VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

Ny markør ved trombotisk trombocytopenisk purpura

Afdelingslæge Jens Peter Gøtze, ledende kemiker Andreas Hillarp, overlæge Anders Lindblom, overlæge Peter Björk, afdelingslæge Karin Strandberg & professor Lars Bo Nielsen

Rigshospitalet, Klinisk Biokemisk Afdeling, Københavns Universitet, Biomedicinsk Institut, og Universitetssjukhuset MAS, Klinisk kemi, Hematologi-Koagulationssektionen, Hemoimmunoterapi, Klinik för njurmedicin och transplantation Malmø, Sverige

Resume

Der findes flere trombotiske mikroangiopatier, som kan være svære at adskille ud fra den kliniske præsentation. Mangel på et nyopdaget enzym, *a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs* (ADAMTS)-13, kan forårsage trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP). Mangel på ADAMTS-13 fører til øgede koncentrationer af højmolekylære von Willebrand-faktor-former i plasma og fremmer dannelse af trombose i mikrovaskulaturen. ADAMTS-13-mangel kan være arvelig eller erhvervet. Nye metoder til bestemmelse af ADAMTS-13-aktivitet i plasma kan bidrage i den diagnostiske proces ved mistanke om TTP.

Begrebet trombotisk mikroangiopati dækker over en række tilstande med mikrovaskulær trombosering. Konsekvensen er øget trombocytforbrug og trombocytopeni. De ændrede gennemstrømningsforhold i mikrovaskulaturen kan desuden medføre fragmentering af erytrocytterne og hæmolyse. Trombotisk mikroangiopati ses hos patienter i alle aldersgrupper og bør overvejes ved feber, nyrepåvirkning, trombocytopeni og hæmolytisk anæmi. Neurologiske symptomer forekommer også hyppigt. Patogenesen ved trombotisk mikroangiopati kan ligesom det kliniske billede variere, hvilket yderligere vanskeliggør en korrekt diagnose [1, 2]. Feber og trombocytopeni ses også ved dissemineret intravaskulær koagulation (DIC), hvor aktivering af koagulationskaskaden medfører dannelse af fibrinrige tromber i mikrocirkulationen. I modsætning til ved DIC er mikrotromberne ved trombotisk mikroangiopati trombocytrige og fibrinfattige. DIC karakteriseres ved forbrug af koagulationsrelaterede parametre og vurderes ved trombocytantal, aktiveret partiel tromboplastintid og koagulationsfaktor II + VII + X (*international normalized ratio*). Hvis DIC er usandsynligt, bør man have mistanke om trombotisk mikroangiopati. Hvis trombotisk mikroangiopati er sandsynlig, bør man forsøge at skelne mellem trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP) og hæmolytisk uræmisk syndrom (HUS). Nedsat nyrefunktion forekommer oftere ved HUS end ved TTP, mens TTP i højere grad end HUS er associeret med symptomer fra det centrale nervesystem. Børn rammes oftere end voksne af HUS, som ofte forekommer i kombination med blodig diare.

Ved TTP indeholder mikrotromberne store mængder af glykoproteinet von Willebrand-faktor (vWF), som spiller en central rolle for trombocytternes adhæsion under den primære hæmostase. vWF secerneres fra endotelcellerne som store multimere former af proteinet bundet sammen med disulfidbroer. Ved TTP er vWF ikke i samme udstrækning som normalt spaltet til mindre former [3]. De store multimere vWF-former binder trombocytter i højere grad end de delvist spaltede former gør, hvilket fører til en akkumulering af trombocytaggregater og trombosedannelse i mikrovaskulaturen. TTP har en estimeret årlig incidens på ca. fire pr. million indbyggere [4]. Af og til kan TTP initieres af graviditet eller indtag af visse lægemidler [1, 2]. I forbindelse med graviditet kan TTP være vanskelig at adskille fra andre mikroangiopatier som præeklampsi og *hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets* (HELLP)-syndrom. TTP-lignende tilstande ses også efter knoglemarvstransplantation, hvor patogenesen ikke er klarlagt.

HUS karakteriseres også af trombocytholdige tromber i mikrocirkulationen, men patogenesen er en anden end ved

Faktaboks

Der findes flere nært beslægtede trombotiske mikroangiopatier, som kan være svære at adskille ud fra den kliniske præsentation. Mangel på et nyopdaget enzym, *a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs* (ADAMTS)-13, kan forårsage trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP).

ADAMTS-13 nedbryder von Willebrand-faktor (vWF) i plasma. Mangel på ADAMTS-13 fører til en øget andel af højmolekylære former af vWF, som har øget trombocytaggregerende egenskaber.

ADAMTS-13-mangel kan være arvelig eller erhvervet. Fra et behandlingsmæssigt synspunkt kan det være vigtigt at adskille arvelig nedsat produktion fra erhvervet autoantistofudvikling mod ADAMTS-13.

Nye analysemetoder til bestemmelse af ADAMTS-13-aktivitet i plasma kan bidrage i den diagnostiske proces ved mistanke om TTP. Testen har desuden et potentiale som prognostisk markør for sygdomsrecidiv.

TTP. Den hyppigste form af HUS skyldes *Shigella*-toksin-producerende *E. coli*-bakterier (serotype O157:H7). Den er associeret med hæmoragisk tyktarmskatar og diareer og kaldes ofte for typisk HUS eller D+-HUS. Toksiner fra bakterierne aktiverer endotelceller, hvilket øger trombocytadhæsionen og fører til den kliniske tilstand. HUS findes også i en arvelig form (af og til kaldet atypisk HUS eller D- HUS), hvor de molekylære defekter er relateret til komplementsystemet [5].

Indtil for nylig har der ikke været parakliniske markører til påvisning af TTP og til påvisning af, om årsagen er arvelig eller erhvervet. Det forhold er nu ændret ved erkendelsen af, at mangel på det vWF-spaltende enzym *a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs* (ADAMTS)-13 kan forårsage TTP. Det har medført en ny patofysiologisk forklaringsmodel for TTP og en laboratorietest, som man kan påvise sygdommen med. Den medicinske behandling af TTP og HUS ligger uden for rammerne af denne oversigtsartikel, men yderligere information herom kan findes blandt andet i en guideline fra Hemostasis and Thrombosis Task Force of the British Committee for Standards in Haematology [6] samt i nyere oversigtsartikler [7].

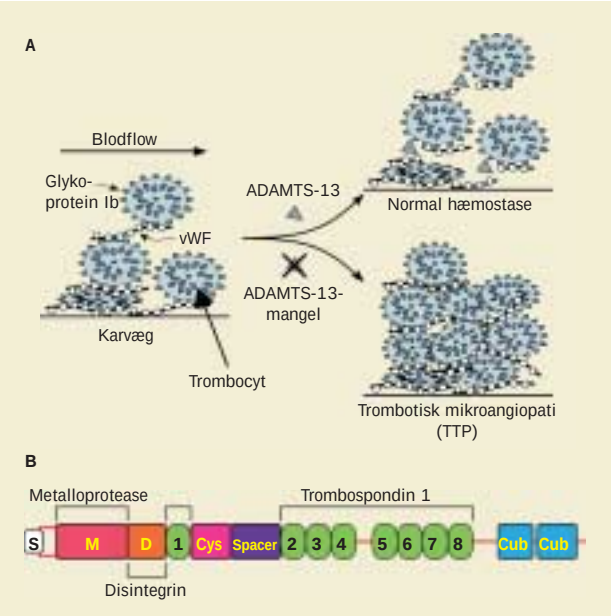
Metode

Der er foretaget søgning i MEDLINE-databasen med nøgleordene: *ADAMTS-13, thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP, haemolytic uremic syndrome, HUS, thrombotic microangiopathy, microangiopathic anaemia, von Willebrand factor* og *von Willebrand factor cleaving protease*. Oversigtsartikler og originalarbejder er medtaget, og referencelister fra de fundne artikler er gennemgået, hvor nøglearbejder er identificeret og fremskaffet.

Trombotisk trombocytopenisk purpura og ADAMTS-13

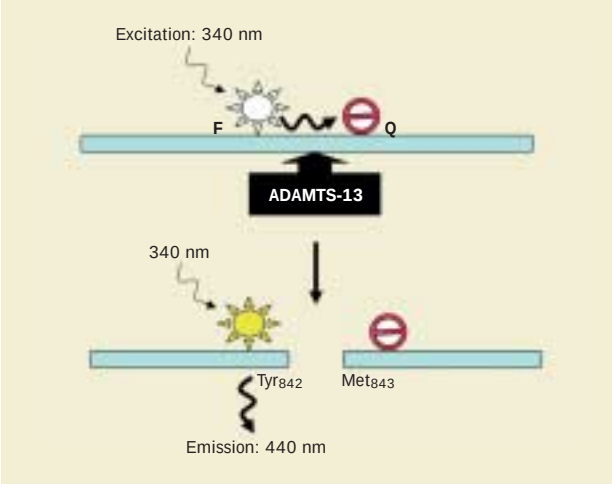
Siden 1980'erne har det været kendt, at patienter med TTP ofte har unormalt store multimere former af vWF i blodet. Det er dog først for nylig blevet klarlagt, at fundet skyldes nedsat aktivitet af enzymet ADAMTS-13, som spalter vWF (**Figur 1A**). Enzymet er det 13. medlem af en større familie af metalloproteinaser kaldet ADAMTS [9-11]. De fleste patienter med TTP har svært nedsat (< 5% af normal plasmaaktivitet) ADAMTS-13-aktivitet i plasma, hvilket enten skyldes genetiske defekter i ADAMTS-13-genet (også kaldet Upshaw-Schulman-syndrom) eller inaktivering af ADAMTS-13-proteinet forårsaget af antistoffer.

ADAMTS-13-genet er lokaliseret til kromosom 9q34 [9] og består af 29 exoner, som koder for et 1.427 aminosyrer stort protein med en teoretisk masse på 145 kDa. Den faktiske molekylvægt er 180 kDa, hvilket afspejler posttranslationel glykosylering af proteinet. ADAMTS-13 syntetiseres primært i leveren som et proprotein med multidomæne struktur (Figur 1B), hvor funktionen af de forskellige domæner ikke er fuldstændigt klarlagt. Flere domæner har betydning for den



Figur 1. A. En skematisk illustration af *a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs* (ADAMTS)-13 og von Willebrand-faktor (vWF) i mikrocirkulationen. ADAMTS-13 spalter nydannet vWF til mindre former med reduceret mulighed for at binde trombocytter. Ved mangel på ADAMTS-13 ses øget andel af højmolekylære vWF-former i cirkulationen med øget risiko for dannelse af tromboser i mikrovaskulaturen. (Modificeret efter [8] med tilladelse fra forfatteren). **B.** Den molekylære struktur af ADAMTS-13-proteinet. Efter et spacerdomæne (S) ses metalloproteasedomænet (M), et disintegrindomæne (D) og i alt otte trombospondinelementer samt to *complement component Clr/Cls, Uegf, and bone morphogenic protein 1* (CUB)-domæner. Hovedparten af de kendte mutationer ved trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP) er lokaliseret i den kodende sekvens for den første halvdel af molekylet, hvor man ved strukturfunktionsundersøgelser har påvist enzym-aktivitet af et trunkeret protein bestående af metalloproteasedomænet og det første trombospondin-*repeat*.

enzymatiske aktivitet eller interaktioner med vWF og andre proteiner på endotelet og i den ekstracellulære matrix. Der kendes i dag ca. 70 forskellige mutationer i ADAMTS-13-genet hos patienter med arvelig TTP. Mindre end halvdelen af mutationerne er blevet undersøgt eksperimentelt. De fleste mutationer medfører en nedsat frisætning af enzymet til blodbanen [1]. Sygdommen nedarves recessivt. Ved svær ADAMTS-13-mangel har probanden altid mutationer i begge alleller, enten en kombination af to forskellige mutationer (sammensat heterozygot) eller homozygoti for den samme mutation [1, 2]. Heterozygote bærere er asymptomatiske. Der findes ikke dokumentation for, at visse mutationer forårsager et alvorligere klinisk billede eller tidligere sygdomsdebut end andre. Det er omdiskuteret, hvorvidt en total mangel på ADAMTS-13 er foreneligt med liv. Der er ikke beskrevet patienter med deletioner i begge alleller, hvilket kan tale for, at en komplet mangel på enzymet ikke er foreneligt med liv. Dette udsagn er dog for nylig udfordret af en genmanipuleret musemodel, som helt mangler ADAMTS-13 og lever uden nævneværdige sygdomssymptomer [8]. Musene har som forventet store vWF-former i plasma, men udvikler først TTP, når koagulationssystemet stresses. Dette er i overensstem-



Figur 2. Analyseprincip ved direkte bestemmelse af *a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs* (ADAMTS)-13-aktivitet med det fluorescerende substrat (FRETS-vWF73). Det 73 aminosyrer lange peptid indeholder en fluorescerende gruppe (F), som kan emittere et fluorescerende lys på 440 nm. I det uspaltede substrat findes en *quench*'er (Q), som optager den fluorescerende energi. Ved spaltning af substratet separeres de to grupper fra hinanden, og den fluorescerende gruppe kan emittere lys, som opfanges med en detektor. Jo mere lys, som fanges, desto højere ADAMTS-13-aktivitet.

melse med, at TTP hos patienter forekommer intermitterende og kan opstå sent trods medfødt ADAMTS-13-mangel [12]. I genetiske undersøgelser har man påvist, at visse mutationer i ADAMTS-13-genet har en fælles oprindelse og forekommer relativt hyppigt i visse dele af verden. For eksempel har man beskrevet flere familier i Nord- og Centraleuropa med samme mutation [13]. Det er sandsynligt, at der findes flere homozygote mutationsbærere, som endnu ikke er blevet diagnosticeret. Prævalensen af arvelig TTP er derfor muligvis undervurderet.

En erhvervet TTP-form ses hos patienter med antistoffer mod ADAMTS-13. Kompleksdannelsen mellem ADAMTS-13 og antistofferne fører til neutralisering af enzymaktivitet og/eller øget elimination fra plasma. Mekanismen bag erhvervet TTP med udvikling af antistoffer er ikke klarlagt, men kan være sekundær til anden autoimmun sygdom eller lægemidlet tiklopidin [1, 2, 14]. Der findes rapporter, hvori det foreslås, at erhvervet TTP er betydelig mere almindeligt end arvelig ADAMTS-13-mangel. Forskelle i inklusionskriterierne mellem studierne gør det dog svært at fastslå prævalensen af autoantistoffer mod ADAMTS-13. ADAMTS-13-antistofferne har ofte en relativt lav titer, hvilket kan indikere, at antistofferne i mange tilfælde blot krydsreagerer med ADAMTS-13, og at det primære antigen er en anden struktur [2].

Målemetoder for ADAMTS-13-aktivitet

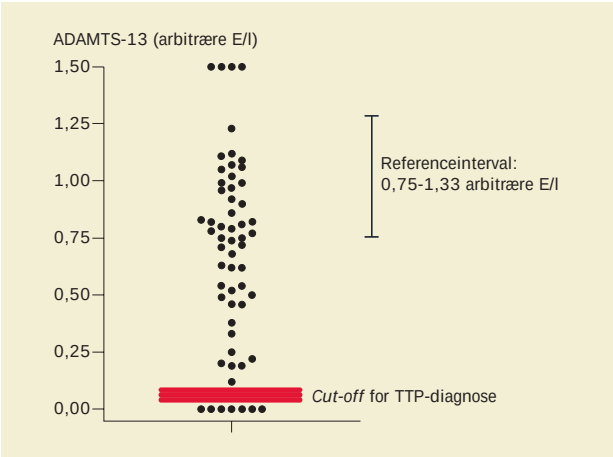
Der findes flere metoder til kvantificering af ADAMTS-13-aktiviteten i plasma [15-17]. De fleste er baseret på analyse af spaltningen af vWF. Plasmaprøven blandes med en kendt mængde vWF, hvorefter ADAMTS-13-aktiviteten kan beregnes ved at registrere effekten på vWF. Dette kan gøres ved analyse af dannede vWF-fragmenter efter elektroforetisk separation med efterfølgende detektion med speficikke antistoffer. Alternativt kan man bestemme vWF's evne til at agglutinere trombocytter eller at fæstne sig til overflader med vWF-bindende receptorer. Disse metoder er tidskrævende at udføre og passer derfor ikke til klinisk brug.

Der er for nylig udviklet andre metoder, som er baseret på syntetisk fremstillede fragmenter af vWF, der specifikt spaltes af ADAMTS-13 [18, 19]. En kommercielt tilgængelig variant er baseret på et 73 aminosyrer langt fragment af vWF, som går under betegnelsen FRETS-vWF73. Fragmentet er kemisk modificeret med en fluoroscerende gruppe og en anden gruppe (*quencher*), som fanger og »slukker« fluorescensen (**Figur 2**). Mellem de to grupper findes et spaltningssted for ADAMTS-13. Når substratet spaltes, separeres grupperne, og fluorescensen kan registreres af en fluorescensmåler. Fordelen ved denne metode er en høj specificitet for ADAMTS-13, og at analysen kan udføres på omkring en time. Med metoden registreres ADAMTS-13-mangel, uanset om den skyldes genetiske defekter eller forekomst af antistoffer. Analysen kan også anvendes til titerbestemmelse af antistoffer, der hæmmer ADAMTS-13-aktiviteten i plasma.

Klinisk betydning af ADAMTS-13 som markør

Forekomsten af svær ADAMTS-13-mangel ved TTP varierer mellem 33% og 100% i forskellige studier [1, 2, 14]. Frem for alt virker det som om, at svær ADAMTS-13-mangel er mindre hyppig ved sekundært udløst TTP, hvor kendte prædisponerende faktorer går forud for sygdommen. Årsager til variationen kan formentlig henføres til forskelligheder i kriterier for patientudvælgelse og metoder til at bestemme ADAMTS-13. Det skal understreges, at svær ADAMTS-13-mangel er sjældent ved HUS, hvilket gør det muligt at anvende prøven til at differentiere mellem TTP og HUS.

Nye observationer af prognostisk betydning blev præsen-



Figur 3. Bestemmelse af ADAMTS-13-aktivitet hos 151 patienter på Rigshospitalet. I internationale kliniske retningslinjer anbefaler man en beslutningsgrænse for trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP) ved ≤ 5% aktivitet.

teret ved kongressen arrangeret af American Society of Hematology i december 2006. Blandt andet blev der rapporteret om erfaringer fra det mest omfattende TTP-register med over 300 patienter (The Oklahoma TTP-HUS Registry) og et andet studie. I de to studier påpegede man samstemmende, at patienter med TTP og ‹ 10% af normal ADAMTS-13-aktivitet har betydelig større risiko for at udvikle recidiv end patienter højere ADAMTS-13-aktivitet har. Desuden var forekomsten af ADAMTS-13-antistoffer signifikant hyppigere hos patienter med recidiverende TTP. Der er dog stadig uklarheder angående den kliniske anvendelse af ADAMTS-13-analysen. Primært vides det ikke, hvordan man skal tolke moderat nedsat ADAMTS-13-aktivitet i plasma. Det er også vigtigt at huske på, at tilgængelige ADAMTS-13-referenceintervaller er baseret på sunde, voksne personer og derfor ikke nødvendigvis gælder hos børn og ældre. Det er også uklart, hvorledes ADAMTS-13-aktiviteten ændres ved andre sygdomstilstande. ADAMTS-13 syntetiseres først og fremmest i leveren, og svær mangel kan ses ved leversvigt i forbindelse med sepsis og DIC [20]. Akut inflammation mindsker også ADAMTS-13-aktiviteten i blodet [21]. Endelig kan forhøjet ADAMTS-13-aktivitet være associeret med sygdom, hvilket er beskrevet ved akut myokardieinfarkt [22]. Disse problemer er understreget af vores hidtidige erfaringer med måling af ADAMTS-13-aktivitet på Rigshospitalet. **Figur 3** viser, at en betydelig fraktion af de undersøgte patienter havde moderat nedsat ADAMTS-13-aktivitet i plasma, mens svær ADAMTS-13-mangel kun sås hos en lille gruppe af de undersøgte patienter.

Konklusion

Mangel på ADAMTS-13-aktivitet hæmmer spaltning af højmolekylære former af vWF og fremmer dannelse af trombocytrige tromber i mikrocirkulationen. Det kan give anledning til TTP. Vi anbefaler bestemmelse af ADAMTS-13-aktivitet i plasma ved mistanke om TTP. Nye undersøgelser tyder også på, at nedsat ADAMTS-13-aktivitet og forekomst af ADAMTS-13-antistoffer er vigtige prognostiske markører for recidiv af TTP.

Korrespondance: *Jens Peter Gøtze*, Klinisk Biokemisk Afdeling, Rigshospitalet, DK-2100 København Ø. E-mail: jpg@dadlnet.dk

Antaget: 25. januar 2008
Interessekonflikter: Ingen

Litteratur

1. Lämmle B, Kremer-Hovinga JA, Alberio L. Thrombotic thrombocytopenic purpura. J Thromb Haemost 2005;3:1663-75.
2. Tsai H-M. Current concepts in thrombotic thrombocytopenic purpura. Annu Rev Med 2006;57:419-36.
3. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. Annu Rev Biochem 1998;67:395-424.
4. Miller DP, Kaye JA, Ziyadeh N et al. Incidence of thrombotic thrombocytopenic purpura/haemolytic uremic syndrome. Epidemiology 2004;15:208-15.
5. Caprioli J, Noris M, Brioschi S et al. International Registry of Recurrent and Familial HUS/TTP. Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. Blood 2006;108:1267-79.
6. Allford SL, Hunt BJ, Rose P et al. Haemostasis and Thrombosis Task Force, British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of the thrombotic microangiopathic haemolytic anaemias. Br J Haematol 2003;120:556-73.
7. Mannucci PM. Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome: much progress and many remaining issues. Haematologica 2007;92:878-80.
8. Banno F, Kokame K, Okuda T et al. Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 2006;107:3161-6.
9. Levy GG, Nichols WC, Lian EC et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. Nature 2001;413:488-94.
10. Soejima K, Mimura N, Hirashima M 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;130:475-80.
11. Zheng X, Chung D, Takayama TK et al. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. J Biol Chem 2001;276:41059-63.
12. Furlan M, Lämmle B. Aetiology and pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uremic syndrome: the role of von Willebrand factor-cleaving protease. Best Pract Res Clin Haematol 2001;14:437-54.
13. Schneppenheim R, Kremer Hovinga JA, Becker T et al. A common origin of the 4143insA ADAMTS13 mutation. Thromb Haemost 2006;96:3-6.
14. Sadler JE. Thrombotic thrombocytopenic purpura: a moving target. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006:415-20.
15. Tripodi A, Chantarangkul V, Böhm M et al. Measurement of von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13): results of an international collaborative study involving 11 methods testing for the same set of coded plasmas. J Thromb Haemost 2004;2:1601-9.
16. Miyata T, Kokame K, Banno F. Measurement of ADAMTS13 activity and inhibitors. Curr Opin Hematol 2005;12:384-9.
17. Manea M, Kristoffersson A-C, Tsai H-M et al. ADAMTS13 phenotype in plasma from normal individuals and patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. Eur J Pediatr 2007;166:249-57.
18. Kokame K, Nobe J, Kokubo Y et al. FRETS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. Br J Haematol 2005;129:93-100.
19. Wu J-J, Fujikawa K, Lian EC et al. A rapid enzyme-linked assay for ADAMTS-13. J Thromb Haemost 2005;3:1-8.
20. Uno T, Mimuro J, Madoiwa S 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;107:528-34.
21. Reiter RA, Varadi K, Turecek PL et al. Changes in ADAMTS13 (von Willebrand-factor-cleaving protease) activity after induced release of von Willebrand factor during acute systemic inflammation. Thromb Heamost 2005;93:554-8.
22. Chion CKNK, Doggen CJM, Crawley JTB et al. ADAMTS13, von Willebrand factor and the risk of myocardial infraction in men. Blood 2007;109:1998-2000.