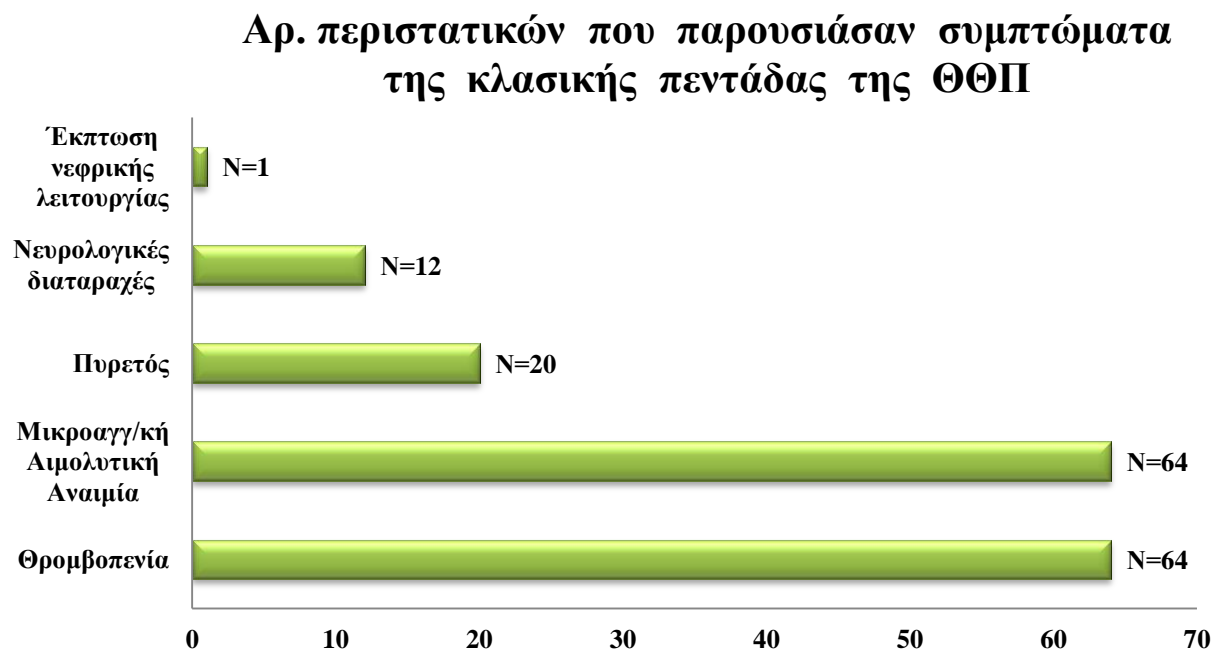
**Διάγραμμα 3.** Ποσοστά περιστατικών ΘΘΠ ιδιοπαθούς ή δευτεροπαθούς αιτιολογίας



Η κλασική πεντάδα συμπτωμάτων για τη διάγνωση της ΘΘΠ περιλαμβάνει τη θρομβοπενία, τη μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία, πυρετό, νευρολογικές διαταραχές και έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Όλοι ασθενείς που προσήλθαν στο νοσοκομείο μας εμφάνισαν τα δύο πρώτα συμπτώματα (N=64), οι 20 εμφάνισαν και πυρετό, οι 12 και νευρολογικές διαταραχές και μόλις ένας, και έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας (διάγραμμα 4, πίνακας 11).

Κανένας ασθενείς δεν παρουσίασε και τα 5 συμπτώματα ταυτόχρονα. Μόλις 4 εμφάνισαν 4 από τα 5 (ποσοστό ~6%), οι 24 (ποσοστό 37,5%) 3 από τα 5, ενώ, οι υπόλοιποι 36 (ποσοστό ~56,5%), μόνο θρομβοπενία και μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία (διάγραμμα 5).

**Διάγραμμα 4.** Αριθμός περιστατικών ΘΘΠ που εμφάνισαν τα συμπτώματα της κλασικής πεντάδας του συνδρόμου.



**Πίνακας 11.** Συμπτώματα κλασικής πεντάδας ΘΘΠ ανά ασθενή

A/A	Θρομβοπενία	Μικροαγγειοπαθητική Αιμολυτική Αναιμία	Πυρετός	Νευρολογικές διαταραχές	Έκπτωση νεφρικής λειτουργίας
1	+	+	+	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
5	+	+	-	-	-
6	+	+	+	-	-
7	+	+	+	+	-
8	+	+	-	+	-
9	+	+	-	-	-
10	+	+	-	-	+
11	+	+	+	-	-
12	+	+	-	-	-
13	+	+	-	-	-
14	+	+	-	-	-

15	+	+	+	+	-
16	+	+	-	-	-
17	+	+	-	-	-
18	+	+	+	-	-
19	+	+	+	+	-
20	+	+	-	-	-
21	+	+	-	+	-
22	+	+	+	-	-
23	+	+	+	-	-
24	+	+	-	-	-
25	+	+	-	+	-
26	+	+	-	-	-
27	+	+	+	-	-
28	+	+	-	+	-
29	+	+	-	+	-
30	+	+	+	+	-
31	+	+	-	+	-
32	+	+	-	-	-
33	+	+	-	-	-
34	+	+	-	-	-
35	+	+	-	-	-
36	+	+	-	-	-
37	+	+	-	-	-
38	+	+	-	-	-
39	+	+	+	-	-
40	+	+	+	-	-
41	+	+	-	-	-
42	+	+	-	-	-
43	+	+	-	-	-
44	+	+	-	+	-
45	+	+	-	-	-
46	+	+	-	-	-
47	+	+	+	-	-
48	+	+	-	-	-
49	+	+	-	-	-
50	+	+	+	-	-
51	+	+	-	-	-

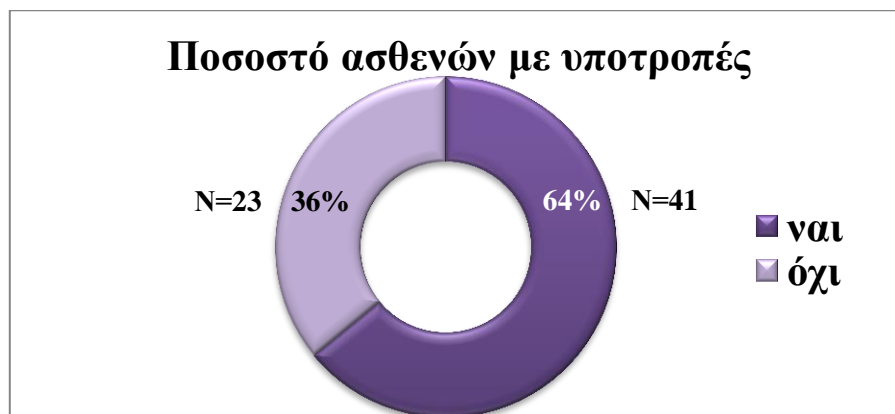
52	+	+	-	-	-
53	+	+	+	-	-
54	+	+	-	-	-
55	+	+	-	-	-
56	+	+	+	-	-
57	+	+	+	+	-
58	+	+	-	-	-
59	+	+	+	-	-
60	+	+	-	-	-
61	+	+	-	-	-
62	+	+	+	-	-
63	+	+	-	-	-
64	+	+	-	-	-

**Διάγραμμα 5.** Αριθμός περιστατικών ΘΘΠ ανά πλήθος συμπτωμάτων της κλασικής πεντάδας του συνδρόμου.



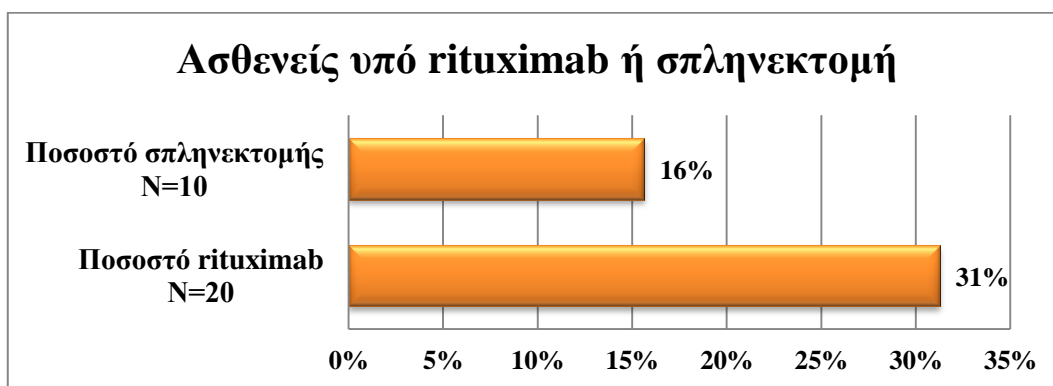
Περίπου τα 2/3 των ασθενών (N=41, 64%), πάσχουν από υποτροπιάζουσα μορφή ΘΘΠ, γι' αυτό και παρουσιάζουν συχνά υποτροπές, κατά μέσο όρο 3 ανά ασθενή. Το υπόλοιπο 36% των ασθενών, μέχρι στιγμής δεν έχει υποτροπιάσει, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι δεν μπορεί να συμβεί κάποια στιγμή στο μέλλον (διάγραμμα 6).

**Διάγραμμα 6.** Ποσοστό ασθενών με ΘΘΠ που υποτροπιάζουν.



Στους ασθενείς με ανθεκτική μορφή της νόσου ή με συχνές υποτροπές, εκτός των ΘΠΑ και των κορτικοστεροειδών, έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα μέσα ανοσοκαταστολής, όπως rituximab, σπληνεκτομή και πιο σπάνια, άλλοι ανοσοκαταστολείς όπως η κυκλοφωσφαμίδη. Τα καλύτερα αποτελέσματα στην αντιμετώπιση τέτοιων περιστατικών προέκυψαν μετά από χορήγηση rituximab ή σπληνεκτομή. Από το σύνολο των ασθενών μας, στους 20 (31%) χορηγήθηκε rituximab, ενώ οι 10 (16%) οδηγήθηκαν σε σπληνεκτομή (διάγραμμα 7). Το rituximab χορηγήθηκε είτε σε περιστατικά ανθεκτικής μορφής της νόσου, ακόμη και σε πρωτοδιάγνωση, είτε σε ασθενείς με συχνές υποτροπές, ενώ σε σπληνεκτομή οδηγήθηκαν ασθενείς με συχνές υποτροπές, που δεν είχαν καλή ανταπόκριση στη φαρμακευτική ανοσοκαταστολή. 3 ασθενείς που είχαν λάβει rituximab, προχώρησαν και σε σπληνεκτομή.

**Διάγραμμα 7.** Ασθενείς με ανθεκτική μορφή ΘΘΠ ή με συχνές υποτροπές που έλαβαν rituximab ή οδηγήθηκαν σε σπληνεκτομή



Οι ασθενείς με ΘΘΠ, όπως έχει ήδη αναφερθεί, παρουσιάζουν ως κύρια συμπτώματα τη θρομβοπενία (συνήθως <30 K/dL) και τη μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία (HB ~8 mg/dL και LDH >1000 IU/L). Η νεφρική λειτουργία κρίνεται φυσιολογική (κρεατινίνη <2 mg/dL), όπως και το INR, το οποίο σπανίως παρουσιάζει ήπια παράταση (πίνακας 12).

**Πίνακας 12.** Τιμές HB, PLT, HDH, κρεατινίνης και INR σε ασθενείς με ΘΘΠ

			PLT (x10 <sup>3</sup> /mL)	HB (g/dL)	LDH (IU/L)	CREAT (mg/dL)	INR
Ασθενείς με υποτροπές (N=41)	Οξεία φάση	<b>Avg.</b>	34	9,8	875	0,97	1,12
		<b>Med.</b>	19	9,9	676	0,88	1,1
		<b>SD</b>	33	2,4	542,6	0,42	0,12
		<b>Range</b>	3-147	4-15	218-2249	0,47-3	0,91-1,41
	Ύφεση	<b>Avg.</b>	320	12,3	239		
		<b>Med.</b>	280	12,5	209		
		<b>SD</b>	174,4	1,8	87,7		
		<b>Range</b>	130-1000	9,2-16,1	135-644		
Ασθενείς χωρίς υποτροπές (N=23)	Οξεία φάση	<b>Avg.</b>	22	8	1161	0,9	1,08
		<b>Med.</b>	14	7,9	921	0,8	1,09
		<b>SD</b>	21,7	1,7	605,7	0,25	0,08
		<b>Range</b>	4-80	4,7-11	351-2788	0,6-1,56	0,96-1,24
	Ύφεση	<b>Avg.</b>	232	10,9	220		
		<b>Med.</b>	190	10,7	230		
		<b>SD</b>	120	1,9	52,8		
		<b>Range</b>	80-584	7,6-15,1	130-327		

Όλες οι ανωτέρω μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα εργαστήρια του ΓΝΑ «Λαϊκό». Συγκεκριμένα, ο αριθμός των αιμοπεταλίων, καθώς η αιμοσφαιρίνη, στην Μονάδα Αφαιρέσεων «Κ. Μαρκάκης» σε αναλυτή CellDyn1800 της Abbott Laboratories, η LDH και η κρεατινίνη στο Βιοχημικό Εργαστήριο σε αναλυτή Cobas C 702 της Roche, ενώ το INR στο Εργαστήριο Αιμόστασης σε αναλυτή Sta Compact της Stago.

## **5.2 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ADAMTS-13**

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ: Μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού [fluorescence resonance energy transfer (FRET)]. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται ένα τμήμα της πρωτεΐνης του vWF. Η διάσπαση αυτού του πεπτιδίου μεταξύ δύο τροποποιημένων αμινοξέων απελευθερώνει τις ικανότητες σβέσης φθορισμού.

Αυτή η δοκιμασία βασίζεται στην ποσοτικοποίηση της διάσπασης ενός μικρού τμήματος του vWF από την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS-13. Η διάσπαση αυτού του συνθετικού υποστρώματος ανιχνεύεται με ανάγνωση του φθορισμού που προκύπτει όταν διασπάται το υπόστρωμα.

### **ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

- Υπόστρωμα: λυοφιλοποιημένο. Αποθήκευση λυοφιλοποιημένου υλικού στους -15 έως -30 °C.
- Διαλύτης δείγματος: Έτοιμο για χρήση. Φυλάσσεται στους 2 έως 8 °C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος: Έτοιμο προς χρήση. Φυλάσσεται στους 2 έως 8 °C
- Θετικός έλεγχος (positive control): Υψηλός
- Θετικός Έλεγχος (positive control): Χαμηλός
- Βαθμονομητές (calibrators), 5 επίπεδα

## **ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

### **Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων**

Για αυτή τη δοκιμασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια που συλλέγεται σε 3,2% κιτρικό αντιπηκτικό. Δεν πρέπει να χρησιμοποιείται πλάσμα που έχει συλλεχθεί με EDTA. Η συλλογή του πλάσματος πρέπει να γίνεται ως εξής:

1. Συλλογή αίματος σε σωληνάρια με κιτρικό αντιπηκτικό
2. Τα δείγματα αίματος πρέπει να φυγοκεντρηθούν μεταξύ δεκαπέντε λεπτών και δύο ωρών μετά τη συλλογή αίματος για καλύτερα αποτελέσματα.
3. Ανακίνηση δειγμάτων αίματος αμέσως πριν τη φυγοκέντρηση.



4. Φυγοκέντρωση δειγμάτων αίματος σε θερμοκρασία δωματίου σε φυγόκεντρο για 15-20 λεπτά σε 1500 έως 1800 RCF (Σχετική Φυγόκεντρη Δύναμη). Ταχύτητα φυγοκέντρωσης >2000 RCF μπορεί να προκαλέσει θραύση σωληναρίων και έκθεση σε αίμα και πιθανό τραυματισμό.
5. Μετά τη φυγοκέντρωση, μεταφέρονται τα άνω 2/3 του στρώματος πλάσματος σε ένα νέο πλαστικό σωληνάριο.
6. Επαναφυγοκέντρωση του συλλεγμένου πλάσματος σε 1500 έως 1800 RCF για επιπλέον 15-20 λεπτά για να αφαιρεθούν τυχόν ερυθρά αιμοσφαίρια ή αιμοπετάλια.
7. Μεταφορά των άνω 2/3 του πλάσματος σε ένα νέο πλαστικό σωληνάριο, προσέχοντας να μην παρασυρθούν τυχόν κύτταρα στο κάτω μέρος του σωληναρίου.

#### **Αποθήκευση δειγμάτων**

1. Το πλάσμα θα πρέπει να φυλάσσεται στους 2 έως 8 °C και να αναλύεται μέσα σε 4 ώρες ή να μοιράζεται σε aliquots και να καταψύχεται στους -70 °C ή και χαμηλότερα για έως και 6 μήνες.
2. Το κατεψυγμένο πλάσμα πρέπει να αποψυχθεί ταχέως στους 37 °C. Το αποψυγμένο πλάσμα πρέπει να φυλάσσεται στους 2 έως 8 °C και να μετρηθεί εντός 4 ωρών.

#### **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ**

1. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προσδιορισμός αριθμού δειγμάτων ασθενών που θα εξεταστούν. Χρησιμοποιώντας το φύλλο καταγραφής, εκχωρείται κάθε δείγμα σε μια θέση που αποτελείται από δύο πηγάδια (εξέταση εις διπλούν). Καταγράφεται η ταυτότητα κάθε δείγματος στο φύλλο καταγραφής. Το διπλότυπο δείγμα τοποθετείται οριζόντια (δεξιά), (πχ. CAL A στα πηγάδια A1 και A2).
4. Σε πλαστικό σωληνάριο, αραιώνεται το δείγμα πλάσματος κάθε ασθενούς που πρόκειται να εξεταστεί προσθέτοντας 18 μL πλάσματος σε 132 μL αραιωτικού δείγματος.
5. Προστίθενται 50 μL εκάστου βαθμονομητή (εις διπλούν), χωρίς αραιώση.
6. Προστίθενται 50 μL χαμηλού θετικού μάρτυρα (low) και υψηλού θετικού μάρτυρα (high) εις διπλούν, χωρίς αραιώση.
7. Προστίθενται 50 μL του προ-αραιωμένου διαλύματος του κάθε δείγματος πλάσματος (που παρασκευάστηκε στο στάδιο 4) εις διπλούν.
8. Προετοιμάζεται το διάλυμα υποστρώματος. Ανασύσταση του λυοφιλοποιημένου

υποστρώματος με προσθήκη 37  $\mu\text{L}$  DMSO στο φιαλίδιο υποστρώματος. Αναμιγνύεται το διάλυμα και προστίθενται 113  $\mu\text{L}$  d.d.  $\text{H}_2\text{O}$ . Ανακατεύεται το περιεχόμενο του φιαλιδίου προσεκτικά περιστρέφοντας απαλά μέχρι να διαλυθούν όλα τα συστατικά.

9. Προετοιμάζεται το διάλυμα υποστρώματος (3%) σε πλαστικό σωληνάριο σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Αρ. δειγμάτων	Όγκος διαλύματος υποστρώματος ( $\mu\text{L}$ )	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος ( $\mu\text{L}$ )
1	25	795
5	37	1193
10	53	1714
40	150	4850

10. Αμέσως μετά την παρασκευή, προστίθενται 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος υποστρώματος σε κάθε μικροπηγάδι που περιέχει δείγμα ασθενούς, βαθμονομητή ή έλεγχο (control). Ανακινούνται απαλά οι πλευρές του πλαισίου των μικροπηγαδίων για να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη κατανομή.

11. Η πλάκα τοποθετείται σε φθοριόμετρο με απορρόφηση = 340 - 350 nm και εκπομπή = 440 - 450 nm σε θερμοκρασία δωματίου. Γίνεται η ανάγνωση και ρυθμίζεται το χρονόμετρο για 30 λεπτά. Καταγράφονται τα αποτελέσματα για το χρόνο 0 ( $t_0$ ).

Η ανάγνωση πρέπει να γίνει μέσα σε 5 λεπτά από την προσθήκη του υποστρώματος.

12. Η πλάκα αφαιρείται από το φθοριόμετρο και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου (όχι στη συσκευή ανάγνωσης πλακών) προστατευόμενη από το φως.

13. Μετά από 30 λεπτά η πλάκα τοποθετείται ξανά στο φθοριόμετρο, με τις ίδιες ρυθμίσεις και μετά την ανάγνωσή της, καταγράφονται τα αποτελέσματα.

## **ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Οι τιμές που υπολογίζονται για τον υψηλό θετικό control και το χαμηλό θετικό control θα πρέπει να εμπίπτουν στο επιτρεπόμενο εύρος που προσδιορίζεται στην ειδική καρτέλα αναφοράς ATS-13 (lot specific). Οι δοκιμασίες στις οποίες οι έλεγχοι δεν πληρούν αυτά τα κριτήρια πρέπει να θεωρούνται άκυρες και πρέπει να επαναλαμβάνονται.

Τα δείγματα πλάσματος με υπολογιζόμενη δραστικότητα ADAMTS-13 μεγαλύτερη από την τιμή που αποδίδεται για το Cal E θα αναφερθούν ως μεγαλύτερες από την καθορισμένη τιμή για το Cal E από το βιβλίο εργασίας ανάλυσης.

### **5.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ADAMTS-13**

**Αρχή μεθόδου:** Ποσοτική ανοσοενζυμική τεχνική ανίχνευσης ανθρώπινων αυτοαντισωμάτων (IgG) στον ορό ή το πλάσμα έναντι της ADAMTS-13,

#### **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΚΙΤ**

1. Σειρές ELISA με 8 πηγαδάκια έκαστη, επικαλυμμένες με ανασυνδυασμένη μορφή πρωτεΐνης ADAMTS-13.
2. Πυκνό πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS, pH 7.3).
3. Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης (ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης δείγματος) (PBS, pH 7.3). Περιέχει σταθεροποιητή πρωτεΐνης. 0.05% proclin; και χρωστική.
4. Βαθμονομητές (Πρότυπα) αριθμημένα από 1 έως 5, λυοφιλοποιημένα.
5. Θετικός και αρνητικός έλεγχος (control), λυοφιλοποιημένο.
6. Συζευκτική ουσία: αντι-ανθρώπινο IgG, σημασμένο μπλε.
7. Χρωμογόνο υπόστρωμα TMB (τετραμεθυλβενζιδίνη).
8. Διάλυμα τερματισμού θειικό οξύ 0,45 mol/L.

#### **ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ**

Σταθερότητα μετά την ανασύσταση / το άνοιγμα: 2-8°C, εκτός από τους βαθμονομητές και controls που αποθηκεύονται στους -20 °C

#### **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ**

##### **Προετοιμασία δειγμάτων**

Υλικό δείγματος: Ανθρώπινος ορός ή πλάσμα με κιτρικό αντιπηκτικό. Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν για τρεις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και στους -20 °C για αρκετούς μήνες. Τα δείγματα δεν πρέπει να καταψυχθούν και να αποψυχθούν αρκετές φορές.

##### **Προετοιμασία αντιδραστηρίων**

1. Πριν ξεκινήσει η δοκιμασία, όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

2. Προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης: Αραιώνεται 1 μέρος κατ' όγκο συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης με 11,5 μέρη κατ' όγκο απεσταγμένο νερό (1+11,5).

3. Ανασύσταση των βαθμονομητών και των ελέγχων (controls): Οι βαθμονομητές και τα controls αναστήνονται με 500 μL αποσταγμένου νερού και αναμειγνύονται για 10 δευτερόλεπτα μετά από ένα χρόνο ανασύστασης 15 λεπτών. Δεν απαιτείται αραιώση για τους βαθμονομητές και τους ελέγχους! Τα ανασυσταθέντα συστατικά είναι καθαρά έως ελαφρώς θολά.

4. Αραιώση δειγμάτων: Τα δείγματα αραιώνονται με ρυθμιστικό επώασης (1 + 100): Αραιώστε 1 μέρος κατ' όγκο δείγμα με 100 μέρη κατ' όγκο ρυθμιστικού διαλύματος επώασης (10 μL δείγματος + 1000 μL ρυθμιστικού διαλύματος επώασης (=αραιώση δείγματος))

5. Προετοιμασία διαλύματος εργασίας συζευκτή: (1 + 50): Αραιώνεται 1 μέρος κατ' όγκο διαλύματος συζευκτή με 50 μέρη κατ' όγκο ρυθμιστικό διαλύματος επώασης.

Για 8 μικροπηγάδια (1 σειρά): Αναμειγνύονται 20 μL διαλύματος συζευκτή με 1000 μL ρυθμιστικού διαλύματος επώασης.

## **ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ**

### **Επώαση δειγμάτων**

Πιπετάρονται 100 μL βαθμονομητών, controls και αραιωμένων δειγμάτων στις σειρές μικροπηγαδίων, οι οποίες καλύπτονται με μεμβράνη

Επιάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 60 λεπτά

### **Πλύσιμο**

Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 3 x 200 μL

### **Αντίδραση σύζευξης**

Πιπετάρονται 100 μL διαλύματος εργασίας συζευκτή στις σειρές μικροπηγαδίων.

Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 60 λεπτά

### **Πλύσιμο**

Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 3 x 200 μL

### **Αντίδραση υποστρώματος**

Πιπετάρονται 100 μL διαλύματος υποστρώματος στις σειρές μικροπηγαδίων.

Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

### Τερματισμός

Πιπετάρονται 100  $\mu$ L διαλύματος τερματισμού.

### Μέτρηση

Αναλυτής-αναγνώστης ELISA, **450 nm**

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

### Υπολογισμός αποτελεσμάτων

Ρύθμιση καμπύλης αναφοράς:

Άξονας X: συγκέντρωση ADAMTS-13 IgG (U/mL)

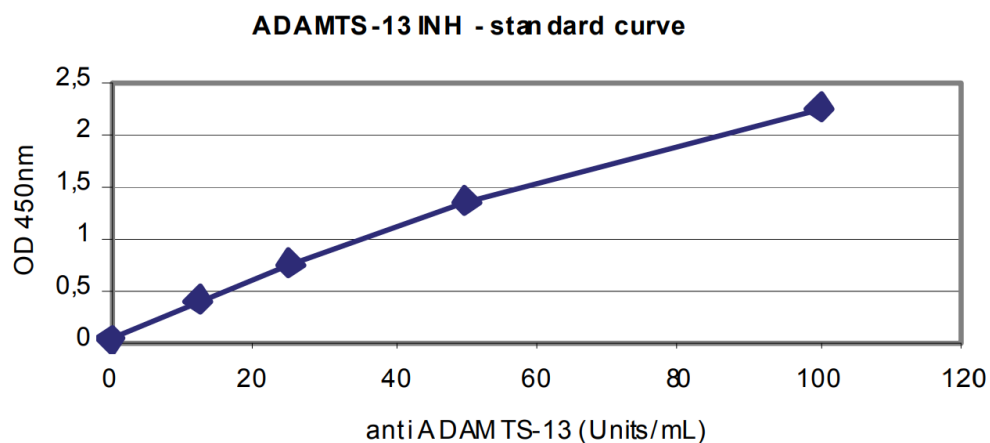
Άξονας Y: Απορρόφηση στα 450nm

Η γραφική παράσταση είναι γραμμική με γραμμική προσαρμογή από σημείο σε σημείο.

### Αξιολόγηση της καμπύλης αναφοράς

- Η οπτική απορρόφηση του υψηλότερου βαθμονομητή πρέπει να είναι μεταξύ 1,0 και 2,5.
- Η οπτική απορρόφηση του κατώτερου βαθμονομητή πρέπει να είναι  $<0,1$ .
- Η διαφορά απορρόφησης μεταξύ αυτών των δύο τιμών πρέπει να είναι τουλάχιστον 1,0.
- Η εγκυρότητα της δοκιμής μπορεί να ελεγχθεί με βάση τις υπολογισμένες τιμές ελέγχου.

Παράδειγμα τυπικής καμπύλης



Μέτρηση συγκέντρωσης δειγμάτων

- Προσδιορισμός συγκέντρωσης από την καμπύλη αναφοράς.

• Εάν υπάρχουν δείγματα με οπτική απορρόφηση υψηλότερη από εκείνη του υψηλότερου σημείου της καμπύλης, πρέπει να προ-αραιωθούν με ρυθμιστικό διάλυμα επώασης (1:2 ή 1:4). Η μετρούμενη συγκέντρωση πρέπει στη συνέχεια να πολλαπλασιαστεί με τον συντελεστή αραιώσης 2 ή 4, αντίστοιχα.

#### **ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ / ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ**

Αρνητικά δείγματα. <12 U/mL

Οριακά: 12-15 U/mL

Θετικά δείγματα:>15 U/mL

Κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το ιστορικό του ασθενούς.

#### **ΕΥΡΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

2 – 104 U/μL

#### **ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ**

1,68 U/mL

## **5.4 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ sIL-2Ra**

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ: Ποσοτική τεχνική ανοσοπροσδιορισμού τύπου σάντουιτς. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για ανθρώπινη IL-2Ra έχει ακινητοποιηθεί σε πηγαδάκια μικροπλακιδίου. Τα πρότυπα, καθώς και τα δείγματα και η συζευκτική ουσία (conjugate) διανέμονται στα πηγαδάκια και η προς προσδιορισμό IL-2Ra η οποία συνδέεται αφενός με το ακινητοποιημένο αντίσωμα και αφετέρου με το συνδεδεμένο με ένζυμο πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για ανθρώπινο IL-2Ra, υπό μορφή σάντουιτς. Μετά από έκπλυση για την απομάκρυνση οιασδήποτε μη δεσμευμένης ουσίας και / ή αντιδραστηρίου αντισώματος-ενζύμου, προστίθεται ένα διάλυμα υποστρώματος στα πηγαδάκια και το χρώμα αναπτύσσεται σε αναλογία με την ποσότητα δεσμευμένης IL-2Ra. Η ανάπτυξη χρώματος διακόπτεται και μετράται η ένταση του χρώματος.

### **ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ & ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ**

Συνθήκες αποθήκευσης: 2-8 °C.

- Μικροπλάκα ανθρώπινου IL-2 Ra, 96 πηγαδιών από πολυστυρένιο επικαλυμμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για ανθρώπινο IL-2 Ra.
- Πρότυπο ανθρώπινου IL-2 Ra, ανασυνδυασμένος σε ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεϊνικής βάσης με συντηρητικά, λυοφιλοποιημένος.
- Συζευκτής (conjugate) ανθρώπινου IL-2 Ra, πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικού για τον ανθρώπινο IL-2Ra συζευγμένο με υπεροξειδάση αγριοράπανου (χρένου).
- Διαλύτης RD1-1, ρυθμιστικού διαλύματος πρωτεϊνικής βάσης
- Διαλύτης βαθμονομητή RD6S (calibrator), ορός ζωικής προέλευσης.
- Συμπυκνωμένο πλυστικό διάλυμα, 25 φορές συμπυκνωμένο, ρυθμιστικό διάλυμα επιφανειοδραστικού.
- Χρωμογόνο διάλυμα Α, σταθεροποιημένο με υπεροξείδιο του υδρογόνου.
- Χρωμογόνο διάλυμα Β, σταθεροποιημένο χρωμογόνο (τετραμεθυλβενζιδίνη).
- Διάλυμα τερματισμού, θειικό οξύ 2N

## **ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

### **Ορός**

- Χρησιμοποιούνται σωληνάρια ορού και τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου να πήξουν για 30 λεπτά πριν φυγοκεντρηθούν για 15 λεπτά στα 1000 x g.

Ο ορός αφαιρείται αμέσως και πραγματοποιείται άμεσα η ανάλυση ή χωρίζεται σε aliquots και αποθηκεύεται στους  $\leq -20$  °C.

### **Πλάσμα**

- Το πλάσμα συλλέγεται χρησιμοποιώντας EDTA ή ηπαρίνη ως αντιπηκτικό.

Φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στα 1000 x g εντός 30 λεπτών από τη συλλογή.

Πραγματοποιείται άμεσα η ανάλυση ή χωρίζεται σε aliquots και αποθηκεύεται στους  $\leq -20$  °C.

Το πλάσμα σε κιτρικό αντιπηκτικό δεν έχει επικυρωθεί για χρήση σε αυτή τη δοκιμασία.

## **ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

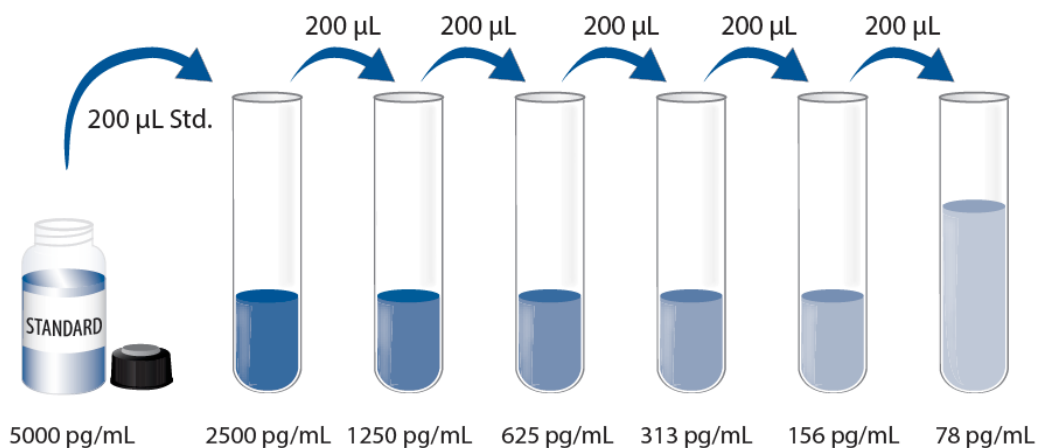
Τα δείγματα ορού και πλάσματος απαιτούν αραιώση τουλάχιστον 1:4 πριν από την ανάλυση. Μια προτεινόμενη αραιώση είναι 50  $\mu$ L δείγματος + 150  $\mu$ L αραιωτικού βαθμονομητή RD6S.

## **ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ**

### **Παρασκευή controls με διαδοχική αραιώση.**

Πιπετάρονται 200  $\mu$ L διαλύτη βαθμονομητή RD6S σε κάθε σωληνάριο. Το αποθεματικό διάλυμα (stock) χρησιμοποιείται για να δημιουργηθεί μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων (όπως φαίνεται στην εικόνα 15). Το κάθε σωληνάριο αναμιγνύεται καλά πριν από την επόμενη μεταφορά. Το μη αραιωμένο ανθρώπινο IL-2 Ra πρότυπο (5000 pg/mL) χρησιμεύει ως υψηλό πρότυπο. Ο διαλύτης βαθμονομητή RD6S χρησιμεύει ως πρότυπο μηδέν (0 pg/mL).





**Εικόνα 15:** Η σειρά διαδοχικών αραιώσεων για την παρασκευή controls sIL-2Ra

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα πρέπει να είναι σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση. Συνιστάται όλα τα πρότυπα, οι έλεγχοι και τα δείγματα να αναλύονται σε εις διπλούν (duplicates).

1 Όλα τα αντιδραστήρια, τα δείγματα και τα πρότυπα εργασίας προετοιμάζονται σύμφωνα με τις οδηγίες στις προηγούμενες ενότητες.

2. Οι περιττές σειρές μικροπηγαδίων απομακρύνονται από το πλαίσιο της πλάκας, φυλάσσονται στη θήκη με τον ξηραντήρα και σφραγίζεται καλά.

3. Προστίθενται 100 μL διαλύματος RD1-1 σε κάθε πηγαδάκι.

4. Προστίθενται 50 μL πρότυπου, δείγματος ελέγχου ή δείγματος ανά πηγαδάκι.

Η διαδικασία προχωρά στο επόμενο βήμα, χωρίς επώαση ή πλύσιμο.

5. Προστίθενται 100 μL συζευκτής ανθρώπινου IL-2Ra σε κάθε πηγαδάκι. Η πλάκα ανακατεύεται ελαφρά χτυπώντας την και στις τέσσερις πλευρές και καλύπτεται με την παρεχόμενη κολλητική ταινία. Επωάζεται για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

6. Ακλουθούν 4 κύκλοι πλύσης με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σε ειδικό πλυστικό μηχάνημα για μικροπλάκες. Η πλήρης απομάκρυνση του υγρού σε κάθε βήμα είναι απαραίτητη για την καλή απόδοση. Μετά την τελευταία πλύση, αφαιρείται το υπόλοιπο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης με αναρρόφηση, πλάκα αναποδογυρίζεται και στεγνώνει καλά με καθαρές χαρτοπετσέτες.

7. Προστίθενται 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος υποστρώματος σε κάθε πηγαδάκι. Ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.

8. Προστίθενται 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος τερματισμού σε κάθε πηγαδάκι. Το χρώμα στα πηγαδάκια θα πρέπει να αλλάζει από μπλε σε κίτρινο. Εάν το χρώμα παραμένει πράσινο ή η αλλαγή χρώματος δεν φαίνεται ομοιόμορφη, η πλάκα ανακινείται απαλά για να εξασφαλιστεί η καλή ανάμιξη.

9. Η οπτική πυκνότητα κάθε πηγαδιού προσδιορίζεται μέσα σε 30 λεπτά, χρησιμοποιώντας έναν αναγνώστη μικροπλακιδίων ρυθμισμένο στα 450 nm. Εάν είναι διαθέσιμη διόρθωση μήκους κύματος, ρυθμίζεται στα 540 nm ή στα 570 nm. Εάν η διόρθωση μήκους κύματος δεν είναι διαθέσιμη, αφαιρούνται οι μετρήσεις στα 540 nm ή στα 570 nm από τις μετρήσεις στα 450 nm. Αυτή η αφαίρεση θα διορθώσει τις οπτικές ατέλειες στην πλάκα. Οι μετρήσεις που γίνονται απευθείας στα 450 nm χωρίς διόρθωση μπορεί να είναι υψηλότερες και λιγότερο ακριβείς.

#### **ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Από το μέσο όρο των διπλότυπων (duplicate) αναγνώσεων για κάθε πρότυπο, έλεγχο και δείγμα, αφαιρείται η μέση μηδενική πρότυπη οπτική πυκνότητα.

Χρησιμοποιώντας λογισμικό υπολογιστή ικανό να δημιουργήσει λογιστική καμπύλη τεσσάρων παραμέτρων (4-PL), δημιουργείται η τυποποιημένη καμπύλη Εναλλακτικά, κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη σχεδιάζοντας τη μέση απορρόφηση για κάθε πρότυπο στον άξονα y έναντι της συγκέντρωσης στον άξονα x και σχεδιάζεται η καλύτερη καμπύλη μέσα από τα σημεία στο γράφημα. Τα δεδομένα μπορούν να γραμμικοποιηθούν με γραφική παράσταση του  $\log$  των συγκεντρώσεων του ανθρώπινου IL-2 Ra έναντι του  $\log$  της μέσης μηδενικής πρότυπης οπτικής πυκνότητας και η καλύτερη γραμμή προσαρμογής μπορεί να προσδιοριστεί με ανάλυση παλινδρόμησης.

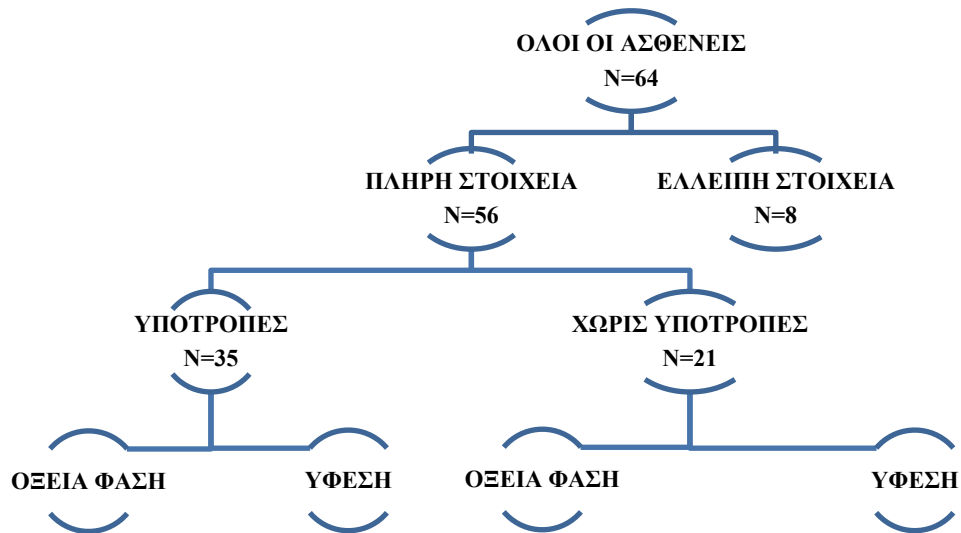
Δεδομένου ότι τα δείγματα έχουν αραιωθεί, η συγκέντρωση που διαβάζεται από την τυπική καμπύλη πρέπει να πολλαπλασιαστεί με τον συντελεστή αραιώσης.

## 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 6.1 Λειτουργικότητα ADAMTS-13 και τιμές ανασταλτή ADAMTS-13

Από τα σύνολο των 64 ασθενών με ΘΘΠ που παρακολουθούνται στο ΓΝΑ «Λαϊκό» μας, για τους 56 υπάρχουν πλήρη στοιχεία που αφορούν δημογραφικά δεδομένα, ιστορικό, εργαστηριακές μετρήσεις αιμοσφαιρίνης, αιμοπεταλίων, LDH, κρεατινίνης και INR. Σε αυτούς τους ασθενείς μετρήθηκαν η δραστικότητα της ADAMTS-13 και του ανασταλτή της ADAMTS-13 κατά την οξεία φάση του συνδρόμου και στην ύφεση. Τα δείγματα προήλθαν από πλάσμα σε κιτρικό αντιπηκτικό, χωρισμένα σε aliquots, φυλασσόμενα στους  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, σε αυτούς με συχνές υποτροπές και σε αυτούς χωρίς (διάγραμμα 8).

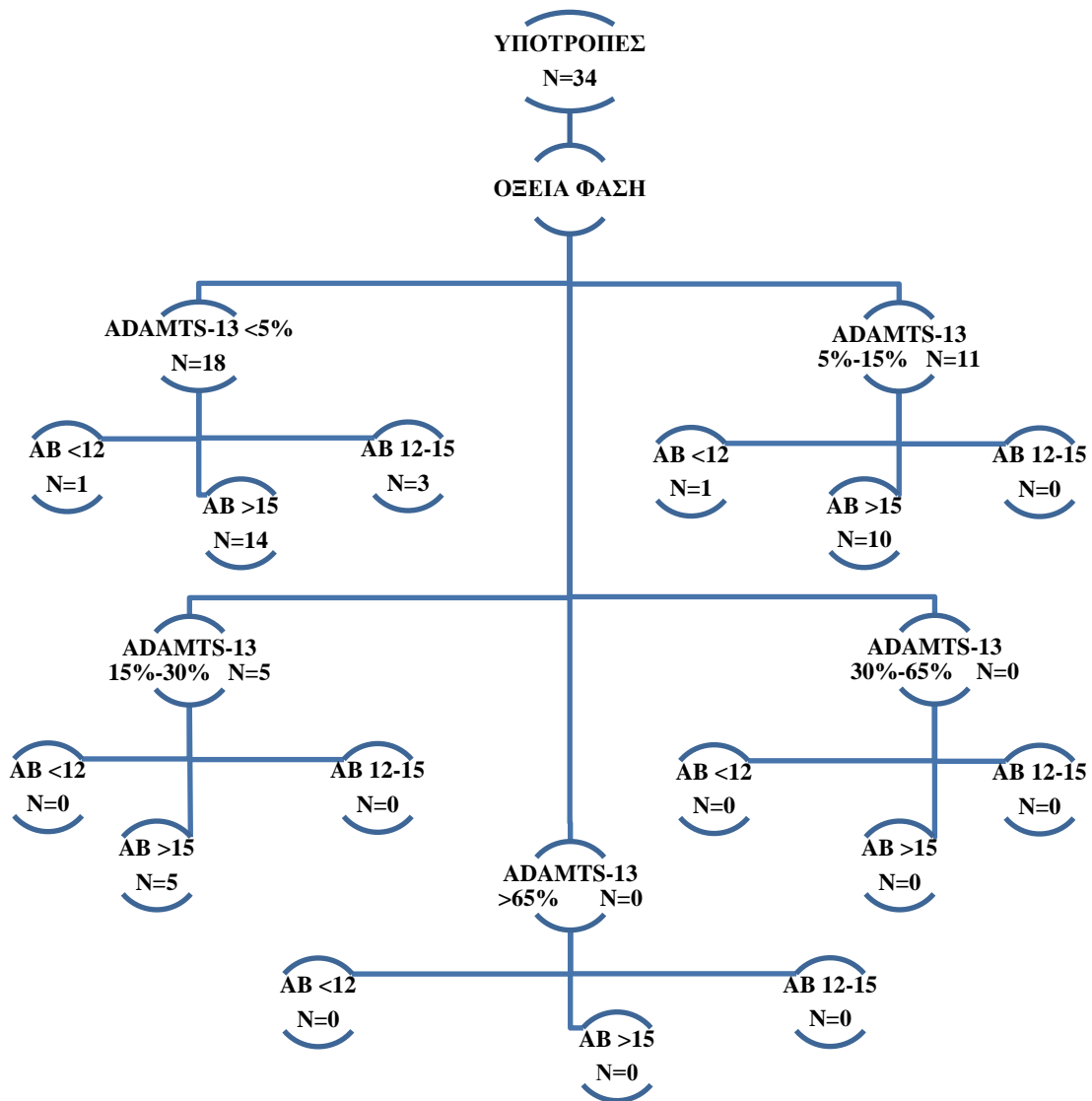
**Διάγραμμα 8.** Ταξινόμηση ασθενών με ΘΘΠ, ανάλογα με την πληρότητα στοιχείων και τις υποτροπές.



Στην οξεία φάση, οι ασθενείς με υποτροπές (N=35), στην πλειονότητά τους (N=29), είχαν δραστικότητα ADAMTS-13  $<15\%$  και μάλιστα οι 18 εξ' αυτών,  $<5\%$ . Στους υπόλοιπους 5 ασθενείς η δραστικότητα του ενζύμου ήταν  $15\%-30\%$ . Θετικό ανασταλτή έναντι της ADAMTS-13 ( $>15\text{ U/mL}$ ) είχαν οι 29 από τους 35 ασθενείς. Σε 3 ασθενείς οι

τιμές του ήταν στη γκριζα ζώνη (12-15 U/mL), ενώ 2 ασθενείς, 1 με ADAMTS-13 <5% και 1 με ADAMTS-13 5%-15% αντίστοιχα, είχαν αρνητικό ανασταλή (<12U/mL) (διάγραμμα 9). Μια ασθενής δεν είχε μετρήσεις στην οξεία φάση, καθώς και η πρωτοδιάγνωση και η υποτροπή της είχαν συμβεί όταν δεν διαθέσιμα εμπορικά κιτ για τη μέτρηση της δραστικότητας της ADAMTS-13 και του ανασταλή της.

**Διάγραμμα 9.** Η δραστικότητα της ADAMTS-13 και τα επίπεδα του ανασταλή της ADAMTS-13 στην οξεία φάση ασθενών με υποτροπές ΘΘΠ.

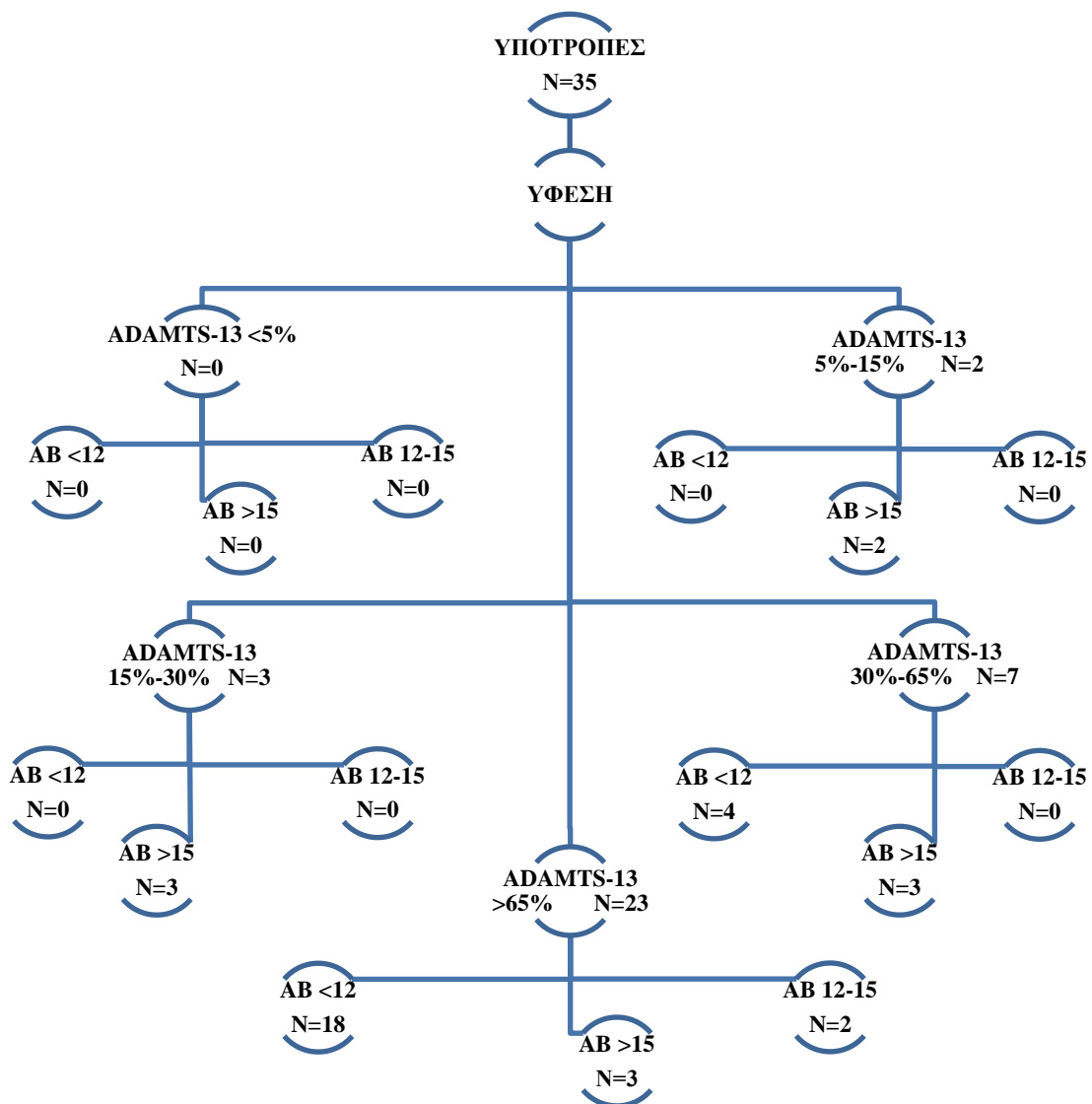


Αντίστοιχα, στην ύφεση, η πλειονότητα των ασθενών (N=30), είχαν δραστικότητα ADAMTS-13 >30% και μάλιστα οι 23, >65%. Στους υπόλοιπους 5 ασθενείς η δραστικότητα

του ενζύμου ήταν 15%-30%.

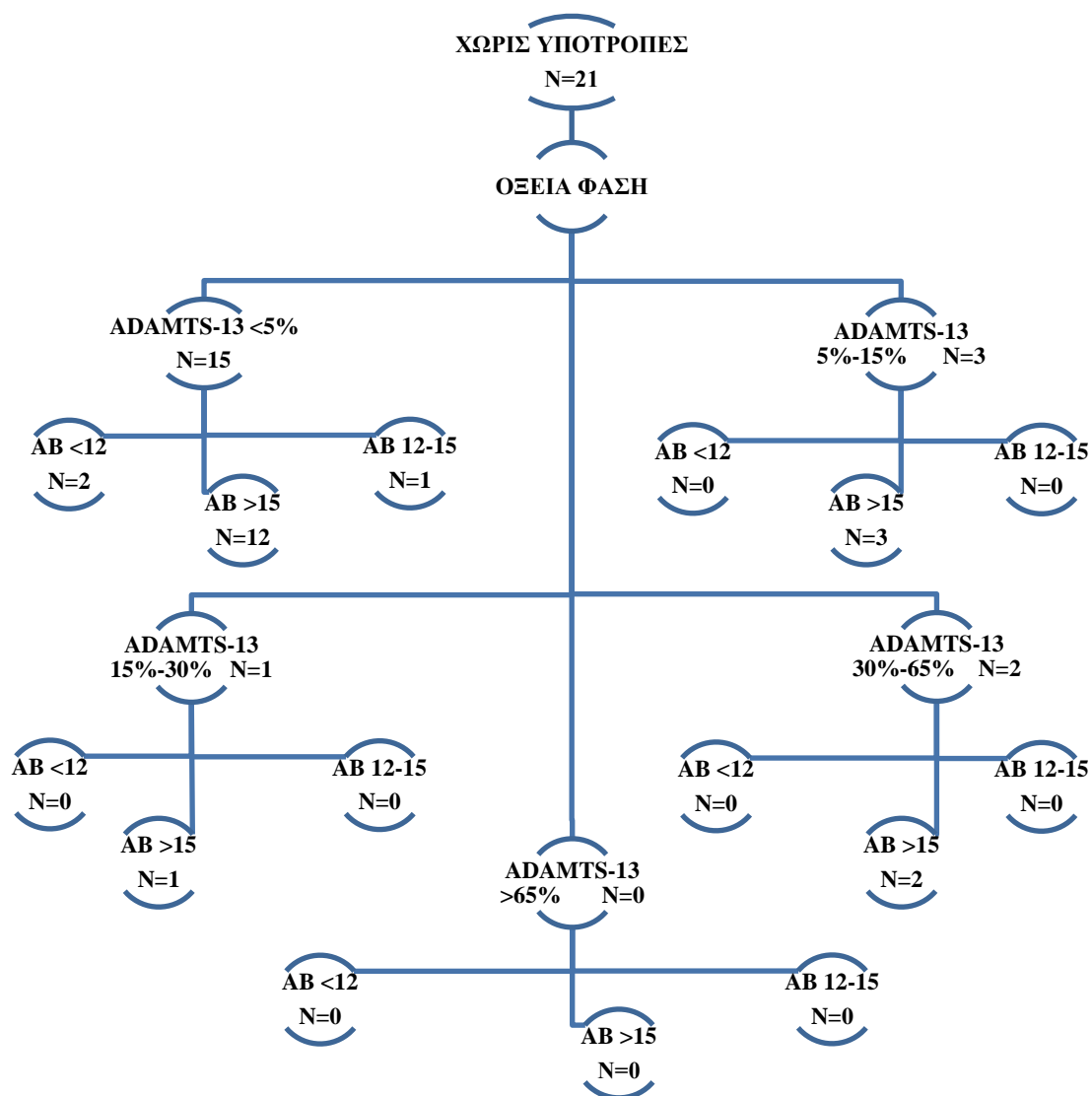
Αρνητικό ανασταλτή έναντι της ADAMTS-13 (<12 U/mL) είχαν οι 22 από τους 35 ασθενείς. Σε 2 ασθενείς οι τιμές του ήταν στη γκριζα ζώνη (12-15 U/mL), ενώ αξιοσημείωτο είναι ότι 11 ασθενείς είχαν θετικό ανασταλτή (>15U/mL), οι 5 με ADAMTS-13 <30% (οι 2 5%-15% και οι 3 15%-30%) και 6 με ADAMTS-13 >30% (οι 3 30%-65% και 3 >65%), αντίστοιχα (διάγραμμα 10).

**Διάγραμμα 10.** Η δραστηριότητα της ADAMTS-13 και τα επίπεδα του ανασταλτή της ADAMTS-13 στην ύφεση ασθενών με υποτροπές ΘΘΠ.



Στην οξεία φάση ασθενών χωρίς υποτροπές (N=21), το 86% αυτών (N=18), είχαν δραστηριότητα ADAMTS-13 <15% με 15 εξ' αυτών, <5%. Από τους υπόλοιπους 3 ασθενείς, σε 1 ασθενή η δραστηριότητα του ενζύμου ήταν 15%-30%, ενώ σε 2 ήταν 30%-65%. Θετικό ανασταλή έναντι της ADAMTS-13 (>15 U/mL) είχαν οι 18 από τους 21 ασθενείς. Σε 1 ασθενή η τιμή του ήταν στη γκριζα ζώνη (12-15 U/mL), ενώ 2 ασθενείς, αμφότεροι με ADAMTS-13 <5%, είχαν αρνητικό ανασταλή (<12U/mL) (διάγραμμα 11).

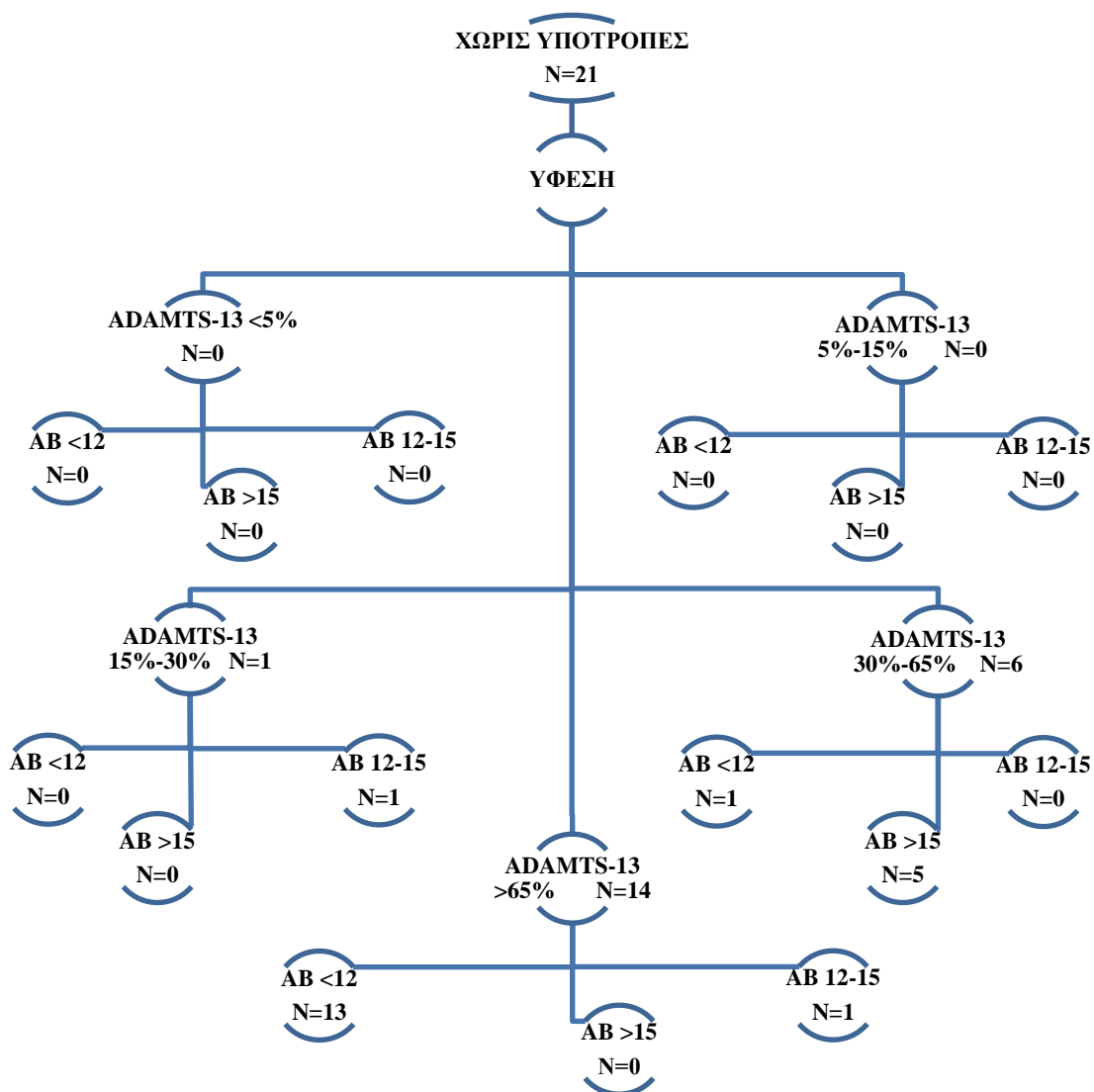
**Διάγραμμα 11.** Η δραστηριότητα της ADAMTS-13 και τα επίπεδα του ανασταλή της ADAMTS-13 στην οξεία φάση ασθενών χωρίς υποτροπές ΘΘΠ.



Στην ύφεση, αντίστοιχα, το 95% των ασθενών (N=20), είχαν δραστηριότητα

ADAMTS-13 >30% και μάλιστα οι 14, >65%. Ένας μόνο ασθενής είχε δραστικότητα ενζύμου 15%-30%. Αρνητικό αναστατή έναντι της ADAMTS-13 (<12 U/mL) είχαν τα 2/3 των ασθενών (N=14). Δύο ασθενείς είχαν τιμές αναστατή στη γκρίζα ζώνη (12-15 U/mL), ενώ 5 ασθενείς είχαν θετικό αναστατή (>15U/mL). Και οι 5 αυτοί ασθενείς είχαν δραστικότητα ADAMTS-13 30%-65% (διάγραμμα 12).

**Διάγραμμα 12.** Η δραστικότητα της ADAMTS-13 και τα επίπεδα του αναστατή της ADAMTS-13 στην ύφεση ασθενών χωρίς υποτροπές ΘΘΠ.



Στους πίνακες που ακολουθούν εμφανίζονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των ασθενών (φύλο, ηλικία διάγνωσης, δραστικότητα ADAMTS-13 και οι τιμές του αναστατή της).

**Πίνακας 13.** Χαρακτηριστικά των ασθενών με υποτροπιάζουσα ΘΘΠ

Α/Α	Φύλο	Ηλικία διάγν.	Υποτροπές	Δραστικότητα ADAMTS-13 (%)		Τιμές ADAMTS-13 INH (U/mL)	
				Οξεία φάση	Υφεση	Οξεία φάση	Υφεση
1	ΑΡΡΕΝ	35	ΝΑΙ	<5	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
2	ΘΗΛΥ	38	ΝΑΙ	<5	5-15	>15 (Pos.)	>15 (Pos.)
3	ΑΡΡΕΝ	24	ΝΑΙ	15-30	30-65	>15 (Pos.)	>15 (Pos.)
4	ΘΗΛΥ	44	ΝΑΙ	<5	30-65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
5	ΑΡΡΕΝ	44	ΝΑΙ	5-15	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
6	ΑΡΡΕΝ	30	ΝΑΙ	<5	30-65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
7	ΘΗΛΥ	27	ΝΑΙ	<5	>65	12-15 (grey z.)	<12 (Neg.)
8	ΑΡΡΕΝ	20	ΝΑΙ	<5	>65	<12 (Neg.)	<12 (Neg.)
9	ΘΗΛΥ	38	ΝΑΙ	<5	>65	12-15 (grey z.)	<12 (Neg.)
10	ΑΡΡΕΝ	40	ΝΑΙ	<5	>65	12-15 (grey z.)	<12 (Neg.)
11	ΑΡΡΕΝ	25	ΝΑΙ	5-15	15-30	>15 (Pos.)	>15 (Pos.)
12	ΑΡΡΕΝ	33	ΝΑΙ	<5	>65	>15 (Pos.)	12-15 (grey z.)
13	ΑΡΡΕΝ	37	ΝΑΙ	<5	5-15	>15 (Pos.)	>15 (Pos.)
14	ΘΗΛΥ	9	ΝΑΙ	15-30	>65	>15 (Pos.)	>15 (Pos.)
15	ΘΗΛΥ	47	ΝΑΙ	5-15	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
16	ΑΡΡΕΝ	41	ΝΑΙ	5-15	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
17	ΑΡΡΕΝ	45	ΝΑΙ	<5	30-65	>15 (Pos.)	>15 (Pos.)
18	ΘΗΛΥ	17	ΝΑΙ	5-15	>65	<12 (Neg.)	<12 (Neg.)
19	ΘΗΛΥ	37	ΝΑΙ	5-15	>65	>15 (Pos.)	>15 (Pos.)
20	ΑΡΡΕΝ	28	ΝΑΙ	<5%	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
21	ΘΗΛΥ	38	ΝΑΙ	5-15	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
22	ΘΗΛΥ	63	ΝΑΙ	<5	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
23	ΘΗΛΥ	20	ΝΑΙ	5-15	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
24	ΘΗΛΥ	18	ΝΑΙ	<5	30-65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
25	ΘΗΛΥ	35	ΝΑΙ	<5	>65	>15 (Pos.)	>15 (Pos.)
26	ΘΗΛΥ	44	ΝΑΙ	<5	>65	>15 (Pos.)	12-15 (grey z.)
27	ΘΗΛΥ	63	ΝΑΙ	5-15	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
28	ΘΗΛΥ	32	ΝΑΙ	15-30	30-65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
29	ΑΡΡΕΝ	31	ΝΑΙ	<5	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
30	ΘΗΛΥ	61	ΝΑΙ	15-30	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
31	ΘΗΛΥ	28	ΝΑΙ	<5	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
32	ΘΗΛΥ	20	ΝΑΙ	-	15-30	-	>15 (Pos.)
33	ΘΗΛΥ	49	ΝΑΙ	5-15	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
34	ΑΡΡΕΝ	40	ΝΑΙ	15-30	15-30	>15 (Pos.)	>15 (Pos.)
35	ΘΗΛΥ	28	ΝΑΙ	5-15	30-65	>15 (Pos.)	>15 (Pos.)



**Πίνακας 14.** Χαρακτηριστικά των ασθενών ΘΘΠ χωρίς υποτροπές

Α/Α	Φύλο	Ηλικία διάγν.	Υπο-τροπές	Δραστικότητα ADAMTS-13 (%)		Τιμές ADAMTS-13 INH (U/mL)	
				Οξεία φάση	Ύφεση	Οξεία φάση	Ύφεση
1	ΘΗΛΥ	54	ΟΧΙ	5-15	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
2	ΑΡΡΕΝ	42	ΟΧΙ	<5	30%-65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
3	ΘΗΛΥ	55	ΟΧΙ	<5	>65	<12 (Neg.)	<12 (Neg.)
4	ΘΗΛΥ	36	ΟΧΙ	<5	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
5	ΑΡΡΕΝ	58	ΟΧΙ	<5	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
6	ΑΡΡΕΝ	35	ΟΧΙ	<5	30-65	>15 (Pos.)	>15 (Pos.)
7	ΘΗΛΥ	35	ΟΧΙ	5-15	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
8	ΘΗΛΥ	45	ΟΧΙ	15-30	15-30	>15 (Pos.)	12-15 (grey z.)
9	ΑΡΡΕΝ	57	ΟΧΙ	30-65	30-65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
10	ΘΗΛΥ	34	ΟΧΙ	<5	>65	12-15 (grey z.)	<12 (Neg.)
11	ΘΗΛΥ	37	ΟΧΙ	<5	30-65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
12	ΘΗΛΥ	29	ΟΧΙ	30-65	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
13	ΑΡΡΕΝ	44	ΟΧΙ	<5	>65	<12 (Neg.)	<12 (Neg.)
14	ΑΡΡΕΝ	47	ΟΧΙ	<5	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
15	ΘΗΛΥ	40	ΟΧΙ	<5	>65	>15 (Pos.)	12-15 (grey z.)
16	ΘΗΛΥ	48	ΟΧΙ	<5	30-65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
17	ΑΡΡΕΝ	37	ΟΧΙ	5-15	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
18	ΑΡΡΕΝ	33	ΟΧΙ	<5	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
19	ΘΗΛΥ	23	ΟΧΙ	<5	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
20	ΑΡΡΕΝ	46	ΟΧΙ	<5	>65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)
21	ΑΡΡΕΝ	51	ΟΧΙ	<5	30-65	>15 (Pos.)	<12 (Neg.)

## 6.2 Επίπεδα sIL-2Ra σε ασθενείς με ΘΘΠ

Όσον αφορά τις μετρήσεις του οροδιαλυτού υποδοχέα IL-2, τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν τα ακόλουθα. Ελέγχθηκαν 11 ασθενείς τόσο στην οξεία φάση όσο και σε ύφεση. Οι 6 είχαν υψηλότερα επίπεδα sIL-2Ra στην οξεία φάση, ενώ οι 5 στην ύφεση (πίνακας 15). Όλοι οι ασθενείς είχαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και την στατιστική ανάλυση στο πρόγραμμα IBM SPSS, με τη μέθοδο t-test, προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0.021$  και  $p=0.024$ , αντίστοιχα) όταν συγκρίθηκαν οι τιμές sIL-r με το control. Στη σύγκριση των τιμών στην οξεία φάση και την ύφεση, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p>0.5$ ). Η

μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση, δεν έχει επικυρωθεί για δείγματα σε κιτρικό αντιπηκτικό, όπως ήταν τα δείγματα που μετρήθηκαν. Ελήφθησαν δείγματα από υγιείς δότες, τόσο σε EDTA αντιπηκτικό, όσο και σε αντιπηκτικό κιτρικού νατρίου, προκειμένου να ελεγχθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, αλλά και για να χρησιμεύσουν ως ομάδα control (πίνακας 16). Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές στα δείγματα με κιτρικό αντιπηκτικό ήταν σταθερά χαμηλότερες κατά 13% περίπου. Δεδομένου ότι τα δείγματα των ασθενών που μετρήθηκαν, προήλθαν από πλάσμα με κιτρικό αντιπηκτικό, οι τιμές τους διορθώθηκαν με τον συντελεστή σφάλματος (πίνακας 15).

**Πίνακας 15.** Επίπεδα sIL-2Ra σε ασθενείς με ΘΘΠ

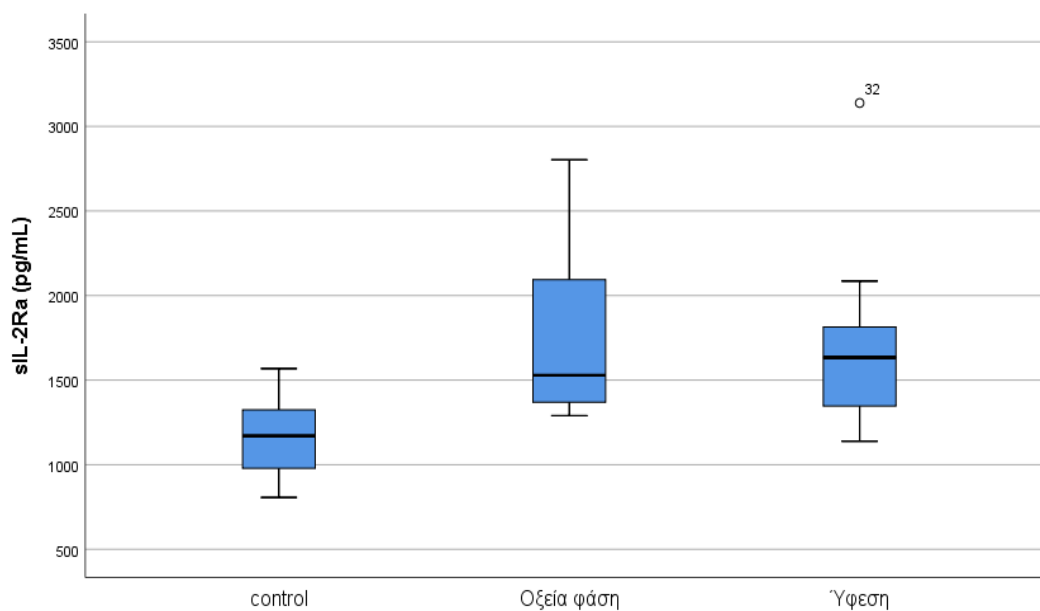
A/A	ΟΞΕΙΑ ΦΑΣΗ (pg/mL)	ΥΦΕΣΗ (pg/mL)	ΟΞΕΙΑ ΦΑΣΗ (pg/mL) (διορθ.)	ΥΦΕΣΗ (pg/mL) (διορθ.)
1	1365	1162	1529	1301
2	1298	1459	1454	1634
3	1214	1862	1360	2085
4	1232	1161	1380	1300
5	1485	1532	1663	1716
6	1584	1325	1774	1484
7	1165	1016	1305	1138
8	1152	1243	1290	1392
9	2392	1509	2679	1690
10	2503	2802	2803	3138
11	2156	1708	2415	1913
Mean	1595	1525	1787	1708

**Πίνακας 16.** Επίπεδα sIL-2Ra σε δείγματα με EDTA και κιτρικό αντιπηκτικό στην ομάδα ελέγχου

A/A	EDTA (pg/mL)	CITRIC (pg/mL)
<b>1</b>	<b>1171</b>	<b>1058</b>
<b>2</b>	<b>1338</b>	<b>1169</b>
<b>3</b>	<b>1302</b>	<b>1150</b>
<b>4</b>	<b>1568</b>	<b>1406</b>
<b>5</b>	<b>1378</b>	<b>1229</b>
<b>6</b>	<b>1310</b>	<b>1153</b>
<b>7</b>	<b>1033</b>	<b>909</b>
<b>8</b>	<b>1043</b>	<b>918</b>
<b>9</b>	<b>806</b>	<b>709</b>
<b>10</b>	<b>827</b>	<b>728</b>
<b>11</b>	<b>924</b>	<b>813</b>
<b>Mean</b>	<b>1155</b>	<b>1022</b>

Φαίνεται, ωστόσο, να υπάρχει μια αύξηση των τιμών τόσο στην οξεία φάση, όσο και στην ύφεση, σε σχέση με την ομάδα control, όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα.

**Διάγραμμα 13.** Τα επίπεδα του sIL-2Ra στην ομάδα ελέγχου (υγιείς δότες) και σε ασθενείς (στην οξεία φάση και σε ύφεση)



## 7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (ΘΘΠ) ανήκει με μια ομάδα συνδρόμων, με κύριο χαρακτηριστικό τη θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια (ΘΜΑ). Η ΘΜΑ προκαλείται από εκτεταμένες θρομβώσεις και ενδοθηλιακές βλάβες μικρών αγγείων (μικροαγγειοπάθεια) που οδηγεί σε μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία (ΜΑΑΑ), θρομβοπενία εκ κατανώσεως, και ισχαιμική βλάβη οργάνων. Η ΘΘΠ οφείλεται στη μειωμένη δραστηριότητα της ADAMTS-13, μιας μεταλλοπρωτεάσης που διασπά τα πολύ μεγάλου μοριακού βάρους πολυμερή του παράγοντα von Willebrand. Η μειωμένη δραστηριότητα της ADAMTS-13 μπορεί να είναι κληρονομική ή επίκτητη. Η κληρονομική ΘΘΠ οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου ADAMTS-13. Η επίκτητη ΘΘΠ οφείλεται σε αντι-ADAMTS13 ανασταλτικά αυτοαντισώματα.

Αξιολογήθηκαν τα δημογραφικά χαρακτηριστικά 64 ασθενών με ΘΘΠ που παρακολουθούνται στη Μονάδα Αφαιρέσεων «Κ. Μαρκάκης» στο ΓΝΑ «Λαϊκό», από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 μέχρι σήμερα. Έγινε συλλογή και επεξεργασία επιδημιολογικών δεδομένων και εργαστηριακών εξετάσεων των ανωτέρω ασθενών με σκοπό τη συστηματική καταγραφή και τη δημιουργία βάσης δεδομένων. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν η δραστηριότητα της ADAMTS-13 και του ανασταλτή της σε 56 ασθενείς, στην οξεία φάση του συνδρόμου και στην ύφεση. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού [fluorescence resonance energy transfer (FRET)] και η ποσοτική ανοσοενζυμική τεχνική ανίχνευσης ανθρώπινων αυτοαντισωμάτων (IgG) έναντι της ADAMTS-13, αντίστοιχα. Τέλος, σε 11 ασθενείς, και στην οξεία φάση και στην ύφεση, μετρήθηκαν τα επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα IL-2 με ποσοτική τεχνική ανοσοπροσδιορισμού τύπου σάντουιτς. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα εργαστήρια της αιμοδοσίας του ΓΝΑ «Λαϊκό».

Ξεκινώντας από τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών, επιβεβαιώνονται τα δεδομένα που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία, ότι δηλαδή στις γυναίκες η συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι περίπου διπλάσια σε σχέση με τους άνδρες. [15] Συγκεκριμένα, από το σύνολο των ασθενών (N=64), το 63% είναι γυναίκες και 37% άνδρες (αναλογία 1,7:1). Η μέση ηλικία πρωτοδιάγνωσης στο σύνολο των ασθενών είναι τα 37,8 έτη, (για τις γυναίκες τα 37, ενώ για τους άνδρες τα 39 έτη). Τα στοιχεία αυτά συμφωνούν με τις διεθνείς

αναφορές όπου η μέση ηλικία πρωτοδιάγνωσης τοποθετείται γύρω στα 40 έτη. [3] Τα παραπάνω δεδομένα ενισχύονται και από το γεγονός στα 39 από τα 64 περιστατικά ΘΘΠ (61%) τέθηκε διάγνωση στην ηλικιακή ομάδα των 30-50 ετών (N=22, 30-40 ετών και N=17, 40-50 ετών).

Τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας επιβεβαιώνονται επίσης και όσον αφορά ποσοστό των ασθενών των οποίων το σύνδρομο είναι ιδιοπαθές (87%, N=56) ή δευτεροπαθές (13%, N=8). [6, 8] Στους τελευταίους, οι πυροδοτικοί μηχανισμοί ποικίλλουν, με πιο συχνό κάποιο άλλο υποκείμενο αυτοάνοσο νόσημα (ρευματοειδής αρθρίτιδα, μεικτή νόσος κολλαγόνου) και ακολουθούν ψύχωση, φάρμακα (ναρκωτικά-κοκαΐνη), παγκρεατίτιδα και κύηση. Δεν πρέπει να αποκλειστεί το γεγονός ότι μπορεί στο μέλλον κάποιος από τους ασθενείς να εμφανίσει κάποιο μηχανισμό, άγνωστο ακόμα, που να δικαιολογεί την έναρξη του συνδρόμου.

Η πλειονότητα των ασθενών (N=41, 64%) πάσχει από υποτροπιάζουσα μορφή της νόσου, με αποτέλεσμα τις συχνές υποτροπές, ενώ το υπόλοιπο 36% (N=23) δεν έχει υποτροπιάσει, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν πρόκειται να συμβεί κάποια στιγμή στη ζωή τους. Υπάρχουν άλλωστε ασθενείς που παρακολουθούνται στο Νοσοκομείο μας και που υπέστησαν υποτροπή μετά από 15 χρόνια από τη πρωτοδιάγνωση. Στη θεραπευτική φαρέτρα αντιμετώπισης της νόσου, τα τελευταία 15 χρόνια, εκτός της κλασικής golden standard θεραπείας με ΘΠΑ και κορτικοστεροειδή, η οποία φαίνεται να μην απέδιδε πάντα τα αναμενόμενα, έχει χρησιμοποιηθεί το rituximab καθώς και η σπληνεκτομή, ως μέτρο μόνιμης ανοσοκαταστολής. Στο Νοσοκομείο μας, οι ασθενείς αυτοί ήταν 18 (υπό rituximab) και 8 (σπληνεκτομή), αντίστοιχα. Στους 18 ασθενείς με rituximab περιλαμβάνονται και ασθενείς στους οποίους το σύνδρομο παρουσιάζει ανθεκτικότητα και υπάρχει δυσκολία να βγουν από αυτό μόνο με ΘΠΑ και κορτιζόνη. Οι 8 ασθενείς που σπληνεκτομήθηκαν δεν παρουσίασαν ξανά υποτροπές. Επιπλέον των 8, άλλοι 2 ασθενείς που προχώρησαν σε αφαίρεση σπλήνα, μετά από κάποιο διάστημα, υποτροπίασαν ξανά. Και οι δύο έλαβαν rituximab με πολύ καλά αποτελέσματα. Η διάρκεια προστασίας που προσφέρει το rituximab σε ασθενείς με υποτροπές, αλλά και σε εκείνους που το σύνδρομο παρουσιάζει ανθεκτικότητα ξεπερνά τα 2 χρόνια. [94, 111-116] Τα στοιχεία αυτά επιβεβαιώνονται και στους δικούς μας ασθενείς. Ο ένας από τους δύο ασθενείς που προχώρησε σε σπληνεκτομή, αλλά παρόλα αυτά συνέχισε να υποτροπιάζει, πριν του χορηγηθεί rituximab, αφαίρεσε και

ένα σπληνίδιο που είχε δημιουργηθεί. Αυτός ο ασθενής, ο οποίος είχε γενικότερα βεβαρυσμένο ιατρικό ιστορικό (βαρεία αγγειοπάθεια), είναι και ο μόνος που κατέληξε λόγω υποτροπής ΘΘΠ (ποσοστό 1,6%) και αυτό διότι προσήλθε σε εφημερεύον Νοσοκομείο με πολύ μεγάλη καθυστέρηση.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η κλασική πεντάδα συμπτωμάτων ΘΘΠ περιλαμβάνει θρομβοπενία, μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία, νεφρική ανεπάρκεια, νευρολογική συνδρομή και πυρετό. Για να τεθεί η διάγνωση, δεν είναι απαραίτητη η ταυτόχρονη παρουσία όλων των συμπτωμάτων της πεντάδας. Η εργαστηριακή αξιολόγηση, κατά την προσέλευση των ασθενών, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διάγνωση της ΘΘΠ, διότι τα συμπτώματα ποικίλλουν και η βλάβη των τελικών οργάνων (κυρίως εγκέφαλος, νεφροί,) μπορεί να καθυστερήσει. Για τη διάγνωση, εργαστηριακά πρέπει να παρουσιάζεται αναιμία και θρομβοπενία μαζί με ένδειξη ενεργού ενδαγγειακής αιμόλυσης (προυσία σχιστοκυττάρων, αυξημένη έμμεση χολερυθρίνη, αυξημένη LDH και μειωμένα επίπεδα απτοσφαιρινών). Εάν υπάρχει έκπτωση νεφρικής λειτουργίας, παρατηρείται αυξημένη κρεατινίνη ορού και ουρία. Οι χρόνοι πήξης είναι φυσιολογικοί ή με μια ήπια παράταση, διαφοροποιώντας έτσι την ΘΘΠ από τη ΔΕΠ. [296] Αυτά τα στοιχεία επιβεβαιώνονται και από τα χαρακτηριστικά των ασθενών μας. Πράγματι, κανένας ασθενής δεν παρουσίασε ταυτόχρονα και τα πέντε συμπτώματα της κλασικής πεντάδας. Αντίθετα, όλοι εμφάνισαν σοβαρή θρομβοπενία και μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία, με σαφείς ενδείξεις ενεργού αιμόλυσης (σχιστοκύτταρα, αυξημένη LDH). Μόλις ένα περιστατικό, το οποίο ήταν αρκετά παραμελημένο, παρουσίασε μικρού βαθμού νεφρική ανεπάρκεια (κρεατινίνη ορού 3mg/dL). Δεύτερο πιο συχνό σύμπτωμα ήταν η δεκατική πυρετική (N=20) και τρίτο οι νευρολογικές διαταραχές (N=12). Είναι ενδεικτικό ότι το 56% των ασθενών (N=36) προσήλθε μόνο με θρομβοπενία και MAAA, ενώ 38% (N=24) παρουσίασε ένα από τα επιπλέον συμπτώματα και μόλις το 6% (N=4) είχε 4 από τα 5 συμπτώματα.

Αυτό που παρατηρείται επίσης είναι ότι οι ασθενείς που πάσχουν από υποτροπιάζουσα μορφή της νόσου, εμφανίζουν υψηλότερες τιμές αιμοσφαιρίνης, και αιμοπεταλίων κατά την προσέλευσή τους, είτε στην οξεία φάση, είτε στις υφέσεις τους (HB 9,8 g/dL και 12,3 g/dL αντίστοιχα και PLT 34 K/mL και 320 K/mL αντίστοιχα), σε σχέση με τους ασθενείς που έχουν μόνο το πρώτο επεισόδιο (HB 8 g/dL και 10,9 g/dL οξεία φάση και PLT 22 K/mL και 232 K/mL ύφεση, αντίστοιχα). Αντίστοιχα, οι ίδιοι ασθενείς

παρουσιάζουν καλύτερη εικόνα και στα επίπεδα της LDH (875 IU/L στην οξεία φάση και 239 IU/L στην ύφεση, αντίστοιχα) έναντι των ασθενών χωρίς υποτροπές (1161 IU/L και 220 IU/L, αντίστοιχα). Αυτό συμβαίνει διότι οι ασθενείς με υποτροπιάζουσα ΘΘΠ, μετά το πρώτο επεισόδιο, «μαθαίνουν» τα σημεία των υποτροπών, ευαισθητοποιούνται και προσέρχονται στα νοσοκομεία έγκαιρα, προτού τα συμπτώματα επιδεινωθούν. Κατά τον ίδιο τρόπο, και η βελτίωσή τους επιτυγχάνεται ταχύτερα (ακόμα και χωρίς ΘΠΑ, αλλά μόνο με χορήγηση FFPs) και με καλύτερα αποτελέσματα. Αντίθετα, όπως είναι αναμενόμενο, οι ασθενείς που διακομίζονται στα νοσοκομεία κατά την πρώτη προσβολή έχουν πιο βαριά εικόνα (καθυστέρηση διάγνωσης?). Στο σύνολο των ασθενών (με υποτροπές και χωρίς), στην οξεία φάση, δεν παρατηρείται ουσιαστική διαφορά όσον αφορά τα επίπεδα της κρεατινίνης (0,97 mg/dL και 0,9 mg/dL, αντίστοιχα) ή τους χρόνους πήξης (INR 1,12 και 1,08, αντίστοιχα). Αυτό συμβαίνει διότι, έτσι και αλλιώς, και οι δυο αυτές παράμετροι, δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα κατά την οξεία φάση του συνδρόμου. Και ενώ η έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας είναι ένα από τα σημεία της κλασικής πεντάδας συμπτωμάτων της ΘΘΠ, στους συγκεκριμένους ασθενείς, δεν συναντάται αυτή η εικόνα παρά μόνο σε ένα, παραμελημένο, περιστατικό (κρεατινίνη ~3 mg/dL).

Οι τιμές της δραστηριότητας της ADAMTS-13 στην οξεία φάση ασθενών (N=34, ένας ασθενής δεν είχε τιμές στην οξεία φάση) με υποτροπιάζουσα ΘΘΠ, ήταν <15% στο 86% των περιστατικών (N=29) και μάλιστα στους 18, <5%. Από αυτούς τους 29 ασθενείς, οι 24 είχαν θετικό αντίσωμα. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα είναι ισχυρές ενδείξεις για τεθεί η διάγνωση της ΘΘΠ. Οι άλλοι 5 ασθενείς παρουσιάζουν δραστηριότητα ADAMTS-13 15-30%, και θετικό αντίσωμα. Συνήθως τέτοιες τιμές δραστηριότητας της μεταλλοπρωτεάσης συναντώνται στις υποτροπές, πριν η εικόνα του ασθενούς επιδεινωθεί βαριά.[1, 8, 297]

Αντίστοιχα στην ύφεση των ίδιων ασθενών (N=35), το 86% (N=30) η δραστηριότητα της ADAMTS-13 μετρήθηκε πάνω από 30% και μάλιστα στους 23 από τους 35, >65% (ποσοστό ~66%). Οι 22 από αυτούς είχαν αρνητικό αντίσωμα, ενώ 2 ήταν στην γκρίζα ζώνη. Αποτελεί στοιχείο άξιο αναφοράς ότι υπάρχουν 6 ασθενείς από τους 30 με ADAMTS-13 >30%, που έχουν θετικό αντίσωμα. Στους υπόλοιπους 5 ασθενείς τα επίπεδα της μεταλλοπρωτεάσης ήταν 5-30% και μάλιστα, όλοι τους είχαν θετικό αντίσωμα. Παρόλα αυτά οι ασθενείς αυτοί είχαν βγει από το σύνδρομο. Μια ασθενής δε, έχει σταθεροποιηθεί μόνιμα σε αυτές τιμές, χωρίς όμως να νοσεί. Υπάρχει αντίστοιχα και μία άλλη περίπτωση

ασθενούς, η οποία, αν και είχε προχωρήσει σε σπληνεκτομή, εντούτοις, το αντίσωμα έναντι της ADAMTS-13 βρίσκεται πάντα θετικό (ADAMT-13 >50%).

Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και στα περαστικά ασθενών χωρίς υποτροπές (N=21). Στην οξεία φάση της νόσου, το 86% (N=18) των ασθενών είχαν επίπεδα δραστηριότητας ADAMTS-13 <15% (οι 15, 71%, <5%). Από τους 18, οι 15 (83%) είχαν θετικό αντίσωμα, οι 2 αρνητικό και 1 στη γκριζα ζώνη. Υπήρχαν και 3 περιστατικά με ADAMTS-13 15%-65% και οι 3 όμως είχαν θετικό αντίσωμα. Αντίστοιχα, στην ύφεση, οι 20 από τους 21 ασθενείς (95%) είχαν επίπεδα δραστηριότητας της μεταλλοπρωτεάσης >30% (οι 14, >65%). Αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός ότι οι 5 από τους 21 (~24%) κρατούσαν θετικό αντίσωμα κατά την ύφεση, ενώ άλλοι 2 στη γκριζα ζώνη.

Η σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13 συνήθως συνδέεται με ιδιοπαθή νόσο, ενώ οι περισσότεροι ασθενείς με δευτεροπαθή ΘΘΠ (μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, εγκυμοσύνη, αιματηρή διάρροια, HIV λοίμωξη, άλλα αυτοάνοσα νοσήματα και κακοήθειες) έχουν ανιχνεύσιμα ή και κανονικά επίπεδα ADAMTS-13 κατά την πρωτοδιάγνωση.

Οι παρατηρήσεις μας συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία [1], ότι δηλαδή οι ασθενείς μπορεί να έχουν παρατεταμένες περιόδους σοβαρής ανεπάρκειας ADAMTS-13 χωρίς οξύ επεισόδιο ΘΘΠ. Η σοβαρή ανεπάρκεια ADAMTS-13 μπορεί να είναι απαραίτητη για την εμφάνιση οξέων επεισοδίων ΘΘΠ, αλλά η σοβαρή ανεπάρκειά της μπορεί να μην είναι επαρκής για να προκαλέσει την εμφάνιση επεισοδίου. Πρόσθετες καταστάσεις που σχετίζονται με φλεγμονή ή λοίμωξη μπορούν να συμβάλουν στην εμφάνιση επεισοδίου σε ασθενείς με επίκτητη ΘΘΠ.

Έτσι, η μέτρηση της δραστηριότητας της ADAMTS-13 είναι σημαντική για την πρόγνωση και παρακολούθηση των ασθενών με επίκτητη ΘΘΠ. Η ταξινόμηση αυτών των ασθενών σε ασθενείς με σοβαρή ανεπάρκεια ADAMTS-13 και σε ασθενείς με ήπια ανεπάρκεια ADAMTS-13, δυσχεραίνεται από τις ΘΠΑ και/ή τη θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά (οξεία φάση), γι' αυτό και η μέτρηση της ADAMTS-13 πρέπει να γίνεται σε δείγμα ασθενούς πριν την έναρξη της θεραπείας. Η μέτρηση της μεταλλοπρωτεάσης μπορεί επίσης να είναι χρήσιμη κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης του ασθενούς σε ύφεση, καθώς η μείωση της τιμής της έχει αποδειχθεί ότι είναι ενδεικτική πιθανής υποτροπής.[1, 93, 298]



Για τους ασθενείς που βρίσκονται σε ύφεση, είτε πάσχουν από υποτροπιάζουσα μορφή της νόσου, είτε όχι, και διατηρούν θετικό αντίσωμα (N=18, 33%), υπάρχουν κάποιες υποθέσεις που όμως χρειάζονται περαιτέρω τεκμηρίωση.

Κατ' αρχήν, η ίδια η φύση της ΘΘΠ, ενός αυτοάνοσου νοσήματος, είναι πολυπαραγοντική, άρα δεν αρκεί μόνο η θετικοποίηση του αντισώματος για να οδηγήσει σε πιθανή υποτροπή. Έχουν περιγραφεί άλλωστε, δύο τύποι αντι-ADAMTS-13 αντισωμάτων, ένας με ανασταλτική (εξουδετερωτική) δράση έναντι της πρωτεολυτικής δραστηριότητας της ADAMTS-13 [27, 28] και ο άλλος συνδεδεμένος με τη μεταλλοπρωτεάση, επιταχύνει την κάθαρση από το πλάσμα μέσω οψωνισμού ή/και άλλων μη καθορισμένων μηχανισμών (μη εξουδετέρωση) [299]. Και οι δύο αυτοί τύποι μπορεί να είναι ταυτόχρονα παρόντες σε πολλούς ασθενείς με ΘΘΠ. Πιθανόν, το αντίσωμα να μην παρουσιάζει μεγάλη ειδικότητα έναντι της ADAMTS-13, το μόριο της μεταλλοπρωτεάσης να έχει υποστεί κάποια μετάλλαξη, ή να επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, όπως η ύπαρξη πρωτεϊνών που εμφανίζουν ομοιότητα θέσεων σύνδεσης με την μεταλλοπρωτεάση. [300]

Η ανάλυση των πολυμερών του vWF σε αυτήν την ομάδα ασθενών θα βοηθούσε περισσότερο στην κατανόηση του φαινομένου. Θα πρέπει να αναλυθούν οι κλάσεις πολυμερών που κυκλοφορούν στη ύφεση (αλλά και στην οξεία) και, ακόμα καλύτερα, να δημιουργηθεί ένα ατομικό προφίλ για τα πολυμερή του vWF για τον κάθε ασθενή. Ένα παρόμοιο προφίλ θα πρέπει να δημιουργηθεί και για τη δραστηριότητα της ADAMTS-13, καθώς υπάρχουν περιστατικά ασθενών (N=6) όπου τα επίπεδα της μεταλλοπρωτεάσης στην ύφεση είναι <30% ή ακόμα και <15% (N=2), αλλά παρόλα αυτά, οι ασθενείς δεν υποτροπιάζουν. Πιθανόν σε αυτούς τους ασθενείς αυτά τα επίπεδα να είναι ικανά να κρατούν μια ισορροπία. Ενδεχομένως, οι ίδιοι ασθενείς να έχουν αυξημένα επίπεδα εξαιρετικά μεγάλων πολυμερών vWF, με αποτέλεσμα να καταναλώνεται η μεταλλοπρωτεάση στην προσπάθεια διάσπασής τους. Οι συγκεκριμένοι ασθενείς πιθανόν να ωφελούνταν από τη λήψη caplacizumab, ενός νανοσώματος που στοχεύει τον vWF. Ήδη, οι Reyvandi et al, παρουσίασαν κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα σχετικά με τη χρήση του caplacizumab, το οποίο φαίνεται να βελτιώνει σημαντικά τον χρόνο εξόδου από την οξεία φάση του συνδρόμου. [133]

Από το σύνολο των ασθενών, ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση μίας γυναίκας η οποία πρωτοδιαγνώστηκε σε νεαρή ηλικία, πάσχει από υποτροπιάζουσα μορφή της νόσου

και εξαιτίας αυτού προχώρησε σε σπληνεκτομή. Παρόλα αυτά τα επίπεδα του αντι-ADAMTS-13 αντισώματος παραμένουν ψηλά, παρά το γεγονός ότι η δραστηριότητα της μεταλλοπρωτεάσης είναι σε φυσιολογικά επίπεδα. Η ασθενής δεν υποτροπιάζει. Κατά τη διάρκεια της πρώτης κύησης (10 χρόνια μετά τη σπληνεκτομή), η δραστηριότητα της ADAMTS-13 παρέμενε φυσιολογική, όμως μετά τον τοκετό παρουσίασε φθίνουσα πορεία, ενώ τα αντισώματα σταθερά υψηλό τίτλο. Κατά τη δεύτερη εγκυμοσύνη (6 μήνες μετά τον τοκετό, όπου οι τιμές της ADAMTS-13 ήταν ~40%), συγκεκριμένα από το πρώτο κιάλας τρίμηνο, η δραστηριότητα της μεταλλοπρωτεάσης παρουσίασε περαιτέρω πτώση και αντίστοιχα, τα επίπεδα του αντισώματος, σημείωναν περαιτέρω άνοδο. Επειδή αυτή η επιδείνωση παρουσιάστηκε από το πρώτο τρίμηνο, συναποφασίστηκε να διακοπεί η κύηση για την ασφάλεια της ασθενούς. Τέσσερις μήνες μετά τη διακοπή της κύησης, η δραστηριότητα της ADAMTS-13 επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα, αν και το αντίσωμα εξακολουθεί να παραμένει ψηλά.

Η περιοδική μέτρηση της δραστηριότητας του ADAMTS-13 μπορεί να είναι χρήσιμη ιδιαίτερα σε ασθενείς με ανεπάρκεια ADAMTS-13 και αντισώματα αντι-ADAMTS-13 κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης. Η προγνωστική αξία των αντι-ADAMTS-13 αντισωμάτων για υποτροπή της νόσου πρέπει ακόμη να εδραιωθεί σταθερά. Ενώ, οι Peyvandi et al. [144] και Ferrari et al. [36] ανέφεραν ότι η παρουσία αντι-ADAMTS-13 αντισωμάτων κατά τη διάρκεια της υποτροπής και ο τίτλος του ανασταλτή ADAMTS-13 κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης είναι προγνωστικά της υποτροπιάζουσας νόσου, οι Jin et al. [300] δεν βρήκαν προγνωστική αξία για τα επίπεδα αντι-ADAMTS-13 IgG. Οι Ferrari et al. [301] ανέφεραν μια συσχέτιση μεταξύ της αντι-ADAMTS-13 IgG υπότυπου 4 και της υποτροπιάζουσας νόσου. Οι μελλοντικές μεγαλύτερες προοπτικές μελέτες θα πρέπει να αναζητήσουν επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων, αξιολογώντας εάν οι μετρήσεις που σχετίζονται με τα αντι-ADAMTS-13 αντισώματα παρέχουν πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την πρόγνωση υποτροπής της νόσου, εκτός από εκείνες που προέρχονται από τη μέτρηση της δραστηριότητας ADAMTS-13.

Στη μέτρηση των επιπέδων του οροδιαλυτού υποδοχέα IL-2, προέκυψαν στατιστικά σημαντικά συμπεράσματα. Φαίνεται να υπάρχει μια αύξηση των τιμών τόσο στην οξεία φάση ( $p=0.024$ ), όσο και στην ύφεση ( $p=0.059$ ), σε σχέση με την ομάδα control.

Θα περιμέναμε η αύξηση να ήταν μεγαλύτερη, καθώς τα επίπεδα του sIL-2Ra

αντιπροσωπεύουν απάντηση στη φλεγμονή και το στρες. Το γεγονός ότι τα δείγματα ελήφθησαν όταν οι ασθενείς, είτε είχαν ήδη ξεκινήσει θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά (οξεία φάση), είτε βρίσκονταν σε φάση σταδιακής απόσβεσης κορτιζόνης (ύφεση), πιθανόν να επηρέασε τα αποτελέσματα. Το δείγμα των ασθενών ήταν ιδιαίτερα μικρό (N=11), πράγμα που αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την εξαγωγή ισχυρών συμπερασμάτων.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι συνεχείς μετρήσεις των επιπέδων του sIL-2Ra θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην παρακολούθηση της βαρύτητας της νόσου και επίσης, στην πρόβλεψη και την αξιολόγηση της απάντησης στις θεραπείες. Δεν υπάρχει πρόσφατη εμπειρία σχετικά με τα επίπεδα του sIL-2Ra στη ΘΘΠ, παρά μόνο δύο αποτελέσματα μιας ομάδας ιαπόνων ερευνητών στις αρχές της δεκαετίας του 1990 [294, 295], όπου φαίνεται ότι ανοσολογικοί μηχανισμοί (όπως η ενεργοποίηση μακροφάγων) και οι βλάβες των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, εμπλέκονται στην παθογένεση της ΘΘΠ και αντικατοπτρίζονται στα επίπεδα κυτοκινών πλάσματος. Παρουσιάζει ενδιαφέρον η παρακολούθηση των επιπέδων του sIL-2Ra στη ΘΘΠ με την ελπίδα να προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες στην καλύτερη κατανόηση του συνδρόμου και την αντιμετώπισή του.

## **8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων της δραστικότητας της ADAMTS-13 και του ανασταλτή της, συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με τη διεθνή βιβλιογραφία. Η δημιουργία ενός ατομικού προφίλ για αυτές τις τιμές, αλλά και για τα πολυμερή του vWF θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση του συνδρόμου, τη βελτιστοποίηση της πρόγνωσης και τη χάραξη εξατομικευμένης θεραπευτικής στρατηγικής. Όσον αφορά τον sIL-2Ra, η περαιτέρω ανάλυση δεδομένων σε μεγαλύτερο πληθυσμό ίσως αποτελέσει ένα επιπλέον εργαλείο για την καλύτερη αντιμετώπιση της ΘΘΠ

Για περαιτέρω βελτίωση της πρόγνωσης της ΘΘΠ, οι καινοτόμες θεραπείες θα είναι σίγουρα χρήσιμες τα επόμενα χρόνια. Ωστόσο, η διάγνωση της ΘΘΠ ως κατάσταση έκτακτης ανάγκης εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση λόγω της σπανιότητας της νόσου, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε καθυστέρηση στην αντιμετώπιση, έχοντας επίπτωση στην πρόγνωση. Απ' αυτή την άποψη, διάφορα μέτρα, συμπεριλαμβανομένων εκπαιδευτικών προγραμμάτων για γενικούς γιατρούς, γιατρούς σε ΤΕΠ και για όλους τους άλλους ειδικούς που εμπλέκονται ενδεχομένως στη διαχείριση της ΘΘΠ, αναπτύσσονται προοδευτικά σε όλο ένα και μεγαλύτερο αριθμό χωρών.

## **9. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Στην παρούσα μελέτη, μετά την ανάθεσή της, δεν υπήρξε τελικά δυνατότητα για τη μέτρηση των πολυμερών του vWF, καθώς και των επιπέδων του προπεπτιδίου του vWF. Αφενός ο αναλυτής των πολυμερών έγινε διαθέσιμος μετά την ολοκλήρωση της εργασίας και αφετέρου, δεν βρέθηκε κανένας εναλλακτικός προμηθευτής αντιδραστηρίων για τη μέτρηση του vWFpp, καθώς η εταιρεία που το διακινούσε, σταμάτησε την παραγωγή του. Αντί των παραπάνω μετρήσεων, έγινε μέτρηση του ανασταλτή της ADAMTS-13 και των επιπέδων του sIL-2Ra. Το δείγμα των ασθενών που πληροί τα κριτήρια που ετέθησαν για τη μέτρηση του sIL-2Ra είναι μικρό (N=11), συνεπώς χρειάζεται περαιτέρω μελέτη σε μεγαλύτερο δείγμα, ώστε τα συμπεράσματα να είναι αξιόπιστα.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Page, E.E. and J.A. Kremer Hovinga, *Clinical importance of ADAMTS13 activity during remission in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura*. 2016. **128**(17): p. 2175-2178.
2. Moschcowitz, E., *Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease*. Proc NY Pathol Soc, 1924. **24**: p. 21-24.
3. Shenkman, B. and Y. Einav, *Thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathic hemolytic anemias: diagnosis and classification*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(4-5): p. 584-6.
4. George, J.N. and Z.L. Al-Nouri, *Diagnostic and therapeutic challenges in the thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndromes*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2012. **2012**: p. 604-9.
5. Reese, J.A., et al., *Children and adults with thrombotic thrombocytopenic purpura associated with severe, acquired Adamts13 deficiency: Comparison of incidence, demographic and clinical features*. Pediatric Blood & Cancer, 2013. **60**(10): p. 1676-1682.
6. Scully, M., et al., *Regional UK TTP registry: correlation with laboratory ADAMTS 13 analysis and clinical features*. Br J Haematol, 2008. **142**(5): p. 819-26.
7. Fujimura, Y., et al., *Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan*. J Thromb Haemost, 2011. **9 Suppl 1**: p. 283-301.
8. Kremer Hovinga, J.A., et al., *Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2010. **115**(8): p. 1500-11; quiz 1662.
9. Jang, M.J., et al., *Clinical features of severe acquired ADAMTS13 deficiency in thrombotic thrombocytopenic purpura: the Korean TTP registry experience*. Int J Hematol, 2011. **93**(2): p. 163-169.
10. Deford, C.C., et al., *Multiple major morbidities and increased mortality during long-term follow-up after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2013. **122**(12): p. 2023-9; quiz 2142.
11. Blombery, P., et al., *Diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) in Australia: findings from the first 5 years of the Australian TTP/thrombotic microangiopathy registry*. Intern Med J, 2016. **46**(1): p. 71-9.
12. Mariotte, E., et al., *Epidemiology and pathophysiology of adulthood-onset thrombotic microangiopathy with severe ADAMTS13 deficiency (thrombotic thrombocytopenic purpura): a cross-sectional analysis of the French national registry for thrombotic microangiopathy*. Lancet Haematol, 2016. **3**(5): p. e237-45.
13. Reese, J.A., et al., *Children and adults with thrombotic thrombocytopenic purpura associated with severe, acquired Adamts13 deficiency: comparison of incidence, demographic and clinical features*. Pediatr Blood Cancer, 2013. **60**(10): p. 1676-82.
14. Joly, B.S., et al., *Child-onset and adolescent-onset acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with severe ADAMTS13 deficiency: a cohort study of the French national registry for thrombotic microangiopathy*. Lancet Haematol, 2016. **3**(11): p. e537-e546.
15. Sadler, J.E., *What's new in the diagnosis and pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2015. **2015**: p. 631-6.
16. Levy GG, N.W., Lian EC, et al., *Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura*, in Nature. 2001. p. 488-494.

17. Lotta, L.A., et al., *Different clinical severity of first episodes and recurrences of thrombotic thrombocytopenic purpura*. Br J Haematol, 2010. **151**(5): p. 488-94.
18. Fujimura, Y. and M. Matsumoto, *Registry of 919 patients with thrombotic microangiopathies across Japan: database of Nara Medical University during 1998-2008*. Intern Med, 2010. **49**(1): p. 7-15.
19. Moake, J.L., et al., *Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura*. N Engl J Med, 1982. **307**(23): p. 1432-5.
20. Asada, Y., et al., *Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen*. Thromb Res, 1985. **38**(5): p. 469-79.
21. Tartaglia, A.P., Burkart, Peter T., *Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Remission Following Hemodialysis*. JAMA, 1971. **218**(7): p. 999-1001.
22. Burkart, A.P.T.P.T., *Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Remission Following Hemodialysis*. JAMA, 1971. **218**(7): p. 999-1001.
23. Bukowski RM, H.I., Harris 1W,, B.J. Hoffman GC, Silverblatt E, Yang, and I-Y, *Exchange transfusions in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura*. Semin Hematol, 1976. **13**: p. 219-232.
24. Bukowski RM, K.J.a.H.J., *Plasmapheresis in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood Rev, 1977. **50**(3): p. 413-417.
25. Rock, G.A., et al., *Comparison of Plasma Exchange with Plasma Infusion in the Treatment of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura*. New England Journal of Medicine, 1991. **325**(6): p. 393-397.
26. Furlan, M., R. Robles, and B. Lammle, *Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4223-34.
27. Furlan, M., et al., *von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome*. N Engl J Med, 1998. **339**(22): p. 1578-84.
28. Tsai, H.M. and E.C. Lian, *Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura*. N Engl J Med, 1998. **339**(22): p. 1585-94.
29. Soejima, K., et al., *A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease?* J Biochem, 2001. **130**(4): p. 475-80.
30. Veyradier, A., et al., *Specific von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases*. Blood, 2001. **98**(6): p. 1765-72.
31. Bianchi, V., et al., *Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient activity is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2002. **100**(2): p. 710-3.
32. Zheng, X.L., et al., *Effect of plasma exchange on plasma ADAMTS13 metalloprotease activity, inhibitor level, and clinical outcome in patients with idiopathic and nonidiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4043-9.
33. Verbij, F.C., et al., *Acquired TTP: ADAMTS13 meets the immune system*. Blood Rev, 2014. **28**(6): p. 227-34.
34. Klaus, C., et al., *Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4514-9.
35. Lotta, L.A., et al., *Measurement and prevalence of circulating ADAMTS13-specific immune complexes in autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura*. J Thromb

- Haemost, 2014. **12**(3): p. 329-36.
36. Ferrari, S., et al., *Prognostic value of anti-ADAMTS 13 antibody features (Ig isotype, titer, and inhibitory effect) in a cohort of 35 adult French patients undergoing a first episode of thrombotic microangiopathy with undetectable ADAMTS 13 activity.* Blood, 2007. **109**(7): p. 2815-22.
  37. Uemura, M., et al., *Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis.* Thromb Haemost, 2008. **99**(6): p. 1019-29.
  38. Studt, J.D., et al., *Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin.* Blood, 2005. **105**(2): p. 542-4.
  39. Ono, T., et al., *Severe secondary deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure.* Blood, 2006. **107**(2): p. 528-34.
  40. Peigne, V., et al., *The prognostic value of ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats, member 13) deficiency in septic shock patients involves interleukin-6 and is not dependent on disseminated intravascular coagulation.* Crit Care, 2013. **17**(6): p. R273.
  41. Lotta, L.A., et al., *ADAMTS13 mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura.* Hum Mutat, 2010. **31**(1): p. 11-9.
  42. Hanby, H.A. and X.L. Zheng, *Current status in diagnosis and treatment of hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura.* Hereditary Genet, 2014. **3**(1).
  43. Camilleri, R.S., et al., *Prevalence of the ADAMTS-13 missense mutation R1060W in late onset adult thrombotic thrombocytopenic purpura.* J Thromb Haemost, 2008. **6**(2): p. 331-8.
  44. Moatti-Cohen, M., et al., *Unexpected frequency of Upshaw-Schulman syndrome in pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura.* Blood, 2012. **119**(24): p. 5888-97.
  45. Motto, D.G., et al., *Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice.* J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2752-61.
  46. Vanhoorelbeke, K. and S.F. De Meyer, *Animal models for thrombotic thrombocytopenic purpura.* J Thromb Haemost, 2013. **11 Suppl 1**: p. 2-10.
  47. Terrell, D.R., et al., *Blood group O and black race are independent risk factors for thrombotic thrombocytopenic purpura associated with severe ADAMTS13 deficiency.* Transfusion, 2011. **51**(10): p. 2237-43.
  48. Martino, S., et al., *Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in Black People: Impact of Ethnicity on Survival and Genetic Risk Factors.* PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0156679.
  49. Coppo, P., et al., *HLA-DRB1\*11: a strong risk factor for acquired severe ADAMTS13 deficiency-related idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura in Caucasians.* J Thromb Haemost, 2010. **8**(4): p. 856-9.
  50. George, J.N., S.K. Vesely, and D.R. Terrell, *The Oklahoma Thrombotic Thrombocytopenic Purpura-Hemolytic Uremic Syndrome (TTP-HUS) Registry: a community perspective of patients with clinically diagnosed TTP-HUS.* Semin Hematol, 2004. **41**(1): p. 60-7.
  51. Benhamou, Y., et al., *Cardiac troponin-I on diagnosis predicts early death and refractoriness in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center.* J Thromb Haemost, 2015. **13**(2): p. 293-302.

52. Zafrani, L., et al., *Acute renal failure is prevalent in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura associated with low plasma ADAMTS13 activity.* J Thromb Haemost, 2015. **13**(3): p. 380-9.
53. Joly, B.S., P. Coppo, and A. Veyradier, *Thrombotic thrombocytopenic purpura.* Blood, 2017. **129**(21): p. 2836-2846.
54. Noris, M. and G. Remuzzi, *Atypical hemolytic-uremic syndrome.* N Engl J Med, 2009. **361**(17): p. 1676-87.
55. Stepanian, A., et al., *Von Willebrand factor and ADAMTS13: a candidate couple for preeclampsia pathophysiology.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(7): p. 1703-9.
56. Veyradier, A. and D. Meyer, *Thrombotic thrombocytopenic purpura and its diagnosis.* J Thromb Haemost, 2005. **3**(11): p. 2420-7.
57. Bentley, M.J., A.R. Wilson, and G.M. Rodgers, *Performance of a clinical prediction score for thrombotic thrombocytopenic purpura in an independent cohort.* Vox Sang, 2013. **105**(4): p. 313-8.
58. Coppo, P., et al., *Predictive features of severe acquired ADAMTS13 deficiency in idiopathic thrombotic microangiopathies: the French TMA reference center experience.* PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10208.
59. Obert, B., et al., *Estimation of the von Willebrand factor-cleaving protease in plasma using monoclonal antibodies to vWF.* Thromb Haemost, 1999. **82**(5): p. 1382-5.
60. Gerritsen, H.E., et al., *Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP).* Thromb Haemost, 1999. **82**(5): p. 1386-9.
61. Kokame, K., et al., *FRETs-vWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay.* Br J Haematol, 2005. **129**(1): p. 93-100.
62. Thouzeau, S., et al., *Evaluation of a commercial assay for ADAMTS13 activity measurement.* Thromb Haemost, 2013. **110**(4): p. 852-3.
63. Joly, B., et al., *Evaluation of a chromogenic commercial assay using vWF-73 peptide for ADAMTS13 activity measurement.* Thromb Res, 2014. **134**(5): p. 1074-80.
64. Hubbard, A.R., A.B. Heath, and J.A. Kremer Hovinga, *Establishment of the WHO 1st International Standard ADAMTS13, plasma (12/252): communication from the SSC of the ISTH.* J Thromb Haemost, 2015. **13**(6): p. 1151-3.
65. Meyer, S.C., et al., *Hyperbilirubinemia interferes with ADAMTS-13 activity measurement by FRETs-vWF73 assay: diagnostic relevance in patients suffering from acute thrombotic microangiopathies.* J Thromb Haemost, 2007. **5**(4): p. 866-7.
66. Knovich, M.A., A. Farland, and J. Owen, *Long-term management of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura using serial plasma ADAMTS13 measurements.* Eur J Haematol, 2012. **88**(6): p. 518-25.
67. Mancini, I., et al., *FRETs-vWF73 rather than CBA assay reflects ADAMTS13 proteolytic activity in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura patients.* Thromb Haemost, 2014. **112**(2): p. 297-303.
68. Connell, N.T., T. Cheves, and J.D. Sweeney, *Effect of ADAMTS13 activity turnaround time on plasma utilization for suspected thrombotic thrombocytopenic purpura.* Transfusion, 2016. **56**(2): p. 354-9.
69. Mackie, I., et al., *Discrepancies between ADAMTS13 activity assays in patients with thrombotic microangiopathies.* Thromb Haemost, 2013. **109**(3): p. 488-96.
70. Coppo, P. and A. Froissart, *Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura beyond therapeutic plasma exchange.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2015. **2015**: p. 637-43.



71. Scully, M., et al., *Thrombotic thrombocytopenic purpura and pregnancy: presentation, management, and subsequent pregnancy outcomes*. *Blood*, 2014. **124**(2): p. 211-9.
72. Roriz, M., et al., *Risk Factors for Autoimmune Diseases Development After Thrombotic Thrombocytopenic Purpura*. *Medicine (Baltimore)*, 2015. **94**(42): p. e1598.
73. Hart, D., et al., *Human immunodeficiency virus associated thrombotic thrombocytopenic purpura--favourable outcome with plasma exchange and prompt initiation of highly active antiretroviral therapy*. *Br J Haematol*, 2011. **153**(4): p. 515-9.
74. Morton, J.M. and J.N. George, *Microangiopathic Hemolytic Anemia and Thrombocytopenia in Patients With Cancer*. *J Oncol Pract*, 2016. **12**(6): p. 523-30.
75. Werner, T.L., et al., *Management of cancer-associated thrombotic microangiopathy: what is the right approach?* *Am J Hematol*, 2007. **82**(4): p. 295-8.
76. George, J.N., et al., *Thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome following allogeneic HPC transplantation: a diagnostic dilemma*. *Transfusion*, 2004. **44**(2): p. 294-304.
77. Bayik, M.M., et al., *Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with defibrotid*. *Am J Hematol*, 1993. **43**(1): p. 74-5.
78. Pogliani, E.M., et al., *Defibrotide in recurrent thrombotic thrombocytopenic purpura*. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2000. **6**(2): p. 69-70.
79. Matsumoto, M., et al., *Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome*. *Blood*, 2004. **103**(4): p. 1305-10.
80. Schneppenheim, R., et al., *von Willebrand factor cleaving protease and ADAMTS13 mutations in childhood TTP*. *Blood*, 2003. **101**(5): p. 1845-50.
81. von Krogh, A.S., et al., *High prevalence of hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura in central Norway: from clinical observation to evidence*. *J Thromb Haemost*, 2016. **14**(1): p. 73-82.
82. Mansouri Taleghani, M., et al., *Hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura and the hereditary TTP registry*. *Hamostaseologie*, 2013. **33**(2): p. 138-43.
83. Kokame, K., et al., *Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(18): p. 11902-7.
84. Lotta, L.A., et al., *Residual plasmatic activity of ADAMTS13 is correlated with phenotype severity in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura*. *Blood*, 2012. **120**(2): p. 440-8.
85. Bennett, M., et al., *Experiences in a Family With the Upshaw-Schulman Syndrome Over a 44-Year Period*. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 2013. **20**(3): p. 296-303.
86. Vesely, S.K., et al., *ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: relation to presenting features and clinical outcomes in a prospective cohort of 142 patients*. *Blood*, 2003. **102**(1): p. 60-8.
87. Benhamou, Y., et al., *Development and validation of a predictive model for death in acquired severe ADAMTS13 deficiency-associated idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: the French TMA Reference Center experience*. *Haematologica*, 2012. **97**(8): p. 1181-6.
88. Hughes, C., et al., *Cardiac involvement in acute thrombotic thrombocytopenic purpura: association with troponin T and IgG antibodies to ADAMTS 13*. *J Thromb Haemost*, 2009. **7**(4): p. 529-36.

89. George, J.N., *How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: 2010*. Blood, 2010. **116**(20): p. 4060-9.
90. Lewis, Q.F., et al., *Long-term deficits in health-related quality of life after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura*. Transfusion, 2009. **49**(1): p. 118-24.
91. Hie, M., et al., *Preemptive rituximab infusions after remission efficiently prevent relapses in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2014. **124**(2): p. 204-10.
92. Sarode, R., et al., *Thrombotic thrombocytopenic purpura: 2012 American Society for Apheresis (ASFA) consensus conference on classification, diagnosis, management, and future research*. J Clin Apher, 2014. **29**(3): p. 148-67.
93. Scully, M., et al., *Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies*. Br J Haematol, 2012. **158**(3): p. 323-35.
94. Froissart, A., et al., *Efficacy and safety of first-line rituximab in severe, acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with a suboptimal response to plasma exchange. Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center*. Crit Care Med, 2012. **40**(1): p. 104-11.
95. Toussaint-Hacquard, M., et al., *Type of plasma preparation used for plasma exchange and clinical outcome of adult patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: a French retrospective multicenter cohort study*. Transfusion, 2015. **55**(10): p. 2445-51.
96. Rock, G., et al., *Cryosupernatant as replacement fluid for plasma exchange in thrombotic thrombocytopenic purpura. Members of the Canadian Apheresis Group*. Br J Haematol, 1996. **94**(2): p. 383-6.
97. Zeigler, Z.R., et al., *Cryoprecipitate poor plasma does not improve early response in primary adult thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)*. J Clin Apher, 2001. **16**(1): p. 19-22.
98. Coppo, P., et al., *Prognostic value of inhibitory anti-ADAMTS13 antibodies in adult-acquired thrombotic thrombocytopenic purpura*. Br J Haematol, 2006. **132**(1): p. 66-74.
99. Nguyen, L., et al., *Twice-daily plasma exchange for patients with refractory thrombotic thrombocytopenic purpura: the experience of the Oklahoma Registry, 1989 through 2006*. Transfusion, 2008. **48**(2): p. 349-57.
100. Bandarenko, N. and M.E. Brecher, *United States Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Apheresis Study Group (US TTP ASG): multicenter survey and retrospective analysis of current efficacy of therapeutic plasma exchange*. J Clin Apher, 1998. **13**(3): p. 133-41.
101. O'Shaughnessy, D.F., et al., *Guidelines for the use of fresh-frozen plasma, cryoprecipitate and cryosupernatant*. Br J Haematol, 2004. **126**(1): p. 11-28.
102. Scully, M., et al., *Cryosupernatant and solvent detergent fresh-frozen plasma (Octaplas) usage at a single centre in acute thrombotic thrombocytopenic purpura*. Vox Sang, 2007. **93**(2): p. 154-8.
103. Yarranton, H., et al., *Coagulation factor levels in cryosupernatant prepared from plasma treated with amotosalen hydrochloride (S-59) and ultraviolet A light*. Vol. 45. 2005. 1453-8.
104. de la Rubia, J., et al., *Role of methylene blue-treated or fresh-frozen plasma in the response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura*. Br J Haematol, 2001. **114**(3): p. 721-3.
105. del Rio-Garma, J., et al., *Methylene blue-photoinactivated plasma versus quarantine fresh frozen plasma in thrombotic thrombocytopenic purpura: a multicentric,*

- prospective cohort study*. Br J Haematol, 2008. **143**(1): p. 39-45.
106. Mintz, P.D., et al., *A randomized, controlled Phase III trial of therapeutic plasma exchange with fresh-frozen plasma (FFP) prepared with amotosalen and ultraviolet A light compared to untreated FFP in thrombotic thrombocytopenic purpura*. Transfusion, 2006. **46**(10): p. 1693-704.
  107. Balduini, C.L., et al., *High versus standard dose methylprednisolone in the acute phase of idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: a randomized study*. Ann Hematol, 2010. **89**(6): p. 591-6.
  108. Bell, W.R., et al., *Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. Clinical experience in 108 patients*. N Engl J Med, 1991. **325**(6): p. 398-403.
  109. Randall, K.L., *Rituximab in autoimmune diseases*. Australian prescriber, 2016. **39**(4): p. 131-134.
  110. Elliott, M.A., et al., *Rituximab for refractory and or relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura related to immune-mediated severe ADAMTS13-deficiency: a report of four cases and a systematic review of the literature*. Eur J Haematol, 2009. **83**(4): p. 365-72.
  111. Scully, M., et al., *A phase 2 study of the safety and efficacy of rituximab with plasma exchange in acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2011. **118**(7): p. 1746-53.
  112. Jasti, S., et al., *Rituximab as an adjunct to plasma exchange in TTP: a report of 12 cases and review of literature*. J Clin Apher, 2008. **23**(5): p. 151-6.
  113. Ling, H.T., J.J. Field, and M.A. Blinder, *Sustained response with rituximab in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: a report of 13 cases and review of the literature*. Am J Hematol, 2009. **84**(7): p. 418-21.
  114. de la Rubia, J., et al., *Efficacy and safety of rituximab in adult patients with idiopathic relapsing or refractory thrombotic thrombocytopenic purpura: results of a Spanish multicenter study*. Transfus Apher Sci, 2010. **43**(3): p. 299-303.
  115. Page, E.E., et al., *Rituximab reduces risk for relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2016. **127**(24): p. 3092-4.
  116. Scully, M., et al., *Remission in acute refractory and relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura following rituximab is associated with a reduction in IgG antibodies to ADAMTS-13*. Br J Haematol, 2007. **136**(3): p. 451-61.
  117. Cuker, A., *Adjuvant rituximab to prevent TTP relapse*. Blood, 2016. **127**(24): p. 2952-3.
  118. Lim, W., S.K. Vesely, and J.N. George, *The role of rituximab in the management of patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2015. **125**(10): p. 1526-31.
  119. Ziman, A., et al., *Combination vincristine and plasma exchange as initial therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: one institution's experience and review of the literature*. Transfusion, 2005. **45**(1): p. 41-9.
  120. Nosari, A., et al., *Cyclosporine therapy in refractory/relapsed patients with thrombotic thrombocytopenic purpura*. Am J Hematol, 2009. **84**(5): p. 313-4.
  121. Cataland, S.R., et al., *Cyclosporin and plasma exchange in thrombotic thrombocytopenic purpura: long-term follow-up with serial analysis of ADAMTS13 activity*. Br J Haematol, 2007. **139**(3): p. 486-93.
  122. Pasquale, D., et al., *Chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura: role of therapy with cyclosporine*. Am J Hematol, 1998. **57**(1): p. 57-61.
  123. Cataland, S.R., et al., *An evaluation of cyclosporin and corticosteroids individually as adjuncts to plasma exchange in the treatment of thrombotic thrombocytopenic*

- purpura*. Br J Haematol, 2007. **136**(1): p. 146-9.
124. Mazzei, C., et al., *Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura: a role for early vincristine administration*. J Clin Apher, 1998. **13**(1): p. 20-2.
  125. Bohm, M., et al., *The course of ADAMTS-13 activity and inhibitor titre in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with plasma exchange and vincristine*. Br J Haematol, 2005. **129**(5): p. 644-52.
  126. Rutkow, I.M., *Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) and splenectomy: a current appraisal*. Ann Surg, 1978. **188**(5): p. 701-5.
  127. Kappers-Klunne, M.C., et al., *Splenectomy for the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura*. Br J Haematol, 2005. **130**(5): p. 768-76.
  128. Bobbio-Pallavicini, E., et al., *Antiplatelet agents in thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Results of a randomized multicenter trial by the Italian Cooperative Group for TTP*. Haematologica, 1997. **82**(4): p. 429-35.
  129. Chen, J., et al., *N-acetylcysteine reduces the size and activity of von Willebrand factor in human plasma and mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 593-603.
  130. Shortt, J., D.H. Oh, and S.S. Opat, *ADAMTS13 antibody depletion by bortezomib in thrombotic thrombocytopenic purpura*. N Engl J Med, 2013. **368**(1): p. 90-2.
  131. Plaimauer, B., et al., *Recombinant ADAMTS13 normalizes von Willebrand factor-cleaving activity in plasma of acquired TTP patients by overriding inhibitory antibodies*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(5): p. 936-44.
  132. Schiviz, A., et al., *A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13*. Blood, 2012. **119**(25): p. 6128-35.
  133. Peyvandi, F., et al., *Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura*. N Engl J Med, 2016. **374**(6): p. 511-22.
  134. Ambrose, A., R.T. Welham, and R.C. Cefalo, *Thrombotic thrombocytopenic purpura in early pregnancy*. Obstet Gynecol, 1985. **66**(2): p. 267-72.
  135. Rozdzinski, E., et al., *Thrombotic thrombocytopenic purpura in early pregnancy with maternal and fetal survival*. Ann Hematol, 1992. **64**(5): p. 245-8.
  136. Mokrzycki, M.H., et al., *Thrombotic thrombocytopenic purpura in pregnancy: successful treatment with plasma exchange. Case report and review of the literature*. Blood Purif, 1995. **13**(5): p. 271-82.
  137. Scully, M., et al., *Successful management of pregnancy in women with a history of thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2006. **17**(6): p. 459-63.
  138. Chakravarty, E.F., et al., *Pregnancy outcomes after maternal exposure to rituximab*. Blood, 2011. **117**(5): p. 1499-506.
  139. Shumak, K.H., G.A. Rock, and R.C. Nair, *Late relapses in patients successfully treated for thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Group*. Ann Intern Med, 1995. **122**(8): p. 569-72.
  140. Kahwash, E. and W.B. Lockwood, *Twice daily plasma exchange in refractory thrombotic thrombocytopenic purpura*. Ther Apher Dial, 2004. **8**(3): p. 254-7.
  141. Sayani, F.A. and C.S. Abrams, *How I treat refractory thrombotic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2015. **125**(25): p. 3860-7.
  142. Beloncle, F., et al., *Splenectomy and/or cyclophosphamide as salvage therapies in thrombotic thrombocytopenic purpura: the French TMA Reference Center experience*. Transfusion, 2012. **52**(11): p. 2436-44.
  143. Willis, M.S. and N. Bandarenko, *Relapse of thrombotic thrombocytopenic purpura: is it a continuum of disease?* Semin Thromb Hemost, 2005. **31**(6): p. 700-8.
  144. Peyvandi, F., et al., *ADAMTS13 and anti-ADAMTS13 antibodies as markers for*

- recurrence of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura during remission. *Haematologica*, 2008. **93**(2): p. 232-9.
145. Bresin, E., et al., *Rituximab as pre-emptive treatment in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and evidence of anti-ADAMTS13 autoantibodies*. *Thromb Haemost*, 2009. **101**(2): p. 233-8.
  146. Nguyen, L., et al., *Complications of plasma exchange in patients treated for thrombotic thrombocytopenic purpura. IV. An additional study of 43 consecutive patients, 2005 to 2008*. *Transfusion*, 2009. **49**(2): p. 392-4.
  147. Veltman, G.A., et al., *The role of splenectomy in the treatment of relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura*. *Ann Hematol*, 1995. **70**(5): p. 231-6.
  148. Barbot, J., et al., *Ten years of prophylactic treatment with fresh-frozen plasma in a child with chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura as a result of a congenital deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease*. *Br J Haematol*, 2001. **113**(3): p. 649-51.
  149. Loirat, C., et al., *Thrombotic thrombocytopenic purpura related to severe ADAMTS13 deficiency in children*. *Pediatr Nephrol*, 2009. **24**(1): p. 19-29.
  150. Scully, M., et al., *Recombinant ADAMTS-13: first-in-human pharmacokinetics and safety in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura*. *Blood*, 2017. **130**(19): p. 2055-2063.
  151. Stocksclaeder, M., R. Schneppenheim, and U. Budde, *Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2014. **25**(3): p. 206-16.
  152. Ruggeri, Z.M., *Structure and function of von Willebrand factor*. *Thromb Haemost*, 1999. **82**(2): p. 576-84.
  153. Jaffe, E.A., L.W. Hoyer, and R.L. Nachman, *Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells*. *J Clin Invest*, 1973. **52**(11): p. 2757-64.
  154. Nachman, R., R. Levine, and E.A. Jaffe, *Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes*. *J Clin Invest*, 1977. **60**(4): p. 914-21.
  155. Ruggeri, Z.M., *The role of von Willebrand factor in thrombus formation*. *Thromb Res*, 2007. **120 Suppl 1**: p. S5-9.
  156. Rosenberg, J.B., et al., *Intracellular trafficking of factor VIII to von Willebrand factor storage granules*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(3): p. 613-24.
  157. Nogami, K., et al., *A novel mechanism of factor VIII protection by von Willebrand factor from activated protein C-catalyzed inactivation*. *Blood*, 2002. **99**(11): p. 3993-8.
  158. Wagner, D.D., et al., *Divergent fates of von Willebrand factor and its propolypeptide (von Willebrand antigen II) after secretion from endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(7): p. 1955-9.
  159. Hannah, M.J., et al., *Differential kinetics of cell surface loss of von Willebrand factor and its propolypeptide after secretion from Weibel-Palade bodies in living human endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(24): p. 22827-30.
  160. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates*. *Blood Rev*, 2009. **23**(4): p. 177-89.
  161. Kanaji, S., et al., *Contribution of platelet vs. endothelial vWF to platelet adhesion and hemostasis*. *J Thromb Haemost*, 2012. **10**(8): p. 1646-52.
  162. Wagner, D.D., et al., *Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor propolypeptide*. *Cell*, 1991. **64**(2): p. 403-13.
  163. Ruggeri, Z.M. and J. Ware, *von Willebrand factor*. *Faseb j*, 1993. **7**(2): p. 308-16.
  164. Reininger, A.J., *Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis*. *Haemophilia*, 2008. **14 Suppl 5**: p. 11-26.

165. Schneider, S.W., et al., *Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(19): p. 7899-7903.
166. Goodeve, A.C., *The genetic basis of von Willebrand disease*. Blood Rev, 2010. **24**(3): p. 123-34.
167. Budde, U., et al., *Laboratory testing for von Willebrand disease: contribution of multimer analysis to diagnosis and classification*. Semin Thromb Hemost, 2006. **32**(5): p. 514-21.
168. Sadler, J.E., et al., *Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(19): p. 6394-8.
169. Lynch, D.C., et al., *Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor: authentication by a new method*. Cell, 1985. **41**(1): p. 49-56.
170. Mancuso, D.J., et al., *Structure of the gene for human von Willebrand factor*. J Biol Chem, 1989. **264**(33): p. 19514-27.
171. Titani, K., et al., *Amino acid sequence of human von Willebrand factor*. Biochemistry, 1986. **25**(11): p. 3171-84.
172. Sporn, L.A., V.J. Marder, and D.D. Wagner, *Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers*. Cell, 1986. **46**(2): p. 185-90.
173. Sporn, L.A., V.J. Marder, and D.D. Wagner, *von Willebrand factor released from Weibel-Palade bodies binds more avidly to extracellular matrix than that secreted constitutively*. Blood, 1987. **69**(5): p. 1531-4.
174. Savage, B., E. Saldivar, and Z.M. Ruggeri, *Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor*. Cell, 1996. **84**(2): p. 289-97.
175. Ribes, J.A., C.W. Francis, and D.D. Wagner, *Fibrin induces release of von Willebrand factor from endothelial cells*. J Clin Invest, 1987. **79**(1): p. 117-23.
176. Hattori, R., et al., *Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface*. J Biol Chem, 1989. **264**(15): p. 9053-60.
177. Zheng, X.L., *Structure-function and regulation of ADAMTS-13 protease*. J Thromb Haemost, 2013. **11 Suppl 1**: p. 11-23.
178. Jin, S.Y., et al., *von Willebrand factor cleaved from endothelial cells by ADAMTS13 remains ultralarge in size*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(10): p. 1749-52.
179. Christof, J., M. Gebhardt, and M. Rief, *Force Signaling in Biology*. Science, 2009. **324**(5932): p. 1278-1280.
180. Tsai, H.M., *Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4235-44.
181. Tsai, H.M., Sussman, II, and R.L. Nagel, *Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma*. Blood, 1994. **83**(8): p. 2171-9.
182. De Ceunynck, K., et al., *Local elongation of endothelial cell-anchored von Willebrand factor strings precedes ADAMTS13 protein-mediated proteolysis*. J Biol Chem, 2011. **286**(42): p. 36361-7.
183. Ruggeri, Z.M., *Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation*. Thromb Haemost, 1993. **70**(1): p. 119-23.
184. Slayter, H., et al., *Native conformation of human von Willebrand protein. Analysis by electron microscopy and quasi-elastic light scattering*. J Biol Chem, 1985. **260**(14): p. 8559-63.
185. Auton, M., et al., *N-terminal flanking region of A1 domain in von Willebrand factor*

- stabilizes structure of A1A2A3 complex and modulates platelet activation under shear stress.* J Biol Chem, 2012. **287**(18): p. 14579-85.
186. Furlan, M., *Von Willebrand factor: molecular size and functional activity.* Ann Hematol, 1996. **72**(6): p. 341-8.
  187. Ohmori, K., et al., *Electron microscopy of human factor VIII/Von Willebrand glycoprotein: effect of reducing reagents on structure and function.* J Cell Biol, 1982. **95**(2 Pt 1): p. 632-40.
  188. Turecek, P.L., et al., *Structure and function of a recombinant von Willebrand factor drug candidate.* Semin Thromb Hemost, 2010. **36**(5): p. 510-21.
  189. Gralnick, H.R., S.B. Williams, and D.K. Morisato, *Effect of multimeric structure of the factor VIII/von Willebrand factor protein on binding to platelets.* Blood, 1981. **58**(2): p. 387-97.
  190. Favalaro, E.J., et al., *Differential sensitivity of von Willebrand factor (vWF) 'activity' assays to large and small vWF molecular weight forms: a cross-laboratory study comparing ristocetin cofactor, collagen-binding and mAb-based assays.* J Thromb Haemost, 2012. **10**(6): p. 1043-54.
  191. Furlan, M. and B. Lammle, *Haemolytic-uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura--new insights into underlying biochemical mechanisms.* Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(8): p. 1112-4.
  192. Moake, J.L. and P.D. McPherson, *Abnormalities of von Willebrand factor multimers in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome.* Am J Med, 1989. **87**(3n): p. 9n-15n.
  193. Tsai, H.M., *Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura.* Int J Hematol, 2010. **91**(1): p. 1-19.
  194. Schneppenheim, R. and J. Greiner, *Thrombosis in infants and children.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006: p. 86-96.
  195. Sadler, J.E., et al., *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): p. 2103-14.
  196. Montgomery, R.R. and T.S. Zimmerman, *von Willebrand's disease antigen II. A new plasma and platelet antigen deficient in severe von Willebrand's disease.* J Clin Invest, 1978. **61**(6): p. 1498-507.
  197. Scott, J.P. and R.R. Montgomery, *Platelet von Willebrand's antigen II: active release by aggregating agents and a marker of platelet release reaction in vivo.* Blood, 1981. **58**(6): p. 1075-80.
  198. McCarroll, D.R., Z.M. Ruggeri, and R.R. Montgomery, *The effect of DDAVP on plasma levels of von Willebrand antigen II in normal individuals and patients with von Willebrand's disease.* Blood, 1984. **63**(3): p. 532-5.
  199. Ginsburg, D., et al., *Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization.* Science, 1985. **228**(4706): p. 1401-6.
  200. Verweij, C.L., et al., *Full-length von Willebrand factor (vWF) cDNA encodes a highly repetitive protein considerably larger than the mature vWF subunit.* Embo j, 1986. **5**(8): p. 1839-47.
  201. Fay, P.J., et al., *Propolypeptide of von Willebrand factor circulates in blood and is identical to von Willebrand antigen II.* Science, 1986. **232**(4753): p. 995-8.
  202. Denis, C.V., *Molecular and cellular biology of von Willebrand factor.* Int J Hematol, 2002. **75**(1): p. 3-8.
  203. Canis, K., et al., *Mapping the N-glycome of human von Willebrand factor.* Biochem J, 2012. **447**(2): p. 217-28.

204. Vischer, U.M. and D.D. Wagner, *von Willebrand factor proteolytic processing and multimerization precede the formation of Weibel-Palade bodies*. Blood, 1994. **83**(12): p. 3536-44.
205. Haberichter, S.L., S.A. Fahs, and R.R. Montgomery, *von Willebrand factor storage and multimerization: 2 independent intracellular processes*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1808-15.
206. Wagner, D.D., J.B. Olmsted, and V.J. Marder, *Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells*. J Cell Biol, 1982. **95**(1): p. 355-60.
207. Cramer, E.M., et al., *Eccentric localization of von Willebrand factor in an internal structure of platelet alpha-granule resembling that of Weibel-Palade bodies*. Blood, 1985. **66**(3): p. 710-3.
208. Giblin, J.P., L.J. Hewlett, and M.J. Hannah, *Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells*. Blood, 2008. **112**(4): p. 957-64.
209. Savage, B., J.J. Sixma, and Z.M. Ruggeri, *Functional self-association of von Willebrand factor during platelet adhesion under flow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 425-30.
210. Zheng, X., et al., *Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura*. J Biol Chem, 2001. **276**(44): p. 41059-63.
211. Casari, C., et al., *Clearance of von Willebrand factor*. J Thromb Haemost, 2013. **11 Suppl 1**: p. 202-11.
212. Rawley, O., et al., *von Willebrand factor arginine 1205 substitution results in accelerated macrophage-dependent clearance in vivo*. J Thromb Haemost, 2015. **13**(5): p. 821-6.
213. Wise, R.J., et al., *The propeptide of von Willebrand factor independently mediates the assembly of von Willebrand multimers*. Cell, 1988. **52**(2): p. 229-36.
214. Voorberg, J., et al., *Domains involved in multimer assembly of von willebrand factor (vWF): multimerization is independent of dimerization*. Embo j, 1990. **9**(3): p. 797-803.
215. Journet, A.M., S. Saffaripour, and D.D. Wagner, *Requirement for both D domains of the propolypeptide in von Willebrand factor multimerization and storage*. Thromb Haemost, 1993. **70**(6): p. 1053-7.
216. Mayadas, T.N. and D.D. Wagner, *In vitro multimerization of von Willebrand factor is triggered by low pH. Importance of the propolypeptide and free sulfhydryls*. J Biol Chem, 1989. **264**(23): p. 13497-503.
217. Erent, M., et al., *Rate, extent and concentration dependence of histamine-evoked Weibel-Palade body exocytosis determined from individual fusion events in human endothelial cells*. J Physiol, 2007. **583**(Pt 1): p. 195-212.
218. Mayadas, T.N. and D.D. Wagner, *Vicinal cysteines in the prosequence play a role in von Willebrand factor multimer assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(8): p. 3531-5.
219. Dang, L.T., et al., *Phylogenetic and functional analysis of histidine residues essential for pH-dependent multimerization of von Willebrand factor*. J Biol Chem, 2011. **286**(29): p. 25763-9.
220. Borchellini, A., et al., *Quantitative analysis of von Willebrand factor propeptide release in vivo: effect of experimental endotoxemia and administration of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin in humans*. Blood, 1996. **88**(8): p. 2951-8.
221. Vischer, U.M., et al., *Acute von Willebrand factor secretion from the endothelium in vivo: assessment through plasma propeptide (vWF:AgII) Levels*. Thromb Haemost,



1997. **77**(2): p. 387-93.
222. van Mourik, J.A., et al., *von Willebrand factor propeptide in vascular disorders: A tool to distinguish between acute and chronic endothelial cell perturbation*. Blood, 1999. **94**(1): p. 179-85.
223. van Mourik, J.A. and T. Romani de Wit, *Von Willebrand factor propeptide in vascular disorders*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 164-71.
224. Brott, D.A., et al., *Evaluation of von Willebrand factor and von Willebrand factor propeptide in models of vascular endothelial cell activation, perturbation, and/or injury*. Toxicol Pathol, 2014. **42**(4): p. 672-83.
225. de Mast, Q., et al., *Thrombocytopenia and release of activated von Willebrand Factor during early Plasmodium falciparum malaria*. J Infect Dis, 2007. **196**(4): p. 622-8.
226. Hollestelle, M.J., et al., *von Willebrand factor propeptide in malaria: evidence of acute endothelial cell activation*. Br J Haematol, 2006. **133**(5): p. 562-9.
227. Phiri, H.T., et al., *Elevated plasma von Willebrand factor and propeptide levels in Malawian children with malaria*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e25626.
228. Conroy, A.L., et al., *Endothelium-based biomarkers are associated with cerebral malaria in Malawian children: a retrospective case-control study*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15291.
229. Verrotti, A., et al., *von Willebrand factor and its propeptide in children with diabetes. Relation between endothelial dysfunction and microalbuminuria*. Pediatr Res, 2003. **53**(3): p. 382-6.
230. Nossent, A.Y., et al., *Plasma levels of von Willebrand factor, von Willebrand factor propeptide and factor VIII in carriers and patients with nephrogenic diabetes insipidus*. Thromb Res, 2010. **125**(6): p. 554-6.
231. Chen, S.F., et al., *Increased active von Willebrand factor during disease development in the aging diabetic patient population*. Age (Dordr), 2013. **35**(1): p. 171-7.
232. Vischer, U.M., et al., *von Willebrand factor (vWF) as a plasma marker of endothelial activation in diabetes: improved reliability with parallel determination of the vWF propeptide (vWF:AgII)*. Thromb Haemost, 1998. **80**(6): p. 1002-7.
233. Trappenburg, M.C., et al., *Chronic renal failure is accompanied by endothelial activation and a large increase in microparticle numbers with reduced procoagulant capacity*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(4): p. 1446-53.
234. Hollestelle, M.J., et al., *Decreased active von Willebrand factor level owing to shear stress in aortic stenosis patients*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(5): p. 953-8.
235. van Schie, M.C., et al., *von Willebrand factor propeptide and the occurrence of a first ischemic stroke*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(6): p. 1424-6.
236. Hollestelle, M.J., et al., *von Willebrand factor activation, granzyme-B and thrombocytopenia in meningococcal disease*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(5): p. 1098-106.
237. Djamiatun, K., et al., *Severe dengue is associated with consumption of von Willebrand factor and its cleaving enzyme ADAMTS-13*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(5): p. e1628.
238. Scheja, A., et al., *Von Willebrand factor propeptide as a marker of disease activity in systemic sclerosis (scleroderma)*. Arthritis Res, 2001. **3**(3): p. 178-82.
239. van der Land, V., et al., *Markers of endothelial dysfunction differ between subphenotypes in children with sickle cell disease*. Thromb Res, 2013. **132**(6): p. 712-7.
240. Hulstein, J.J., et al., *Acute activation of the endothelium results in increased levels of*

- active von Willebrand factor in hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets (HELLP) syndrome.* J Thromb Haemost, 2006. **4**(12): p. 2569-75.
241. Johansson, M.W., et al., *Markers of vascular perturbation correlate with airway structural change in asthma.* Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(2): p. 167-78.
242. Jacobi, P.M., et al., *von Willebrand factor propeptide to antigen ratio identifies platelet activation and reduced von Willebrand factor survival phenotype in mice.* J Thromb Haemost, 2018. **16**(3): p. 546-554.
243. Haberichter, S.L., *von Willebrand factor propeptide: biology and clinical utility.* Blood, 2015. **126**(15): p. 1753-61.
244. Sanders, Y.V., et al., *von Willebrand factor propeptide and the phenotypic classification of von Willebrand disease.* Blood, 2015. **125**(19): p. 3006-3013.
245. Haberichter, S.L., et al., *Assay of the von Willebrand factor (vWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased vWF survival.* Blood, 2006. **108**(10): p. 3344-3351.
246. Morgan, D.A., F.W. Ruscetti, and R. Gallo, *Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows.* Science, 1976. **193**(4257): p. 1007-8.
247. Morris, J.C. and T.A. Waldmann, *Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment.* Ann Rheum Dis, 2000. **59 Suppl 1**: p. i109-14.
248. Fehniger, T.A., M.A. Cooper, and M.A. Caligiuri, *Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer.* Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(2): p. 169-83.
249. Nelson, B.H., *IL-2, regulatory T cells, and tolerance.* J Immunol, 2004. **172**(7): p. 3983-8.
250. Cassell, D.J., et al., *Therapeutic enhancement of IL-2 through molecular design.* Curr Pharm Des, 2002. **8**(24): p. 2171-83.
251. Waldmann, T.A., *The IL-2/IL-15 receptor systems: targets for immunotherapy.* J Clin Immunol, 2002. **22**(2): p. 51-6.
252. Church, A.C., *Clinical advances in therapies targeting the interleukin-2 receptor.* QJM: An International Journal of Medicine, 2003. **96**(2): p. 91-102.
253. Bayer, A.L., et al., *Essential role for interleukin-2 for CD4(+)CD25(+) T regulatory cell development during the neonatal period.* J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 769-77.
254. Malek, T.R. and A.L. Bayer, *Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(9): p. 665-74.
255. Fehervari, Z., T. Yamaguchi, and S. Sakaguchi, *The dichotomous role of IL-2: tolerance versus immunity.* Trends Immunol, 2006. **27**(3): p. 109-11.
256. Rosenberg, S.A., *Interleukin-2 and the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer.* Cancer J Sci Am, 2000. **6 Suppl 1**: p. S2-7.
257. Rosenberg, S.A., *Progress in human tumour immunology and immunotherapy.* Nature, 2001. **411**(6835): p. 380-4.
258. Atkins, M.B., et al., *High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update.* Cancer J Sci Am, 2000. **6 Suppl 1**: p. S11-4.
259. Fisher, R.I., S.A. Rosenberg, and G. Fyfe, *Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma.* Cancer J Sci Am, 2000. **6 Suppl 1**: p. S55-7.
260. Waldmann, T.A., *The interleukin-2 receptor.* J Biol Chem, 1991. **266**(5): p. 2681-4.
261. Murakami, S., *Soluble interleukin-2 receptor in cancer.* Front Biosci, 2004. **9**: p. 3085-90.
262. Anderson, D.M., et al., *Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes.* J Biol Chem, 1995. **270**(50): p. 29862-9.

263. Bamford, R.N., et al., *The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 4940-4.
264. Leonard, W.J., et al., *The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: the role of the interleukin-2 receptor gamma chain as a common gamma chain, gamma c.* Immunol Rev, 1994. **138**: p. 61-86.
265. Gutsell, N.S. and T.R. Malek, *Formation of high affinity IL-2 receptors is dependent on a nonligand binding region of the alpha subunit.* J Immunol, 1994. **153**(9): p. 3899-907.
266. Rubin, L.A., G. Jay, and D.L. Nelson, *The released interleukin 2 receptor binds interleukin 2 efficiently.* J Immunol, 1986. **137**(12): p. 3841-4.
267. Rubin, L.A., et al., *Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro.* J Immunol, 1985. **135**(5): p. 3172-7.
268. Waldmann, T.A., *Anti-Tac (daclizumab, Zenapax) in the treatment of leukemia, autoimmune diseases, and in the prevention of allograft rejection: a 25-year personal odyssey.* J Clin Immunol, 2007. **27**(1): p. 1-18.
269. Junghans, R.P. and T.A. Waldmann, *Metabolism of Tac (IL2Ralpha): physiology of cell surface shedding and renal catabolism, and suppression of catabolism by antibody binding.* J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1587-602.
270. Komp, D.M., E. Shapiro, and J. McNamara, *Soluble interleukin-2 receptor in childhood non-Hodgkin's lymphoma.* Blood, 1988. **71**(4): p. 1172-4.
271. Fujita, N., et al., *Serum evaluation of the balance between soluble interleukin-2 and interleukin-4 receptors.* Cytokine, 2005. **32**(3-4): p. 143-8.
272. Bien, E., A. Balcerska, and D. Ciesielski, *[Diagnostic and prognostic significance of serum soluble interleukin 2 receptor in children with malignancies].* Wiad Lek, 2006. **59**(1-2): p. 10-5.
273. Sadeghi, M., et al., *Strikingly higher interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta and soluble interleukin-1 receptor antagonist (sIL-1RA) but similar IL-2, sIL-2R, IL-3, IL-4, IL-6, sIL-6R, IL-10, tumour necrosis factor (TNF)-alpha, transforming growth factor (TGF)-beta and interferon IFN-gamma urine levels in healthy females compared to healthy males: protection against urinary tract injury?* Clin Exp Immunol, 2005. **142**(2): p. 312-7.
274. Haack, M., T. Pollmacher, and J.M. Mullington, *Diurnal and sleep-wake dependent variations of soluble TNF- and IL-2 receptors in healthy volunteers.* Brain Behav Immun, 2004. **18**(4): p. 361-7.
275. Heaney, M.L. and D.W. Golde, *Soluble cytokine receptors.* Blood, 1996. **87**(3): p. 847-57.
276. Heaney, M.L. and D.W. Golde, *Soluble receptors in human disease.* J Leukoc Biol, 1998. **64**(2): p. 135-46.
277. Dejica, D., *Serum soluble IL-2 receptor as a marker of lymphocyte activation in some autoimmune diseases. Effect of immunosuppressive therapy.* Roum Arch Microbiol Immunol, 2001. **60**(3): p. 183-201.
278. Correia, O., et al., *Soluble interleukin 2 receptor and interleukin 1alpha in toxic epidermal necrolysis: a comparative analysis of serum and blister fluid samples.* Arch Dermatol, 2002. **138**(1): p. 29-32.
279. Romaldini, C.C., et al., *Serum soluble interleukin-2 receptor, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha levels in children with celiac disease: response to treatment.* J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2002. **35**(4): p. 513-7.
280. Grutters, J.C., et al., *Serum soluble interleukin-2 receptor measurement in patients*

- with sarcoidosis: a clinical evaluation.* Chest, 2003. **124**(1): p. 186-95.
281. Lis, A.D. and L.A. Brzezinska-Wcislo, [*Soluble receptors of cytokines in sera of patients with systemic sclerosis--clinical correlation*]. Wiad Lek, 2003. **56**(11-12): p. 532-6.
282. Gustot, T., et al., *Profile of soluble cytokine receptors in Crohn's disease.* Gut, 2005. **54**(4): p. 488-95.
283. Can, M., et al., *The effect of montelukast on soluble interleukin-2 receptor and tumor necrosis factor alpha in pediatric asthma.* Allergy Asthma Proc, 2006. **27**(4): p. 383-6.
284. Fukushima, N., et al., *Blockade of IL-2 receptor suppresses HTLV-I and IFN-gamma expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.* Intern Med, 2007. **46**(7): p. 347-51.
285. Fawcett, P.T., et al., *Serial measurement of soluble interleukin 2 receptor levels: an early indicator of treatment response for Lyme disease.* J Rheumatol, 1993. **20**(6): p. 996-8.
286. Soker, M., et al., *Serum levels of IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, IL-8, and TNF-alpha in febrile children with cancer and neutropenia.* Med Oncol, 2001. **18**(1): p. 51-7.
287. Matsuno, O., et al., *Elevated concentrations of soluble IL-2 receptor in both bronchoalveolar lavage fluid and serum in a patient with BOOP.* Tohoku J Exp Med, 2003. **201**(1): p. 61-5.
288. Makis, A.C., et al., *Serum levels of soluble interleukin-2 receptor alpha (sIL-2Ralpha) as a predictor of outcome in brucellosis.* J Infect, 2005. **51**(3): p. 206-10.
289. Shitrit, D., et al., *Role of soluble interleukin-2 receptor levels in patients with latent tuberculosis.* Lung, 2006. **184**(1): p. 21-4.
290. Warle, M.C., et al., *Early differentiation between rejection and infection in liver transplant patients by serum and biliary cytokine patterns.* Transplantation, 2003. **75**(1): p. 146-51.
291. Kami, M., et al., *Serum levels of soluble interleukin-2 receptor after bone marrow transplantation: a true marker of acute graft-versus-host disease.* Leuk Lymphoma, 2000. **38**(5-6): p. 533-40.
292. Ishii, R., et al., *High serum values of soluble CD154, IL-2 receptor, RANKL and osteoprotegerin in Langerhans cell histiocytosis.* Pediatr Blood Cancer, 2006. **47**(2): p. 194-9.
293. Bien, E. and A. Balcerska, *Serum soluble interleukin 2 receptor alpha in human cancer of adults and children: a review.* Biomarkers, 2008. **13**(1): p. 1-26.
294. Wada, H., et al., *Plasma cytokine levels in thrombotic thrombocytopenic purpura.* Am J Hematol, 1992. **40**(3): p. 167-70.
295. Wada, H., N. Minami, and S. Shirakawa, [*Cytokine levels in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura*]. Nihon Rinsho, 1993. **51**(1): p. 151-4.
296. Stanley M, M.J., *Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) [Updated 2019 Apr 2]*. 2019, Treasure Island (FL): : StatPearls Publishing; . 1-5.
297. Franchini, M. and P.M. Mannucci, *Advantages and limits of ADAMTS13 testing in thrombotic thrombocytopenic purpura.* Blood Transfus, 2008. **6**(3): p. 127-35.
298. Peyvandi, F., et al., *ADAMTS-13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura.* J Thromb Haemost, 2010. **8**(4): p. 631-40.
299. Scheiflinger, F., et al., *Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura.* Blood, 2003. **102**(9): p. 3241-3.
300. Jin, M., et al., *Relationship between ADAMTS13 activity in clinical remission and the risk of TTP relapse.* Br J Haematol, 2008. **141**(5): p. 651-8.

301. Ferrari, S., et al., *IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura*. *J Thromb Haemost*, 2009. **7**(10): p. 1703-10.