

# ЗНАЧАЈ ПРОТЕАЗЕ ФОН ВИЛЕБРАНДОВОГ ФАКТОРА У ЕТИОПАТОГЕНЕЗИ ТРОМБОТИЧКЕ ТРОМБОЦИТОПЕНИЈСКЕ ПУРПУРЕ

Нада СУВАЏИЋ-ВУКОВИЋ

Институт за хематологију, Клинички центар Србије, Београд

## КРАТАК САДРЖАЈ

Тромботичка тромбоцитопенијска пурпура (ТПП) је дисеминовани облик тромботичке микроангиопатије. Класичну клиничку слику чине: тромбоцитопенија, микроангиопатска хемолитна анемија, разноврсни неуролошки поремећаји, повишена телесна температура и оштећена функција бубрега. У настанку ТПП улогу имају оштећење ендотела, активација процеса апоптозе и чиниоци који изазивају активацију и агрегацију тромбоцита. У плазми великог броја особа оболелих од ТПП доказано је неутрализујуће аутоантитело, уперено против протеазе која разграђује циновске мултимере Фон Вилебрандовога (*von Willebrand*) фактора (*vWF*). Такође, постоји врло редак породични облик ТПП изазван изостанком синтезе протеазе услед мутације оба алела који је кодирају. Сматра се да недостатак ове протеазе, било да је стечен или урођен, доводи до нагомилвања неразграђених циновских мултимера *vWF*, који у микроциркулацији, под дејством силе смицања, изазивају агрегацију тромбоцита, доводећи тиме до патофизиолошког супстрата за настанак ТПП. Клонирање молекула, а потом и синтеза ове протеазе омогућиће нови напредак у дијагностиковању и лечењу ТПП. Наиме, засада се, због недостатка стандардизованог и свима доступног теста, дијагноза ТПП поставља на основу утврђене дијагностичке дијаде: тромбоцитопеније и микроангиопатске анемије када други узроци њиховог настанка изостају, док је и даље златни стандард у лечењу ТПП терапијска измена плазме. Досадашњи тестови за дозирање протеазе у стању су да разликују ТПП од хемолитичко-уремичког синдрома и других облика микроангиопатског синдрома. Тестови се међусобно разликују према врсти коришћеног супстрата и дена-туранта, методи откривања и трајању извођења.

**Кључне речи:** тромботичка тромбоцитопенијска пурпура; етиопатогенеза; протеаза Фон Вилебрандовога фактора

## УВОД

Тромботичка тромбоцитопенијска пурпура (ТПП) је редак клинички синдром који се одликује стварањем дисеминованих оклузивних тромбоцитних агрегата у терминалним артериолама и капиларима [1-5]. Болест се испољава у виду тромбоцитопеније и интраваскуларне хемолитне анемије, која настаје фрагментацијом еритроцита при проласку кроз зачепљене ситне крвне судове организма. Оклузија ситних крвних судова доводи до хипоксије ткива и последичне дисфункције органа, посебно централног нервног система, гастроинтестиналног тракта и бубрега. Повишена телесна температура се јавља код више од 50% оболелих особа [1-5].

## ПАТОФИЗИОЛОГИЈА ТПП

Формирање тромбоцитних агрегата је кључни поремећај у настанку ТПП, али његова етиопатогенеза засад није потпуно разјашњена [1, 2]. Значајну улогу у настанку тромбоцитних микроагрегата имају: промене ендотела, мултимери Фон Вилебрандовога (*von Willebrand*) фактора (*vWF*) и супстанце које изазивају агрегацију тромбоцита.

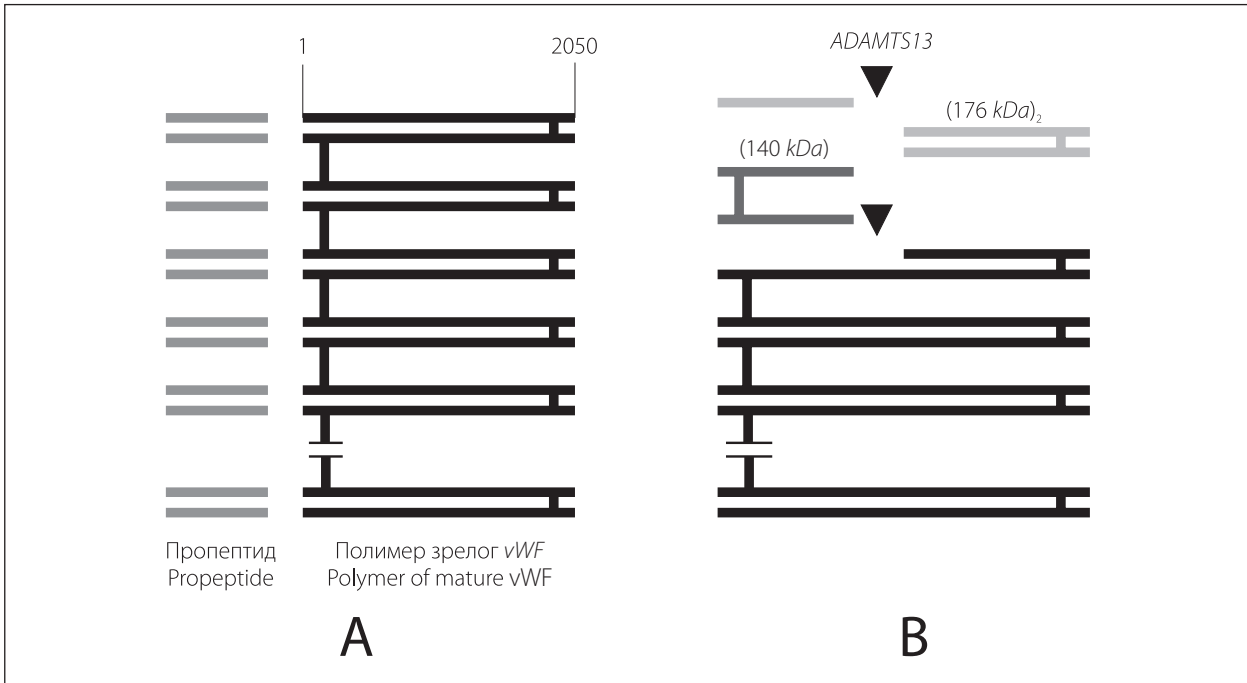
## ЕНДОТЕЛ

Као могући патогенетски фактор у настанку ТПП наводи се оштећење ендотела [6, 7] које може настати дејством имуних комплекса, азот-оксида и антитела уперених против ендотела крвних судова. Наиме, по-

казано је да серум оболелих од ТПП стимулише синтезу ткивног фактора коагулације у култури ћелија пупчане вене [8] и да изазива апоптозу ендотелних ћелија *in vitro* путем рецептора *Fas* [9]. Такође је показано да у плазми оболелих од ТПП постоје аутоантитела уперена против *CD36*, који се експримира на ендотелним ћелијама и тромбоцитима [10]. У плазми оболелих од ТПП доказане су и значајно снижене вредности простацилина, снажног инхибитора агрегације тромбоцита пореклом из ендотела [11].

## ФОН ВИЛЕБРАНДОВ ФАКТОР

*vWF*, гликопротеин, неопходан у процесу хемостаза, састоји се од идентичних субјединица масе 250 *kDa*, међусобно повезаних дисулфидним мостовима у мултимере, чија је величина од 500 до 20.000 *kDa* (Схема 1). Свака субјединица *vWF* се преко својих специфичних места везује за различите типове колагена, ванћелијски матрикс, тромбоцитне гликопротеине *GPIb* и *GP IIb-IIIa*, фактор *VIII:C*, хепарин, сулфиде, ботроцетин и ристоцетин. Мултимери *vWF* се синтетички углавном у Вајбел-Паладијевим телашцима ендотелних ћелија, а у мањој мери у мегакариоцитима. После активације ендотела различитим агенсима (хистамин, *Shiga* токсин, фактор туморске некрозе алфа, интерлеукини 6 и 8), долази до ослобађања циновских мултимера *vWF*. Наиме, Моук (*Moake*) са сарадницима [12] је први открио циновске мултимере *vWF* у плазми болесника с релапсирајућим хроничним обликом ТПП у фази клиничке ремисије и сугеришао да су ови, изразито адхезивни, *vWF* мултимери својим везивањем за гликопротеинске комплексе на површини тромбо-



**СХЕМА 1.** Процес полимеризације и разградње молекула vWF под дејством ADAMTS13 [28].

**SCHEME 1.** Process of VWF polymerization and cleavage by ADAMTS13 [28].

A: Димери про-vWF се повезују дисулфидним везама у полимер, док је пропептид хидролитичким путем отцепљен.

B: Ензим ADAMTS13 хидролизом пептида на месту Tyr842-Met843 цепа циновски молекул vWF на низ мањих мултимера. Као нуспроизвод на-стају фрагменти vWF масе од 176 и 140 kDa.

A: Pro-vWF dimers are linked by disulfide bonds to form a polymer while the propeptide is cleaved.

B: Cleavage by ADAMTS13 at the peptide bond Tyr842-Met843 converts the endothelial vWF to a series of multimers. In this process 176-kDa and 140-kDa fragments are generated.

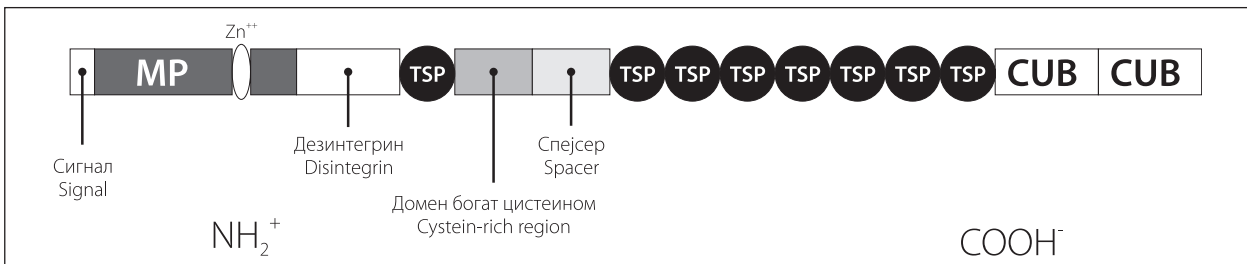
цита – GP Iba и IIb-IIIa одговорни за стварање тром-боцитних агрегата у микроциркулацији под дејством силе смицања (тзв. shear stress). Наиме, у циркулацији здравих особа се никада не могу наћи циновски мул-тимери vWF, већ само мањи мултимери vWF масе од 140, 189, 176 и 225 kDa, настали протеолитичким раз-лагањем циновских мултимера.

### ПРОТЕАЗА ЗА VWF – ADAMTS13

Протеаза која разлаже циновске мултимере vWF – дезинтегрин ADAMTS13, металопротеиназа, која испољава структурну сличност са тромбоспондином тип 1 (A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 motifs), откривена је 1992. и добила је назив ADAMTS13 [13] као 13. по реду од 20 досад

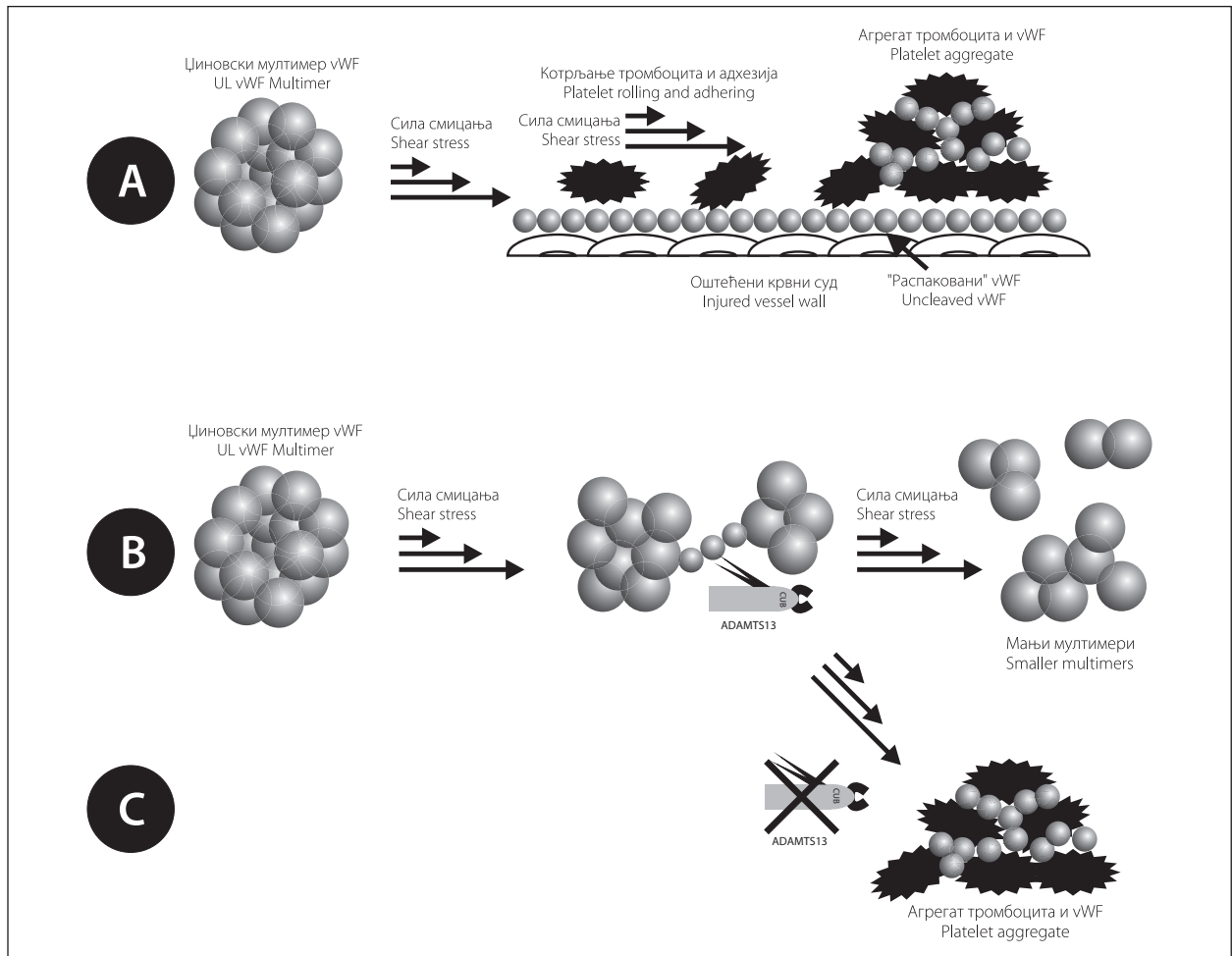
препознатих ензима из породице ADAMTS. Састо-ји се од 29 егзона и 1.427 аминокиселинских остата-ка, има 37 kDa, а за њену активност су неопходни јони цинка (Zn<sup>++</sup>) и бабра (Cu<sup>++</sup>) (Схема 2).

Сила смицања у микроциркулацији здравих особа мења конформацију циновских мултимера vWF, до-водећи до разоткривања на ланцу vWF места за вези-вање гликопротеинских рецептора тромбоцита с јед-не стране и до повећања протеолизе vWF у реакци-ји са ADAMTS13, са друге стране [2, 14, 15]. Утврђено је такође постојање директне корелације између ин-тензитета силе смицања с једне стране и интензита-та агрегације тромбоцита с друге. Наиме, што је ин-тензивнија сила смицања у микроциркулацији, то ве-зна места за гликопротеинске рецепторе тромбоцита на молекулу vWF постају приступачнија, а агрегација тромбоцита интензивнија (Схеме 3 и 4).



**СХЕМА 2.** Доменска структура молекула ADAMTS13 [28]: сигнални пептид, металопротеиназни домен (MP) с рецепторским местом за цинк (Zn), дезинтегринска секвенца, регион богат цистеином, спејсер, тромбоспондин тип 1 репетитивне (TSP) секвенце и два домена CUB (Complement subcomponents C1r/C1s; embryonic sea Urchin protein efg; and Bone morphogenic protein-1), који имају улогу у препознавању супстрата, тј. vWF.

**SCHEME 2.** Domain structure of vWF cleaving protease ADAMTS13 [28]: a signal peptide, a metalloprotease (MP) domain with a zink-binding motif (Zn), a disintegrin sequence, a cysteine-rich region, a spacer domain and thrombospondin type1 (TSP) repeats and 2 CUB domains (Complement subcomponents C1r/C1s; embryonic sea Urchin protein efg; and Bone morphogenic protein-1) involved in substrate (vWF) recognition.



**СХЕМА 3.** Приказ деловања силе смицања и ADAMTS13 на процес интерреакције између vWF и тромбоцита [28].

**SCHEME 3.** The role of shear stress and ADAMTS13 in regulating the interreaction between vWF and platelets [28].

A: Циновски молекул vWF под дејством силе смицања на оштећеном ендотелу прелази из глобуларног облика у ланац, састављен од малих глобула, који се пружа у правцу деловања силе смицања (изглед „ниске бисера“). На овај начин су омогућени котрљање, адхезија и агрегација тромбоцита.

B: У циркулацији ADAMTS13 хидролизује молекуле vWF уколико су везна места за ензим на њима разоткривена под дејством силе смицања. У процесу хидролизе настају мањи мултимери vWF.

C: Кода изостаје ADAMTS13, циновски молекули vWF се потпуно развију, доводећи до агрегације тромбоцита у микроциркулацији.

A: Ultralarge vWF multimer (ULvWF) is unfolded by shear stress on an injured vessel wall, changing its globular conformation into a chain of small globules along the direction of shear stress.

B: In the circulation, ADAMTS13 cleaves vWF whenever its cleavage sites are exposed by shear stress. In this process, smaller multimers are generated.

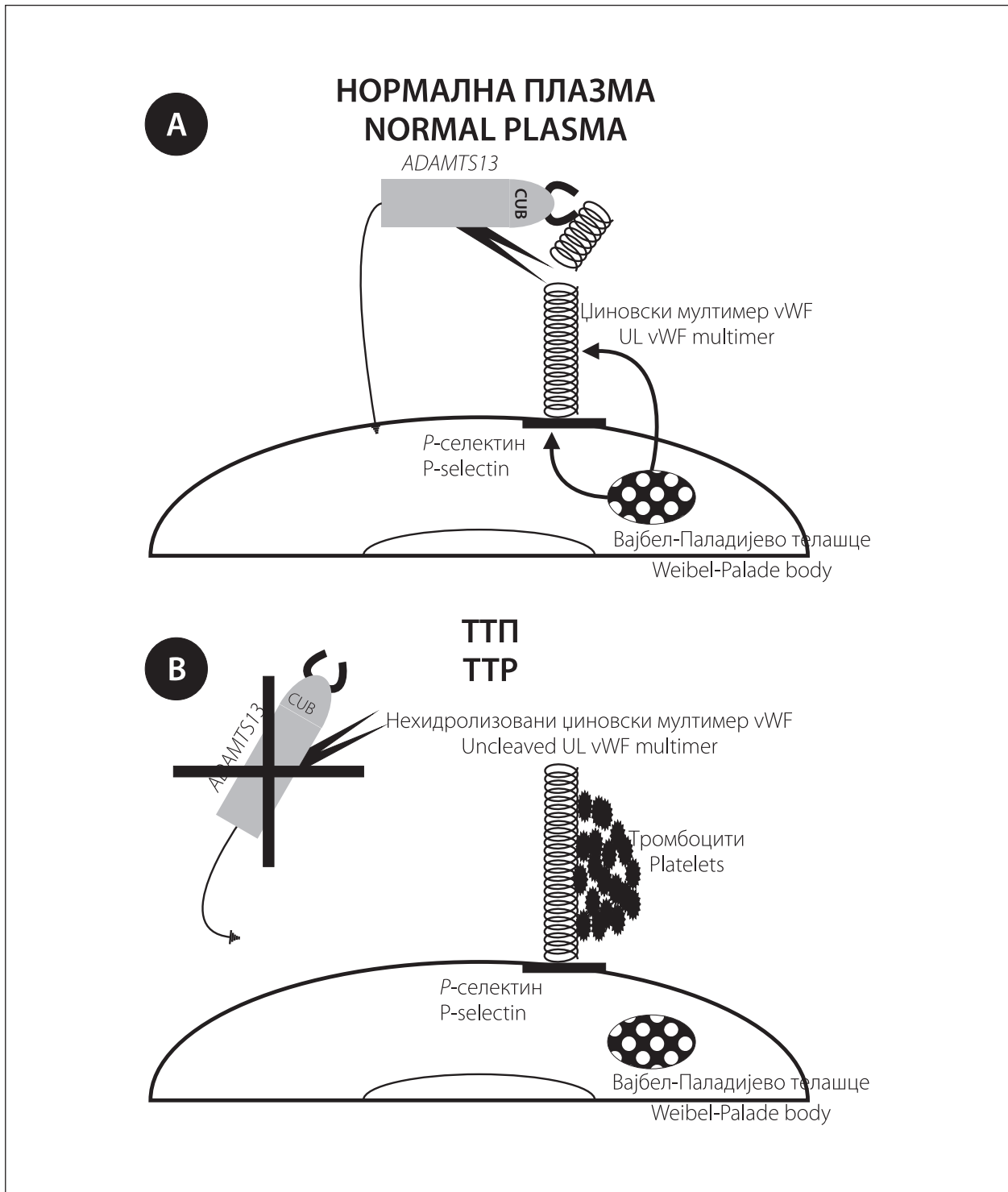
C: In the absence of ADAMTS13, vWF becomes unfolded inducing formation of platelet thrombi in microcirculation.

Досада су сви описани урођени и стечени идиопатски облици ТТП били удружени с тешким недостатком ADAMTS13, док је у неким стеченим секундарним облицима ТТП забележен нормални ниво протеазе, што говори о хетерогености ТТП [16]. С друге стране, независне студије Цаија (*Tsai*) и Лијана (*Lian*) [17] и Фурлана (*Furlan*) и сарадника [18] удариле су темеље хипотези о аутоимуној природи ТТП. Наиме, у плазми особа оболелих од ТТП откривено је неутралишуће аутоантитело класе IgG уперено против ADAMTS13. Нагомилани, неразграђени циновски мултимери vWF доводе до стварања тромбоцитних агрегата у микроциркулацији. Антитела уперена против протеазе се привремено налазе у плазми особа оболелих од ТТП и не откривају се у фази ремисије. У серији од 25 болесника са стеченим ТТП код којих је одређиван ниво ADAMTS13 показано је да су антитела уперена против епитопа лоцираних на два

домена – спејсеру и региону богатом цистеином, што указује на то да ови домени имају улогу у разградњи vWF [19]. Налаз смањене концентрације ADAMTS13 у плазми се може наћи и у многим другим патолошким стањима, али су вредности ADAMTS13 обично веће од 5%. С друге стране, ТТП на терену трансплантације удружен је са нормалном концентрацијом ADAMTS13 [20] (Табела 1).

### КЛАСИФИКАЦИЈА ТТП, УЧЕСТАЛОСТ И ЛЕЧЕЊЕ

ТТП није јединствен синдром, већ представља хетерогену болест. Постоји неколико ентитета који се разликују према непосредном узрочнику или покретачу, постојању аутоантитела против ADAMTS13, клиничкој слици и реаговању на примену плазме:



**СХЕМА 4.** Приказ активности *ADAMTS13* у плазми здравих и плазми болесника са ТТП [15].

**SCHEME 4.** ADAMTS13 plasma activity in healthy individuals and TTP patients [15].

**A:** Код здравих особа *ADAMTS13* се у плазми везује за циновске мултимере *vWF*, који се у виду дугих ланаца луче из стимулираних ендотелних ћелија. Циновски мултимери *vWF* су преко *P*-селектина, који се истовремено са *vWF* лучи из ендотелних ћелија, везани за мембрану ендотелних ћелија. Молекул *ADAMTS13* се преко свог *CUB* домена закачи за циновски мултимер *vWF* и хидролизује пептидну везу Tyr842-843-Met. Мали *vWF* молекули, настали хидролизом, не изазивају адхезију и агрегацију тромбоцита у микроциркулацији здравих особа.

**B:** Изостанак или смањење концентрације (мање од 5%) *ADAMTS13* код болесника са ТТП спречава правовремену хидролизу циновских мултимера *vWF* излучених из ендотелних ћелија. Нагомилани циновски мултимери *vWF* изазивају адхезију и агрегацију тромбоцита у микроциркулацији.

**A:** In healthy individuals, ADAMTS13 molecules from plasma attach to ultralarge VWF (ULvWF) multimers which are secreted in long strings from stimulated endothelial cells. ULvWF strings are anchored to the endothelial cells by P-selectin molecules, secreted simultaneously with vWF. ADAMTS13 molecule, attached to ULvWF via CUB domain cleave the peptide bond Tyr842-843Met. The smaller vWF forms do not induce platelet adhesion and aggregation in the microcirculation of healthy individuals.

**B:** Absent or reduced activity (<5%) of ADAMTS13 in TTP patients prevents ULvWF hydrolysis. Uncleaved ULvWF multimers induce platelet adhesion and aggregation.

ТАБЕЛА 1. Приказ активности *ADAMTS13* у различитим патолошким и физиолошким стањима [20].  
 TABLE 1. *ADAMTS13* activity in various pathological and physiological conditions [20].

Тромботичка тромбоцитопенијска пурпура Thrombotic thrombocytopenic purpura	Степени снижења <i>ADAMTS13</i> Degrees of <i>ADAMTS13</i> decrement	Физиолошка и патолошка стања Pathological and physiological conditions	Степени снижења <i>ADAMTS13</i> Degrees of <i>ADAMTS13</i> decrement
Акутни спорадични; хронични релапсирајући Acute sporadic; chronic relapsing	↓↓↓↓	Новорођенчад Newborns	↓↓↓
Секундарни у оквиру трансплантације Secondary transplantation related	Нормална концентрација Normal concentration	Старење Ageing	↓
Секундарни удружен са тиклопидином и клопидрогелом Secondary ticlopidine and clopidrogel associated	↓↓↓	Трудноћа Pregnancy	↓↓
Секундарни удружен с малигнитетом Secondary malignancy associated	↓↓↓	Запаљење Inflammation	↓↓↓
		Сепса Sepsis	↓↓↓
		Тромбоцитопенија изазвана хепарином Heparin induced thrombocytopenia	↓↓
Хемолитичко-уремијски синдром Haemolytic uraemic syndrome		Цироза Cirrhosis	↓↓↓
		Уремија Uraemia	↓↓
Акутни спорадични или хронични релапсирајући Acute sporadic or chronic relapsing	Нормална концентрација или ↓↓↓↓ Normal concentration or ↓↓↓↓	Постоперациони период Postoperatively	↓↓↓

- Хронични релапсирајући (фамилијарни ТТП) се обично јавља у раном детињству и одликују га епизоде ТТП предвидљиве учесталости (на 21-28 дана) [21]. Сматра се да је изазван или изостанком (мање од 5%) или постојањем нефункционалног *ADAMTS13* и повољно реагује на инфузије плазме. Последица је мутације оба алела за *ADAMTS13* на *9q14*, тј. јавља се код или хомозигота или двоструких хетерозигота. Фамилијарни ТТП се може испољити први пут и у старијем узрасту с интермитентним епизодама ТТП на терену хиперсекреције циновских *vWF* из стимулисаног ендотела под дејством естрогена (трудноћа) или проинфламационих цитокина (инфекција) [2, 15, 16];
- Акутни идиопатски облик (80% свих случајева ТТП);
- Секундарна ТТП је често удружена с клиничким стањима која се описују као преципитирајући фактори, а то су најчешће трудноћа, лекови, малигнитети, инфекције, аутоимуне болести и трансплантација органа [22].

Учесталост ТТП је 3,7 оболелих на милијарду становника, а најчешће оболевају жене у тридесетим годинама [1]. Референтни центри за ТТП саопштавају да је учесталост овог обољења у сталном порасту, што се не може приписати само бољем препознавању овог синдрома [23]. ТТП се данас успешно лечи терапијским изменама плазме (ТИП), а морталитет није већи од 15% [24-27]. Наиме, овим терапијским поступком из оболелог организма се одстрањују циновски мултимери *vWF* и фактори који оштећују ендотел, а надокнађује *ADAMTS13* који недостаје.

Због непостојања стандардизованог и свима доступног теста, дијагноза ТТП се засада заснива на

клиничкој слици, лабораторијским параметрима интраваскуларне хемоллизе уз нормалне рутинске тестове хемостазе и *D*-димера [1, 2].

### ТЕСТОВИ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ *ADAMTS13*

У светлу сазнања о кључној улози *ADAMTS13* у станку ТТП, све је већа потреба за тестом који би мерио ниво *ADAMTS13* и тиме омогућио постављање ране дијагнозе ове болести. Идеалан би био брзи тест с уским опсегом нормалних вредности *ADAMTS13* у плазми, а не са 50-175%, колико се добија садашњим тестовима [2, 14, 15]. Изразито смањење нивоа *ADAMTS13* (мање од 5%) сматра се типичним за ТТП, а све више се у литератури одомаћује нова дефиниција ТТП: „протромботичко стање у микроциркулацији изазвано изразито смањеном концентрацијом *ADAMTS13*” [2]. Наиме, одређивањем нивоа *ADAMTS13* могуће је препознати и оне болеснике са ТТП који немају ни тромбоцитопенију, ни фрагментациону анемију. Наиме, описане су три болеснице с клиничком сликом цереброваскуларног инсульта у фази опоравка од акутне епизоде ТТП, а без придружене тромбоцитопеније и анемије. Да је реч о егзацербацији ТТП доказано је на основу налаза мале концентрације *ADAMTS13* у плазми болесница и повољног одговора на ТИП [28, 29].

У савременој литератури је досад описано осам врста различитих тестова за одређивање концентрације *ADAMTS13* у плазми [30-37]. Сви тестови се изводе у две фазе: у првој се одвија протеолиза супстрата посредством *ADAMTS13* из испитиване плазме, док се у другој фази мери концентрација преосталог супстра-



та. Тестови се међусобно разликују према врсти коришћеног супстрата и денатуранта, дужини инкубације и методу откривања. Наиме, као супстрат се користе пречишћени цео молекул *vWF* [30-33], рекомбинатни цео молекул *vWF* [34] или делић *vWF* [35-37]. Као денатурант се користе 1,5 М уреа [30, 32, 33] или 0,15 гуанидин-хлорид [31] или се, пак, не користи денатурант [35-37]. С друге стране, инкубација може трајати од 20 минута [35] до осам часова [33, 34], а као метод откривања се користе електрофореза на SDS агароза-гелу и плоакриламид-гелу, комбинована с имуноблотом [30, 31, 35], имунорадиометрија [34] и тест *ELISA* (ензимско имуноодређивање) [36, 37].

Како антикоагуланс *EDTA* (калијумова со етилендиаминотетрасирћетне киселине) спречава активност *ADAMTS13*, крв за тестирање се узима на цитрату, хепарину и хирудину [2, 15]. Нажалост, показано је да слободни хемоглобин, настао хемоллизом *in vivo* или *in vitro*, може инхибирати активност *ADAMTS13* и тиме довести до грешке у интерпретацији резултата [38]. Због релативно дугог полуживота *ADAMTS13* у плазми од 2,6 дана, трансфузије еритроцита и тромбоцита могу да доведу до повећања нивоа *ADAMTS13* у плазми болесника [15].

### ЗАКЉУЧАК

У погледу даљег развоја у области ТТП, неопходно је проналажење поузданог дијагностичког теста за ТТП, брзог, јефтиног, стандардизованог и једноставног за извођење и тумачење. Такође је неопходна тачна процена значаја одређивања активности *vWF* протеазе, како у дијагностиковању, тако и у надгледању болесника током лечења. Наиме, корелација између нивоа *ADAMTS13* и клиничке слике и тока болести засад није у потпуности разјашњена, јер има болесника с идиопатским обликом ТТП у дуготрајној стабилној ремисији, с хронично ниским нивоом *ADAMTS13*, као и болесника с урођеним недостатком *ADAMTS13*, који годинама живе без испољавања болести. Исто тако, уочена је већа стопа смртности код болесника са тежим недостатком ензима у односу на болеснике са блажим недостатком [39].

### ЛИТЕРАТУРА

- George JN. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2000; 96:1223-9.
- Tsai HM. Advances in pathogenesis, diagnosis and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:1072-81.
- Suvajdžić-Vuković N. Novi koncepti u patogenezi trombozne trombocitopenijske purpure i terapijski pristup – Moscowitzov sindrom. In: Milenković P, editor. *Novine u hematologiji II*. Beograd: Vule; 2002.
- Suvajdžić N, Pandurović R, Rajić Z, et al. Rezultati lečenja trombozne trombocitopenijske purpure (TTP) – prikaz 36 bolesnika. *Vojnosanit Pregl* 2004; 61:621-7.
- Mačukanović-Golubović L, Marković D, Simonović O, Suvajdžić N. Savremeni pogled na trombotično trombocitopeničnu purpuru i hemolizno-uremijski sindrom. *Acta Fac Med Naiss* 2002; 19:128-34.
- Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, Suzumya J, Kaketani K.

- Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb Res* 1985; 38:467-79.
- Lammle B, Furlan M. New insights into the pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology. Education Program. Am Soc Hematol* 1999; 243-8.
- Wada H, Minami N, Shirakawa S. Cytokine levels in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Np R Jpn J Clin Med* 1993; 51:129-34.
- Laurence J, Mitra D. Apoptosis of microvascular endothelial cells in the pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 1997; 34:98-105.
- Tandon NN, Rock G, Jamieson GA. Anti-CD36 antibodies in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1994; 88:167-70.
- Chen YC, McLeod B, Hall ER, Wu KK. Accelerated prostacyclin degradation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Lancet* 1981; 2:267-9.
- Moake JL, Rudy KC, Troll JH, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic purpura. *N Engl J Med* 1982; 307:1432-5.
- Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood* 2001; 98:1654-61.
- Wyrick-Glatzel J. Thrombotic thrombocytopenic purpura and ADAMTS13: New insights into pathogenesis, diagnosis and therapy. *Lab Med* 2004; 35:733-40.
- Sadler JE, Moake JL, Miyata T, George JN. Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology. Education Program. Am Soc Hematol* 2004; 407-23.
- Veyradier A, Obert B, Houllier A, Meyer D, Girma JP. Specific von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases. *Blood* 2001; 98:1765-72.
- Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1998; 339:1585-94.
- Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. Von Willebrand-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998; 339:1578-84.
- Klaus C, Plaimauer B, Studt JD, et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004; 103:4514-9.
- Mannucci M. Thrombotic microangiopathies: thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. *Haematologica* 2003; 88:92-3.
- Upshaw JD. Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1978; 298:1350-2.
- Budišin Ž, Rajić Z, Suvajdžić N. Herpes zoster kao komplikacija lečenja i pokretač recidiva trombozno trombocitopenijske purpure – prikaz slučaja. *Bilt Transfuziol* 2003; 49:65-9.
- Torok TJ, Holman RC, Chorba TL. Increasing mortality from thrombotic thrombocytopenic purpura in the United States – analysis of national mortality data, 1968-1991. *Am J Hematol* 1995; 50:84-90.
- Bell WR, Braine HG, Ness PM, Kickler TS. Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med* 1991; 325:398-403.
- Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, et al, and the Canadian Apheresis Study Group. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Canadian Apheresis Study Group. N Engl J Med* 1991; 325:393-7.
- Rock G, Shumak KH, Sutton DM, Buskard NA, Nair RC. Cryosupernatant as replacement fluid for plasma exchange in thrombotic thrombocytopenic purpura. Members of the Canadian Apheresis Group. *Br J Haematol* 1996; 94:383-6.
- Suvajdžić N, Budišin Ž, Elezović I. The successful treatment of refractory thrombotic thrombocytopenic purpura with vincristine: a case report. *Haema* 2005; 8:22-8.
- Tsai HM, Shulman K. Rituximab induces remission of cerebral ischemia caused by thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2003; 70:183-5.
- Downes KA, Yomtovian R, Tsai HM, Silver B, Rutherford C, Sarode C. Relapsed thrombotic thrombocytopenic purpura presenting as an acute cerebrovascular accident. *J Clin Apheresis* 2004; 19:86-9.
- Furlan M, Robles R, Lammle B. Partial purification and

- characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by *in vivo* proteolysis. *Blood* 1996; 87:4223-34.
31. Tsai HM, Lian EC. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 1996; 87:4235-44.
  32. Gerritsen HE, Turecek PL, Schwarz HP, Lammle B, Furlan M. 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; 82:1386-9.
  33. Bohm M, Vigh T, Scharrer I. Evaluation and clinical application of a new method for measuring activity of von Willebrand factor cleaving metalloprotease (ADAMTS13). *Ann Hematol* 2002; 81:430-5.
  34. Obert B, Tout H, Veyradier A, Fressinaud E, Meyer D, Girma JP. Estimation of the von Willebrand factor-cleaving protease in plasma using monoclonal antibodies to vWF. *Thromb Haemost* 1999; 82:1382-5.
  35. Kokame K, Matsumoto M, Fujimara Y, Miyata T. vW73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS13. *Blood* 2004; 103:607-12.
  36. Whitelock JL, Nolasco L, Bernardo A, Moake J, Dong JF, Cruz MA. ADAMTS13 activity in plasma is rapidly measured by a new ELISA method that uses recombinant vWF-A2 domain as substrate. *J Thromb Haemost* 2004; 2:485-91.
  37. Zhou W, Tsai HM. An enzyme immunoassay of ADAMTS13 distinguishes patients with thrombotic thrombocytopenic purpura from normal individuals and carriers of ADAMTS13 mutations. *Thromb Haemost* 2004; 91:806-11.
  38. Studt JD, Kremer-Hovinga JA, Antonine G, et al. Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: *in vitro* inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood* 2005; 105:542-4.
  39. Vesely SK, George JN, Lammle B, 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; 100:60-8.

## THE ROLE OF VON WILLEBRAND PROTEASE IN AETIOPATHOGENESIS OF THROMBOTIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA

Nada SUVAJDŽIĆ-VUKOVIĆ

Institute of Haematology, Clinical Centre of Serbia, Belgrade

### ABSTRACT

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a disseminated form of thrombotic microangiopathy characterised by thrombocytopenia, microangiopathic haemolysis, a variety of neurologic disturbances, fever and renal dysfunction. Endothelial lesion, activation of apoptosis and factors which induce platelet adhesion and aggregation could play a role in pathogenesis of TTP. Recent studies have demonstrated the inhibiting autoantibody against von Willebrand factor (vWF) cleaving protease in plasma of a great majority of TTP patients. A rare congenital deficiency of protease due to genetic mutations on both alleles has also been described. The accumulation of the ultra-large vWF multimers, due to either congenital or acquired deficiency of protease, exposed to the fluid shear stress in the microcirculation, induces formation of the platelet thrombi thus causing TTP. Cloning and synthesis of the molecular structure of protease raise the prospect for advances in diagnosis and treatment of the disease. Namely, in the absence of the inexpensive, more accurate and commonly available test,

a diagnosis is based on the diagnostic dyad: thrombocytopenia and microangiopathic haemolytic anaemia in the absence of other cause. Also, in the absence of the enzyme replacement therapy, a therapeutic plasma exchange remains a gold standard in the treatment of TTP patients. Current assay methods for vWF protease could distinguish TTP from haemolytic uraemic syndrome and other microangiopathic syndromes. All current assays differ in the substrate nature, denaturant, incubation time or the detection method.

**Key words:** thrombotic thrombocytopenic purpura; aetiopathogenesis; von Willebrand factor-cleaving protease

Nada SUVAJDŽIĆ-VUKOVIĆ  
 Institut za hematologiju  
 Klinički centar Srbije  
 Dr Koste Todorovića 2, 11000 Beograd  
 Tel.: 011 244 5720  
 E-mail: nvukovic@eunet.yu