

Диагностика тромботической тромбоцитопенической пурпуры

Г.М. Галстян, Е.Е. Клебанова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

Аннотация

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП) – редкое угрожающее жизни заболевание, характеризующееся микроангиопатической гемолитической анемией, тромбоцитопенией потребления и органной дисфункцией. В основе патофизиологии ТТП лежит дефицит металлопротеиназы ADAMTS13, расщепляющей фактор фон Виллебранда. Предположительный диагноз ТТП устанавливают на основании выявления микроангиопатической гемолитической анемии, тромбоцитопении, поражения различных органов. Диагноз ТТП подтверждается обнаружением активности ADAMTS13 в плазме менее 10%. Образцы плазмы на исследование активности ADAMTS13 должны быть взяты до начала трансфузий плазмы либо плазмообмена. При выявлении низкой активности ADAMTS13 необходимо обследовать на наличие ингибитора ADAMTS13 иммуноферментным методом либо с помощью теста смешивания. Анти-ADAMTS13-антитела, относящиеся к иммуноглобулинам класса G, не всегда обладают ингибирующим действием. Ингибирующее действие анти-ADAMTS13-антител подтверждается в тесте смешивания. Впервые выявленные пациенты с ТТП должны быть обследованы на наличие мутаций гена ADAMTS13.

Ключевые слова: металлопротеиназа ADAMTS13, фактор фон Виллебранда, ингибитор, мутации гена ADAMTS13, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура.

Для цитирования: Галстян Г.М., Клебанова Е.Е. Диагностика тромботической тромбоцитопенической пурпуры. *Терапевтический архив.* 2020; 92 (12): 207–217. DOI: 10.26442/00403660.2020.12.200508

Diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura

G.M. Galstyan, E.E. Klebanova

National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a rare, life-threatening disease, characterised by microangiopathic hemolytic anaemia, consumption thrombocytopenia, and organ dysfunction. The pathogenesis of TTP is attributed to the deficiency in the activity of the metalloproteinase ADAMTS13, specific von Willebrand factor cleaving protease. TTP is suspected when detecting microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia, damage to various organs. Diagnosis of TTP is confirmed by the detection of ADAMTS13 activity in plasma less than 10%. Plasma samples for the study of ADAMTS13 activity should be taken before the start of plasma transfusions or plasma exchange. In patients with severe ADAMTS-13 deficiency autoantibodies anti-ADAMTS13 and inhibitor ADAMTS13 should be investigated. Anti-ADAMTS13 antibodies belonging to IgG not always have inhibitory effects. The inhibitory effect of anti-ADAMTS13 antibodies is confirmed by mixing test. All patients with the first established diagnosis of TTP should be examined for mutations of the ADAMTS13 gene.

Keywords: metalloproteinase ADAMTS13, von Willebrand factor, inhibitor, mutations of the ADAMTS13 gene, Thrombotic thrombocytopenic purpura.

For citation: Galstyan G.M., Klebanova E.E. Diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Therapeutic Archive.* 2020; 92 (12): 207–217. DOI: 10.26442/00403660.2020.12.200508

ГУС – гемолитико-уремический синдром

ИФА – иммуноферментный анализ

КТ – компьютерная томография

МРТ – магнитно-резонансная томография

СКВ – системная красная волчанка

ТМА – тромботическая микроангиопатия

ТТП – тромботическая тромбоцитопеническая пурпура

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ЭЭГ – электроэнцефалография

ADAMTS13 (A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin type 1 repeats, member 13) – металлопротеиназа, принадлежащая к семейству пептидазных белков ADAM

Dnp – 2,4-динитрофенильная группа

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) – флуоресцентный (ферстеровский) резонансный перенос энергии

GST (Glutathione S-transferase) – глутатион S-трансфераза

Ig – иммуноглобулин

Nma – 2-(N-метил-амино) бензольная группа

SDS – додецилсульфат натрия

TLR-9 (toll-like receptor 9) – толл-подобный рецептор

vWF (von Willebrand factor) – фактор фон Виллебранда

В основе патогенеза тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП) лежит отсутствие или недостаточная активность металлопротеиназы ADAMTS13 (A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin type 1 repeats, member 13) – плазменного белка, регулирующего взаимодействие тромбоцитов с фактором фон Виллебранда (von Willebrand factor – vWF). ADAMTS13 – это металлопротеиназа, принадлежащая к семейству пептидазных белков ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase). Металлопротеиназа ADAMTS13 выделена в 1996 г., а клонирована и идентифицирована как ADAMTS13 в 2001 г. Ген *ADAMTS13* локали-

зуется на длинном плече хромосомы 9 в локусе 9q34, занимает 37 kb и содержит 29 экзонов [1]. Синтез ADAMTS13 происходит в звездчатых клетках печени, надпочечниках, подцитах и почечных тубулярных эпителиальных клетках, а также в тромбоцитах и эндотелиальных клетках.

N-концевая область ADAMTS13 содержит металлопротеиназный и дезинтегрин-подобный домены, фрагмент тромбоспондина 1 типа, Cys-богатый и спейсерный домены [2]. C-концевой фрагмент ADAMTS13 содержит 7 дополнительных повторов тромбоспондина 1-го типа (T2–T8) и два CUB-домена (рис. 1, см. на цветной вклейке).

Плазменная концентрация ADAMTS13 в норме колеблется 0,7 до 1,4 мкг/мл, период полужизни ADAMTS13 – около 2–3 дней [2]. Биологическая роль ADAMTS13 заключается в отщеплении фрагментов от мультимерной молекулы vWF для регулирования чрезмерной его активности.

С-концевой фрагмент ADAMTS13, состоящий из повторов тромбоспондина 1 типа и CUB-доменов, связывается с глобулярной формой vWF. Тромбоспондин 1 типа и CUB-домены специфично распознают vWF в циркуляции и связываются с эпитопом D4-СК фрагмента vWF. С-концевые повторы тромбоспондина 1 типа ADAMTS13 взаимодействуют с поверхностным рецептором CD36 эндотелиальных клеток. Такое взаимодействие может усиливать протеолитическое расщепление сверхкрупных мультимеров vWF в месте его высвобождения [3]. Повторы тромбоспондина 1 типа ADAMTS13 содержат свободные тиолы, которые реагируют со свободными тиолами на поверхности сверхкрупных мультимеров vWF, подвергнутых воздействию силы сдвига жидкости. Это препятствует образованию дисульфидных связей между двумя мультимерами vWF в условиях высокого напряжения сдвига жидкости, ослабляя тем самым опосредованную vWF адгезию и агрегацию тромбоцитов [3]. Таким образом, повторы 2–8 тромбоспондина 1 типа и CUB-домены влияют на протеолиз vWF [4, 5].

N-концевой фрагмент ADAMTS13 необходим для протеолиза Tug1605-Met1606 связи в A2-домене vWF. Находящийся на N-концевом фрагменте металлопротеиназный домен ADAMTS13 сам по себе не имеет вовсе или обладает незначительной протеолитической активностью в отношении vWF. Однако в совокупности дезинтегрин-подобный домен – Dis и металлопротеиназный домен – Met (рис. 2, см. на цветной вклейке) составляют единую функциональную единицу [3], повышающую способность ADAMTS13 расщеплять vWF. Богатый цистеином домен (CysR) и спейсерный домен (Sps) участвуют в распознавании vWF. Первый повтор тромбоспондина 1 типа ADAMTS13 связывается непосредственно с регионом, состоящим из 73 аминокислотных остатков vWF, обозначаемым как VWF73 [2, 6].

Важную роль в функционировании ADAMTS13 играют конформационные изменения. Взаимодействие CUB-доменов и спейсерного домена приводит к образованию закрытой конформации ADAMTS (см. рис. 2), препятствующей контакту спейсерного экзосайта протеиназы с комплементарным участком связывания на A2-домене vWF [4]. Закрытой конформацией можно объяснить низкую иммуногенность металлопротеиназы ADAMTS13, вводимой со свежезамороженной плазмой больным врожденной формой ТТП [3]. При конформационной активации ADAMTS13, которая происходит при повышенном содержании vWF, взаимодействие CUB-доменов и спейсерного домена нарушается под действием С-концевого домена vWF [4]. Открытая конформация ADAMTS13 выявляется при обострении ТТП, а закрытая – при ремиссии заболевания [7]. Активация ADAMTS13 с переходом в открытую конформацию выявляет скрытый (внутренний) эпитоп в спейсерном домене и обнажает аутоантигенное ядро для ингибитора ADAMTS13 при приобретенной ТТП [4]. Большинство больных приобретенной ТТП имеют антитела против спейсерного домена ADAMTS13 [8].

vWF в виде сверхкрупных молекул содержится в тельцах Вайбеля–Паладе эндотелиальных клеток, в тромбоцитах.

vWF выделяется клетками в области сосудистого повреждения и оказывает протромботический эффект, усиливая адгезию и агрегацию тромбоцитов на поверхности эндотелиальных клеток. Наибольший протромботический эффект оказывают сверхкрупные мультимеры молекулы vWF, связывающиеся с GP1b-рецепторами тромбоцитов, в норме их в циркуляции не обнаруживают, поскольку сразу после секретиции vWF связывается с ADAMTS13, который присоединяется к его A2-домену и расщепляет мультимеры vWF на малые молекулы. Дефицит ADAMTS13 возникает вследствие недостаточного его синтеза, нарушения протеолитической активности или повышенной деградации. В результате низкой активности ADAMTS13 мультимеры vWF не расщепляются. Мультимеры vWF, секретируемые эндотелиальными клетками, связываются с тромбоцитами даже при низком напряжении сдвига, формируя агрегаты, которые окклюдзируют артериолы по току крови. Агрегаты, состоящие из тромбоцитов и vWF, формируются также прямо в резистентных сосудах, в которых имеется высокое напряжение сдвига. Потребление тромбоцитов в агрегаты приводит к тромбоцитопении, достаточно потребиться 10–20 мл циркулирующих тромбоцитов, чтобы появилась тромбоцитопения [9].

Тромбы при ТТП вызывают частичную окклюзию сосудов, позволяя эритроцитам проскальзывать мимо них [10]. Эритроциты, перемещаясь по ригидным окклюзированным сосудам, подвергаются разрушению, что приводит к механическому гемолизу и появлению шистоцитов. Кроме того, мультимеры vWF сами по себе способствуют образованию шистоцитов. Напряжение сдвига жидкости ведет к латеральному взаимодействию мультимеров vWF, что приводит к образованию волокон. ADAMTS13 расщепляет данные связи, при дефиците ADAMTS13 эти волокна перекрывают просвет сосудов, и, проходя через них, эритроциты фрагментируются, образуя шистоциты [11].

Образующиеся при ТТП тромбы состоят из тромбоцитов и vWF, в них содержится небольшое количество фибрина, поскольку в процессе тромбообразования при ТТП не происходит активации свертывания и отложения фибрина [9]. Тромбы при ТТП возникают во всех тканях, но редко образуются в легких и печени, поскольку циркуляция крови в этих органах происходит в условиях низкого напряжения сдвига, недостаточного для усиления связывания vWF с тромбоцитами. Повреждения наблюдаются часто в таких органах, как сердце, поджелудочная железа, почки, мозг, где больше кровотока, выше напряжение сдвига, однако в этих органах, как правило, формируются относительно небольшие зоны некрозов [12]. Это свидетельствует о том, что повреждения при ТТП персистируют недолго и этого времени недостаточно для формирования некрозов. Транзиторной окклюзией объясняется и перемежающаяся неврологическая симптоматика, часто возникающая у больных ТТП.

Клинические проявления ТТП возникают при уменьшении плазменной активности ADAMTS13 < 10%. Однако у некоторых больных, даже в состоянии гематологической ремиссии, может не быть клинических проявлений заболевания, несмотря на активность ADAMTS13 < 10%. Подобный феномен регистрируется прежде всего при врожденной форме ТТП, причиной которой является мутация гена ADAMTS13, но даже при наличии мутации нередко необо-

Сведения об авторах:

Клебанова Елизавета Евгеньевна – врач отделения реанимации и интенсивной терапии. ORCID: 0000-0002-8141-9422

Контактная информация:

Галстян Геннадий Мартинович – д.м.н., зав. отделением реанимации и интенсивной терапии. Тел.: +7(495)612-48-59; e-mail: gengalst@gmail.com; ORCID: 0000-0001-8818-8949

дим триггер, провоцирующий возникновение заболевания. При иммуноопосредованной форме ТТП в большинстве случаев находят провоцирующие факторы.

Системная красная волчанка (СКВ) может явиться причиной возникновения приобретенной формы ТТП. У части больных СКВ течение заболевания осложняется ТТП и, наоборот, у больных с ТТП могут возникнуть нарушения, характерные для СКВ. Частота аутоиммунных нарушений, выявляемых у больных ТТП, среди которых СКВ, синдром Шегрена, аутоиммунный тиреоидит, синдром Рейно, антифосфолипидный синдром, псориаз и другие, составляет 21,5% [13].

Алкоголь стал триггером появления первых симптомов ТТП в 10% случаев у больных врожденной формой ТТП [14].

Беременность – один из наиболее частых триггеров ТТП. При беременности даже в физиологических условиях происходят повышенное высвобождение vWF и уменьшение активности ADAMTS13. Даже у здоровых беременных женщин активность ADAMTS13 к концу срока гестации уменьшается, составляя 29–87% (в среднем 68%) к 36–40-й неделе гестации, 22–89% (в среднем 52%) в раннем послеродовом периоде [15, 16]. Подобные изменения при наличии предрасположенности, в частности мутации гена ADAMTS13, способствуют появлению клинических проявлений ТТП [17]. В 10 (24%) из 42 случаев ТТП у беременных установлена врожденная форма заболевания [18].

Воспаление, инфекция, травма, хирургическое вмешательство также являются триггерами ТТП. Воспаление способствует эндотелиальному повреждению и секреции vWF [9]. Инфекция, преимущественно грамотрицательной этиологии, выявлена у 41% больных ТТП [19]. Описаны случаи развития ТТП с продукцией антител к ADAMTS13, вызванные *Acinetobacter baumannii* [20], вирусной инфекцией (вирусом гепатита С, цитомегаловирусом, вирусом простого герпеса) [21], грамположительной флорой [19, 21]. Инфекция приводит к активации toll-подобных рецепторов (toll-like receptor 9 – TLR-9), распознающих ДНК бактерий и вирусов и активирующих иммунный ответ, в том числе продукцию воспалительных цитокинов. Генотипы TLR-9 +2848 G и TLR-9 +1174 A (функциональный полиморфизм TLR-9) чаще выявляются у больных ТТП, чем у здоровых лиц [19]. Воспаление также приводит к окислительному стрессу, который усиливает адгезию тромбоцитов, модифицируя vWF и ADAMTS13 [9].

Эпидемиология ТТП

В США ежегодно выявляется 3,1 случая ТТП на 1 млн населения, а с учетом больных в ремиссии инцидентность составляет 19 случаев на 1 млн населения [22]. Во Франции распространенность ТТП – 13 человек на 1 млн населения [23]. Соотношение «мужчины:женщины» – 1:2, пик заболеваемости – младше 50 лет (медиана возраста – 43 года) [23, 24]. Врожденная форма ТТП выявляется в 2,7% случаев, приобретенная форма – в 97,3% [23]. В Российской Федерации данные о заболеваемости ТТП отсутствуют.

Классификация ТТП

ТТП подразделяется на врожденную формы (синдром Аппшоу–Шульмана) и иммуноопосредованную (рис. 3).

Врожденная форма ТТП, или синдром Аппшоу–Шульмана, – это генетически детерминированное аутосомно-рецессивное заболевание, при котором «дефектный» ген ADAMTS13 унаследован от обоих родителей, но не содер-

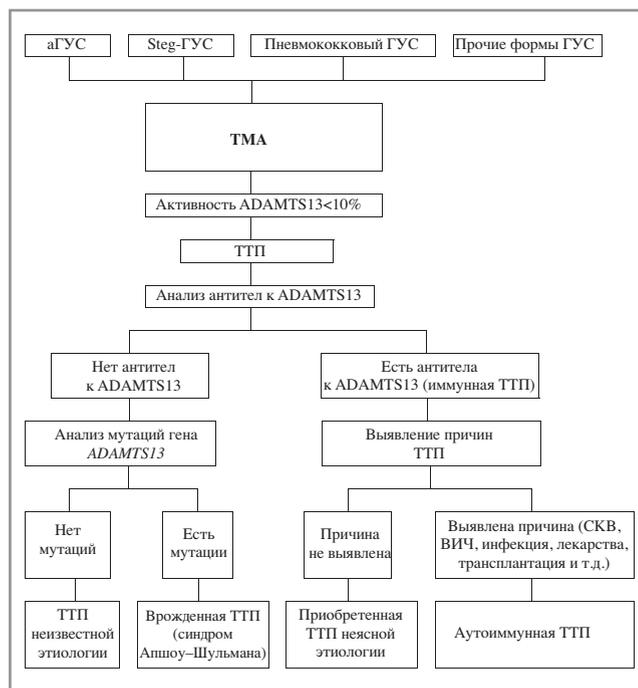


Рис. 3. Классификация ТТП [55].

жится в половых хромосомах [1]. Врожденная форма ТТП обычно манифестирует в неонатальном периоде тромбоцитопенией и анемией, желтухой. После обменных переливаний крови, трансфузий плазмы ремиссия может быть достигнута на длительный срок, а рецидивы заболевания провоцируются вакцинацией, инфекцией, хирургическими вмешательствами и т.д. Встречается хроническая рецидивирующая форма заболевания, при которой рецидивы возникают каждые 3–4 нед. У некоторых пациентов синдром Аппшоу–Шульмана манифестирует впервые только во взрослом возрасте после воздействия различных триггеров, прежде всего – беременности. По данным японских авторов [25], из 43 пациентов с врожденной формой ТТП в 58% случаев заболевание манифестировало в детском возрасте, в 35% – в возрасте от 15 до 45 лет и в 7% – возрасте от 51 до 63 лет. У 9 (36%) из 25 пациентов с синдромом Аппшоу–Шульмана женского пола диагноз установлен впервые только во время беременности [25]. По данным Французского референсного центра тромботической микроангиопатии (ТМА) [23] за период с 1999 по 2013 гг., из 772 пациентов с ТТП, манифестировавшей во взрослом возрасте, врожденная форма заболевания диагностирована у 21 (2,7%) пациента. На фенотип синдрома Аппшоу–Шульмана влияет резидуальная плазменная активность ADAMTS13: выявление активности в плазме ADAMTS13 менее 2,74% позволяет выделить пациентов, у которых высок риск возникновения клинических симптомов ТТП в возрасте до 18 лет, а при активности менее 1,61% – пациентов с частыми, более 1 раза в год, рецидивами [26].

При синдроме Аппшоу–Шульмана чаще всего выявляют миссенс-мутации, реже нонсенс-мутации, вставки или делеции нуклеотидов, мутации сплайсинга. Некоторые мутации могут приводить к нарушению секреции ADAMTS13, в этом случае будут наблюдаться как низкая плазменная активность ADAMTS13, так и низкая концентрация антигена ADAMTS13 в крови. При других мутациях секреция ADAMTS13 не нарушена, но секретируемый фермент обладает низкой протеиназной активностью, в этих случаях низ-

кая плазменная активность ADAMTS13 будет сочетаться с нормальной или незначительно сниженной концентрацией антигена ADAMTS13 [27]. В международном регистре врожденной формы ТТП на конец 2017 г. содержалась информация о 123 больных, из Европы (55 человек), Азии (52 человека, из них 47 – из Японии), Америки (14 человек) и Африки (2 человека). Среди 98 выявленных различных мутаций гена ADAMTS13 в 245 аллелях верифицированы 67 миссенс-мутаций, 12 нонсенс-мутаций, 21 frameshift-мутация (инсерция или делеция одного или нескольких нуклеотидов, приводящая к сдвигу белковой рамки считывания) и 8 мутаций сайта сплайсинга. Наиболее частые мутации гена ADAMTS13 с.4143_4144dupA (на 60/246 аллелей).

Выявлено большее число носителей ADAMTS13 с.4143_4144dupA в компаунд-гетерозиготном, чем гомозиготном состоянии, у которых заболевание дебютировало в возрасте до 3 мес (50% против 37%), несмотря на то, что активность ADAMTS13 <1% наблюдалась у 18 из 20 гомозиготных носителей мутации и только у 8 из 14 компаундов [14]. Эту мутацию наиболее часто обнаруживали у жителей северной Европы и Норвегии, распространенность в этих регионах в популяции 0,04–0,33% [28].

Мутация 3178C>T (p.Arg1060Trp) [13/245 аллелей] в TSP7-доме приводит к нарушению секреции ADAMTS13. Частота ее встречаемости в Европе, Северной Америке и Турции составляет около 1% [18, 28, 29]. Эта мутация выявляется у 80% во французской когорте и 74% в английской когорте пациентов с синдромом Апшоу–Шульмана и ассоциируется с активностью ADAMTS13 от 3 до 6% у компаундов и 5–12% – у гомозиготных носителей мутации [26]. Замена p.Arg1060Trp во всех проанализированных случаях сочеталась с полиморфными вариантами p.Arg7Trp и p.Ala1033Thr, что свидетельствует о ее монофилетическом происхождении [29, 30].

Несколько неожиданные результаты получены в работе, посвященной направленному поиску этой мутации у больных с поздним проявлением ТТП [30]. Она выявлена у 6 (11%) из 53 пациентов, в одном случае в гомозиготном состоянии и в остальных случаях – в гетерозиготном. При полном анализе гена ADAMTS13 у гетерозиготных носителей R1060W никаких других очевидных мутаций не найдено, но у 3 из них выявлены антитела, специфичные к ADAMTS13, что может объяснить проявление болезни. Предполагается, что эта мутация сама по себе не приводит к клиническим проявлениями ТТП, и заболевание клинически манифестирует при воздействии каких-либо других триггерных факторов. Эти факторы могут иметь как негенетическую природу (беременность, инфекция), так и генетическую, например сочетание мутантного аллеля гена ADAMTS13 с его «нормальным» аллелем, несущим функциональные полиморфизмы Q448E и P618A [31].

Еще одна мажорная мутация с.577C>T или Arg193Trp (11/246 аллелей) выявлена как в европейской, так и в японской и китайской популяциях и остается одной из наиболее распространенных в Азии [14, 32].

Из других мутаций отмечают замену остатка триптофана (Trp³⁹⁰) на аланин Trp390Ala (W390A) в ключевом мотиве ³⁸⁷TrpXXTrp³⁹⁰ ADAMTS13, снижающую секрецию белка, его аффинность к vWF и протеиназную активность [33].

Синдром Апшоу–Шульмана следует заподозрить у пациента с клиническими проявлениями ТМА, у которого не определяется или очень низкая активность ADAMTS13, не выявляются ингибирующие ADAMTS13 антитела, диагноз установлен в детском возрасте, либо заболевание дебютировало у женщины во время первой беременности [34].

Иммуноопосредованная ТТП – это приобретенная форма ТТП, в основе патогенеза которой лежит появление антител к ADAMTS13. Различают первичную и вторичную иммуноопосредованную ТТП. Первичная иммуноопосредованная ТТП – приобретенная форма ТТП, при которой не находят заболеваний или причин, вызвавших образование аутоантител анти-ADAMTS13. Вторичная иммуноопосредованная ТТП – приобретенная форма ТТП, при которой не выявляются заболевания (СКВ, ВИЧ, инфекция и др.) или причины (беременность, препараты и др.), приведшие к образованию антител анти-ADAMTS13 (см. рис. 3).

Клинические проявления ТТП

Клиническая картина ТТП характеризуется острым началом в виде различных симптомов и синдромов, составляющих классическую пентаду, описанную в 1966 г. E. Amogosi и J. Ultman [35]: лихорадка, тромбоцитопения, микроангиопатическая гемолитическая анемия, почечная дисфункция, неврологические нарушения [36]. Однако все эти признаки в совокупности встречаются лишь у 7% пациентов.

Лихорадка регистрируется у 28% пациентов при обострении заболевания, температура тела поднимается выше 37,5°C, не связана с инфекцией [24].

Тромбоцитопения при обострении заболевания является у всех пациентов, носит неиммунный характер и обусловлена потреблением тромбоцитов. Тромбоцитопения, как правило, выражена ($10 \times 10^9/\text{л}$ – $30 \times 10^9/\text{л}$), менее выраженная тромбоцитопения ($>30 \times 10^9/\text{л}$) характерна для других форм ТМА [22, 23, 37]. Клинически тромбоцитопения проявляется геморрагическим синдромом у 46% пациентов в виде носовых кровотечений, синяков, петехий, десневых кровотечений, гематурии, меноррагий, кровоизлияний в сетчатку, кровохарканья [24, 38].

Микроангиопатическая гемолитическая анемия – в острой стадии ТТП встречается у всех больных, может сопровождаться желтухой [38].

Неврологические расстройства обнаруживаются у 40–88% пациентов и проявляются от незначительных расстройств до серьезных нарушений [12, 24, 36, 39, 40]. Головная боль регистрировалась у 25–42% пациентов, когнитивные нарушения – у 28%, фокальный дефицит – 24–29,7%, обмороки – у 11–12%, судороги – у 8–36,9%, потеря зрения – у 6,3–8%, инсульт – у 6%, гемипарез – у 12,7%, кома – у 4–12% [24, 39, 41]. Неврологические симптомы чаще всего обусловлены ишемией, но могут быть вызваны и кровоизлияниями. У пациентов с ТТП нарушение сознания по шкале ком Глазго менее 14 баллов ассоциируется с 9-кратным увеличением смертности по сравнению с теми, у которых нет нарушения сознания (20% против 2,2%) [42]. Неврологические нарушения при ТТП возникают чаще, чем при гемолитико-уремическом синдроме (ГУС), при котором они встречаются у 55% пациентов [12].

Почечная дисфункция возникает у 10–75% лиц с ТТП [14, 24, 43], как правило, нетяжелая, чаще встречается у пожилых [36]. Креатинин у большинства пациентов колеблется от 0,9 до 1,4 мг/дл. У 58,7% больных развивается острое повреждение почек [43]. У 27,4% пациентов развивается нефротический синдром, гематурия выявляется у 6–41,3%, лейкоцитурия – у 36,4%, олигурия/анурия – у 3%. Поражения почек при ТТП возникают значительно реже, чем при ГУС, при котором поражение почек и острая почечная недостаточность выявляются соответственно в 100 и 90% случаев [12].

Таблица 1. Лабораторное обследование, рекомендуемое пациентам с подозрением на ТТП

Лабораторный тест	Значения при ТТП
Концентрация гемоглобина	Анемия
Ретикулоциты	Повышенное количество
Шистоциты	Обнаруживаются
Прямая проба Кумбса	Отрицательная
Концентрация лактатдегидрогеназы	Выше нормы в 1,5 раза
Концентрация гаптоглобина	Снижена либо не определяется
Тромбоциты крови	$<150 \times 10^9/\text{л}$ или уменьшение более чем на 25% от исходных значений
Активность ADAMTS13	$<10\%$
Ингибитор ADAMTS13	Обнаруживается при ингибиторной форме
Клоттинговые тесты, фибриноген	В пределах нормы
Мочевина, креатинин, электролиты, протеинурия	Изменены при поражении почек
Трансаминазы	В пределах нормы
Билирубин	Может быть повышен (гемолиз)
Тропонин	Повышен при поражении сердца
Тесты на беременность у женщин детородного возраста	Исключить беременность как фактор, провоцирующий ТТП

Помимо классической пентады у пациентов с ТТП выявляют поражение и других органов.

Признаки *поражения сердца* обнаруживают у 24% пациентов с ТТП [39], инфаркт миокарда – у 4,2–15,3% [14, 44].

Поражение желудочно-кишечного тракта. На боли в животе, как на один из первых симптомов ТТП, жалуются 23,5–25% пациентов [24, 45], на диарею – 14% [24]. Клинически панкреатит вследствие ТТП диагностируется редко [46], однако при аутопсии поражение поджелудочной железы выявляется в 96% в отличие от ГУС, при котором поражение поджелудочной железы выявляют в 23% случаев [12].

Диагноз ТТП основывается на совокупности клинических симптомов и изменений лабораторных показателей, характерных для всех форм ТМА (микроангиопатическая гемолитическая анемия, тромбоцитопения, органная дисфункция), а также выявлении менее 10% активности в плазме крови ADAMTS13 [38, 47–49]. Диагноз ТТП является экстренным, поскольку даже при подозрении на ТТП необходимо незамедлительно начать лечение. Предварительный диагноз ТТП устанавливается на основании анамнеза, клинической картины и рутинных лабораторных тестов [38, 49].

Жалобы пациента могут носить разнообразный характер. Часто первыми симптомами являются лихорадка, не связанная с инфекцией, слабость. Неврологические симптомы обнаруживаются у 44% пациентов, выраженность их может быть разной: от головных болей и головокружения до судорог и очагового неврологического дефицита, гемипареза, дезориентации, когнитивных расстройств, афазии [35, 45]. На боли в животе жалуются 23,5% пациентов, боли могут сопровождаться тошнотой или рвотой. У каждого 10-го пациента на коже и слизистых оболочках появляются экхимозы и петехии, отмечается гематурия [45].

При *физикальном обследовании* выявляют геморрагический синдром, петехиальные кровоизлияния на коже и слизистых, бледность, иногда желтушность кожных покровов вследствие гемолиза. Несмотря на боли в животе, при пальпации нет симптомов раздражения брюшины. Могут быть зафиксированы фокальный неврологический дефицит, гемипарез, мышечная слабость с вовлечением одной или более конечностей, парез лицевого нерва [50], дезориентация, судороги, когнитивные нарушения, нарушения сознания различной степени тяжести вплоть до комы [41].

Лабораторная диагностика ТТП

Лабораторная диагностика ТТП (табл. 1) основана на выявлении неиммунной микроангиопатической гемолитической анемии, неиммунной тромбоцитопении, активности в плазме ADAMTS13 $<10\%$, обнаружении или отсутствии ингибитора в плазме ADAMTS13, обнаружении или отсутствии мутаций гена ADAMTS13.

Анемия может быть различной степени выраженности. Одним из патогномичных признаков является обнаружение шистоцитов в крови. Их количество в норме при подсчете автоматическим способом – 0,03–0,58%, при визуальном подсчете – 0–0,27% от общего количества эритроцитов [51, 52], у лиц с почечной недостаточностью – 0,6% при преэклампсии – 0,45% и у лиц с протезированными клапанами сердца – 0,48% [52]. Критерием ТТП признается обнаружение шистоцитов более 1% [53], по другим данным – более 2–4% [54]. Некоторые эксперты считают, что для диагноза ТТП достаточно любое выявление шистоцитов. В то же время в дебюте ТТП шистоциты могут отсутствовать [38]. Неиммунный характер гемолиза подтверждается отрицательной прямой пробой Кумбса.

Тромбоцитопения выявляется у всех пациентов с обострением ТТП. Для ТТП характерна выраженная тромбоцитопения $10\text{--}30 \times 10^9/\text{л}$ [55]. Она развивается вследствие потребления тромбоцитов при образовании тромбов. Образующиеся тромбы содержат небольшое количество фибрина, поскольку при ТТП не происходит активации свертывания и отложения фибрина [9, 12], поэтому клоттинговые тесты, концентрация фибриногена плазмы остаются в пределах нормы. Среди других биохимических показателей может быть гипербилирубинемия из-за гемолиза.

Повышение концентрации тропонина в крови выявляют у 33–68% пациентов с ТТП [39, 42, 44], но у 59% пациентов с повышенным содержанием тропонина нет клинических и инструментальных признаков поражения сердца. Повышение концентрации тропонина в крови ассоциируется с плохим прогнозом: риск летального исхода повышается в 2,8 раза [39].

Необходимо выполнение остальных скрининговых тестов для выявления поражений других органов и систем.

При диагностике ТТП необходимо провести инструментальное обследование для скрининга органной дисфункции,

Таблица 2. Диагностические шкалы при ТТП

Параметры	French Score	Plasmic score	Баллы
Тромбоциты	$<30 \times 10^9/\text{л}$	$<30 \times 10^9/\text{л}$	+1
Креатинин сыворотки	$<2,25 \text{ мг/дл}$	$<2,0 \text{ мг/дл}$	+1
Гемолиз	*		+1
Непрямой билирубин	*	$>34,2 \text{ мкмоль/л}$	
Ретикулоцитоз	*	$>2,5\%$	
Гаптоглобин	*	Не определяется	
Средний объем эритроцитов (MCV)	*	$<9 \times 10^{-14} \text{ л}$ (90 fl)	+1
Международное нормализованное отношение	*	$<1,5$	+1
Нет лечения от рака в течение последнего года	*	Да	+1
Нет трансплантации органов или ТГСК	*	Да	+1
Вероятность ADAMTS13 $<10\%$	0 баллов – 2% 1 балл – 70% 2 балла – 94%	0–4 балла – 0–4% 6 баллов – 5–24% 6–7 баллов – 62–82%	

а также наличия конкурирующей или сопутствующей патологии:

- электрокардиографию и эхокардиографию: при ТТП дискинезию стенок миокарда на эхокардиограмме выявляют у 33%, перикардиальный выпот – у 7,7% пациентов [44], а изменения ЭКГ в виде нарушения деполяризации обнаруживают у 12,5% пациентов [39].
- компьютерную томографию (КТ)/магнитно-резонансная томографию (МРТ) головного мозга для выявления очагов ишемии, кровоизлияний, визуализации симметричного очагового поражения головного мозга (синдром задней обратной энцефалопатии), исключения тромбоза венозных синусов; при МРТ у 48% пациентов могут быть признаки синдрома задней обратимой энцефалопатии [41], в то же время многие пациенты, несмотря на неврологические нарушения, имеют нормальную МРТ-картину.
- электроэнцефалографию (ЭЭГ) при судорогах, нарушениях сознания или поведения. ЭЭГ позволяет провести дифференциальную диагностику судорожного синдрома, установить глубину нарушения сознания; изменения на ЭЭГ в дебюте заболевания выявляют у 25% пациентов с ТТП [40];
- рентгенографию/КТ органов грудной клетки для исключения патологии легких;
- ультразвуковое исследование и КТ органов брюшной полости, забрюшинного пространства и малого таза для исключения онкологического процесса;
- эзофагогастродуоденоскопию, которая позволяет исключить опухолевые заболевания, заболевания желудочно-кишечного тракта, выявить язвенные дефекты, эрозии, а также кровотечение как одну из причин анемии.

Необходимы также:

- осмотр гинекологом всех женщин для исключения беременности, опухолевых заболеваний;
- консультация нефролога при наличии клинических или лабораторных признаков развития острой почечной недостаточности, хотя поражения почек при ТТП не столь тяжелы как при ГУС, проведение заместительной почечной терапии требуется у 4–25,9% пациентов с ТТП [14, 36, 43];
- осмотр невролога при развитии неврологической симптоматики (мышечная слабость, судорожный синдром, нарушение сознания или поведения).

Предположительный диагноз ТТП должен устанавливаться срочно на основании рутинных лабораторных тестов и подтверждается обнаружением плазменной активности ADAMTS13 $<10\%$. Поскольку исследование активности ADAMTS13 не является рутинным методом, предложены шкалы (French Score, Plasmic Score), согласно которым можно заподозрить ее низкую активность [56, 57] (табл. 2).

Даже подозрение на ТТП является показанием для срочного начала лечения, но до начала плазмообмена или трансфузий плазмы необходимо исследовать плазму пациента для подтверждения диагноза ТТП. Критерием ТТП считается активность ADAMTS13 в плазме менее 10%. Если не удалось взять плазму пациента для исследования до начала плазмообмена, она может быть взята и позже. После начала лечения активность ADAMTS13 в плазме менее 10% сохраняется у 88% пациентов после 1-й процедуры плазмообмена, у 83% после 2-й процедуры и у 78% – после 3-й процедуры плазмообмена [58]. Для тестов на ADAMTS13 кровь набирают в пробирки с **цитратом натрия** (использовать в качестве антикоагулянта этилендиаминтетраацетат – ЭДТА нельзя!). Плазму получают путем центрифугирования в течение 15 мин при 3000 g. Отделяют полученную бедную тромбоцитами плазму. Центрифугирование и отделение плазмы проводят как можно быстрее. Если в течение 4 ч исследование не проводится, рекомендуется плазму перелить в несколько пробирок (аликвоты) и хранить при температуре -70°C до 6 мес [59]. В то же время имеются данные, что активность ADAMTS13 не меняется при хранении плазмы при комнатной температуре до 48 ч [60]. Для исследования замороженная плазма должна быть разморожена в течение 5 мин при 37°C , перемешена и исследована в течение 4 ч. Если за это время исследовать размороженную плазму не удается, она должна храниться в холодильнике при $2-8^\circ\text{C}$ [59].

Какой тест выбрать для подтверждения диагноза ТТП? Можно исследовать антиген, активность и ингибитор ADAMTS13. В клинической практике наибольшее значение имеют исследования активности ADAMTS13 и выявление ингибитора ADAMTS13. Определение антигена ADAMTS13 имеет больше научное значение, может быть использовано для прогноза, при его несоответствии активности можно заподозрить врожденную форму ТТП.

Исторически методы измерения активности ADAMTS13 можно разделить на I и II поколения. Исследования, относя-

щиеся к I поколению, являлись некоммерческими, созданными на базе той или иной лаборатории и основаны на определении активности ADAMTS13 в плазме пациента по изменению оставшегося количества vWF или продуктов его расщепления после инкубации очищенного vWF или пулированной донорской плазмы, используемой в качестве источника vWF, с плазмой пациента. Эти исследования сложные, выполнялись только в специализированных лабораториях в течение нескольких дней [59].

Электрофорез в агарозном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) и вестерн-блоттинг [61]. Для выполнения теста к исследуемым образцам цитратной плазмы пациента добавляют трис-буфер, ингибитор сериновых протеаз пепфабок и 0,15 ммоль NaCl и активируют ADAMTS13 посредством инкубации с хлоридом бария в течение 5 мин при 37°C. Для оценки активности ADAMTS13 к тестируемой плазме добавляют очищенный vWF. Сам по себе vWF резистентен к действию ADAMTS13 в нейтральном буфере, но подвергается расщеплению в присутствии мочевины, которая вызывает частичную денатурацию vWF. Поэтому вместе с очищенным vWF добавляют мочевины, смесь инкубируют в течение 24 ч. Реакцию расщепления vWF металлопротеиназой ADAMTS13 останавливают добавлением ЭДТА [61], после чего выполняют электрофорез в агарозном геле и вестерн-блоттинг с антителами к vWF, конъюгированными с пероксидазой хрена. Расчет активности ADAMTS13 проводится путем сравнения с серийными разведениями нормальной плазмы.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-Page) и вестерн-блоттинг [62]. В этом исследовании не проводится активация хлоридом бария ADAMTS13. Время инкубации плазмы пациента с очищенным vWF и гуанидин гидрохлоридом укорочено до 1–3 ч вместо 24 ч. Продукты расщепления, образовавшиеся в результате действия ADAMTS13, в виде диметрических фрагментов по 176 и 140 кДа визуализируют с помощью электрофореза и вестерн-блоттинга на SDS-Page, что проще, чем в агарозном геле.

Коллагенсвязывающий метод основан на способности высокомолекулярных форм vWF связываться с коллагеном [63]. Его проводят путем добавления различных разведений образцов плазмы пациента к пулированной донорской плазме, в которой предварительно собственная активность ADAMTS13 нейтрализована добавлением ЭДТА и ингибитора сериновых протеаз пепфабока. Пулированная плазма используется как источник vWF. Смесь инкубируют при 37°C в течение 2 ч, за это время расщепляет ADAMTS13 vWF, затем реакцию останавливают. Измеряют оставшееся количество vWF по его способности связываться с коллагеном III типа с помощью иммуоферментного анализа (ИФА) и таким образом определяют активность ADAMTS13. Выполнение теста занимает не менее 5 ч.

Определение активности ADAMTS13 методом ристоцетининдуцированной агрегации [64] основано на тех же принципах, что и описанный метод, но количество резидуального vWF измеряют с помощью ристоцетининдуцированной агрегации с помощью агрегометра.

В современных методах определения активности ADAMTS13 используется пептидный субстрат vWF, на который действует ADAMTS13, либо полипептид рекомбинантного домена A2 vWF, либо фрагмент, состоящий из 73 аминокислотных остатков от D1596 до R1668 vWF, обозначаемый как VWF73. Плазму пациента инкубируют с субстратом, на который действует ADAMTS13, и измеряют продукты расщепления. Тесты выполняет в течение не-

скольких часов, они обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Использование полипептида рекомбинантного домена A2 vWF позволяет проводить исследование без таких денатурирующих препаратов, как мочевины, или бивалентных ионов металлов, усиливающих протеиназную активность ADAMTS13. Это позволило сократить время исследования до 5 ч [59].

В методе ИФА на лунки планшета, на стенки которых нанесены антитела к глутатион S-трансферазе (Glutathione transferase – GST), вносят субстрат, меченный GST, в качестве которого используют либо A2-домен vWF, либо vW73M0435. После инкубации, во время которой субстрат связывается с антителами, нанесенными на поверхность лунок, вносится плазма пациента. Вновь выполняется инкубация, во время которой ADAMTS13 плазмы расщепляет субстрат, после чего добавляются вторые антитела для определения количества субстрата, оставшегося после действия ADAMTS13. Количество резидуального субстрата обратно пропорционально активности ADAMTS13 в плазме [59].

В методе флуоресцентного (ферстеровского) резонансного переноса энергии (Fluorescence Resonance Energy Transfer – FRET) представляет собой взаимодействие двух молекул, в котором полоса излучения одной молекулы перекрывает полосу поглощения другой. Одна молекула выступает донором флуорофора, а другая – его акцептором. Принцип FRET заключается в том, что возбужденный флуорофор-донор вместо эмиссии света резонансно передает свою энергию флуорофору-акцептору. Для его выполнения создан флуорогенный пептид FRET-S-VW73, который подвергается расщеплению ADAMTS13 [65]. Этот пептид модифицирован таким образом, чтобы смежные аминокислоты с обеих сторон сайта расщепления имели добавленные замещенные фрагменты: 2-(N-метил-амино) бензольная группа (Nma) и 2,4-динитрофенильная группа (Dnp). В интактном, (нерасщепленном) пептиде облучение Nma в диапазоне 340 нм не приводит флуоресцентной эмиссии, поскольку соседняя Dnp-гасящая часть подавляет эмиссию [66]. Когда пептидная связь между аминокислотными остатками Nma и Dnp расщепляется с помощью ADAMTS13, гаситель Dnp отделяется от фрагмента Nma, позволяя происходить флуоресцентной эмиссии 440 нм, которая может быть количественно оценена с помощью флуорометра [67].

В аппарате HemosIL AcuStar реализован автоматизированный количественный метод определения активности ADAMTS1. Картридж включает в себя флаконы с магнитными частицами, покрытые пептидом VW73. Эти частицы инкубируют с плазмой пациента, в результате чего происходит расщепление субстрата под действием ADAMTS13 плазмы пациента, проводятся магнитная сепарация и отмывка. Для количественного определения продуктов расщепления VW73 вносятся моноклональные антитела к этим пептидам, меченные хемилюминисцентным реагентом изоломином, проводятся повторные инкубация и магнитная сепарация и отмывка, добавляется реагент, который триггерует реакцию хемилюминисценции, интенсивность которой пропорциональна активности ADAMTS13 [68]. Время выполнения исследования составляет 33 мин.

Для скрининга разработан полуколичественный тест определения активности ADAMTS13 Technoscreen® (Technosclone, Вена, Австрия). Внешне он напоминает полуколичественный тест на прокальцитонин. Образцы плазмы предварительно инкубируют в течение 20 мин при комнатной температуре со специфическим субстратом, обозначаемым как VWF73-GST (GST – glutathione S-transferase) и содержащим фрагменты vWF из 73 аминокислотных остатков от

D1596 до R1668, которые связываются с тромбоспондином (TSP1) ADAMTS13 плазмы. Во время инкубации ADAMTS13 расщепляет субстрат. Затем по капле предварительно инкубированной смеси добавляют в контрольную и тестовую лунки. В мембрану контрольной лунки иммобилизованы поликлональные антитела (анти-GST), которые способны связывать как расщепленный и нерасщепленный субстрат VWF73. В мембране тестовой лунки иммобилизованы антитела G7, которые связываются только с расщепленным VWF73, т.е. чем больше активность ADAMTS13, тем больше VWF73 будет расщеплено. Связанный с антителами субстрат в тестовой и контрольной лунках детектируют с помощью стрептавидина-голд конъюгата, который придает им красную окраску. Интенсивность красной окраски в тестовой лунке пропорциональна активности ADAMTS13. Время выполнения теста занимает менее 30 мин [69]. При сравнении результатов определения активности ADAMTS13 скрининговым тестом Technoscreen® с результатами ИФА с помощью набора Technozym® (Technoclon, Австрия) установлены 88,7% чувствительность и 90,4% специфичность полуколичественного теста [70]. Несмотря на это, в случае получения положительного результата требуется подтверждение скринингового теста одним из известных количественных методов определения активности ADAMTS13.

При сравнении результатов определения активности ADAMTS13 различными методами показано, что они коррелируют между собой [67, 68, 71, 72]. Результаты определения активности ADAMTS13 методом HemosIL AcuStar коррелируют с FRET ($r=0,96$) и ИФА ($r=0,96$) [68], а коэффициент вариации между различными методами составляет менее 15% [68, 72]. Все методы в 100% выявляют выраженный дефицит ADAMTS13 (<10%), однако при пограничных значениях активности ADAMTS13 могут наблюдаться расхождения [72]. Поэтому если при типичных клинических проявлениях активность ADAMTS13 превышает 10%, необходимо повторить исследование либо выполнить его другим методом [73].

Определение концентрации антигена ADAMTS13 может быть произведено с помощью ИФА. Используют планшеты, в которых на поверхности лунок предварительно адсорбированы анти-ADAMTS13-антитела, которые связываются с антигеном ADAMTS13 плазмы. Затем в лунки планшета добавляют вторые кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Референсные значения антигена ADAMTS13 составляют 657–2368 нг/мл [74].

На результаты определения активности ADAMTS13 влияют различные факторы. Гипербилирубинемия более 100 мкмоль/мл приводит к угасанию флуоресценции в методе FRET, а при концентрации более 300 мкмоль/л – к ошибкам в HemosIL AcuStar, но не влияет на ИФА. Наличие в крови ревматоидного фактора, гепарина более 2 ме/мл, vWF>200%, триглицеридемия более 1,250 мг/дл влияют на результаты HemosIL AcuStar. Гемолиз и триглицеридемия влияют на результаты FRET, но не ИФА [59, 72].

Что лучше – исследовать антиген или активность ADAMTS13? В практической деятельности большее значение имеет активность ADAMTS13. У пациентов с ТТП может наблюдаться несоответствие активности ADAMTS13 концентрации антигена. При наследственной форме ТТП ряд мутаций приводит к нарушению секреции ADAMTS13, при других мутациях в большей степени, чем секреция, нарушается функциональная способность ADAMTS13, в результате концентрация антигена превышает активность ADAMTS13 [27, 30, 33]. При исследовании плазмы пациентов с ТТП на разных стадиях заболевания установлена сла-

бая корреляция между антигеном и активностью ADAMTS13 при первых клинических проявлениях ТТП ($r=0,23$), обострении заболевания ($r=0,35$), достижении клинического ответа ($r=0,31$) и ремиссии ($r=0,28$) [74]. Поэтому предлагается использовать исследование активности ADAMTS13 как метод выбора при установке диагноза ТТП. Исследование антигена ADAMTS13 имеет большое научное значение, может быть использовано для прогноза: если после плазмообмена антиген ADAMTS13 не нормализуется, это плохой прогностический признак [74].

Принципиально и urgently выявление *ингибитора ADAMTS13*, подтверждающее диагноз иммуноопосредованной формы ТТП. Анти-ADAMTS13-антитела делятся на два класса: нейтрализующие антитела или ингибиторы и антитела, не обладающие ингибиторной активностью [75].

ИФА выявляет общее количество анти-ADAMTS13-антител. Метод основан на связывании анти-ADAMTS13-антител, имеющих в плазме пациента, с рекомбинантным ADAMTS13, нанесенным на стенки лунок планшета, при инкубации. Лунки планшета затем отмывают, и связанные антитела определяют с помощью пероксидазы хрена, конъюгированной с антителами к человеческим иммуноглобулинам (Ig)G. С помощью ИФА диагностический порог антител анти-ADAMTS13 составляет более 15 ед/л [76, 77].

Ингибитор ADAMTS13 выявляют в тесте смешивания, титр ингибитора определяют в единицах Бетезда. Одна единица Бетезда (Bethesda Unit) – это количество ингибитора в 1 мл плазмы, которое снижает на 50% активность ADAMTS13 в смеси равных объемов плазмы пациента и донора после инкубации при температуре 37°C. С помощью любого метода, определяющего активность ADAMTS13, можно выполнить тест смешивания. Для выполнения теста смешивания плазму пациента предварительно подогревают до 56°C в течение 60 мин, чтобы инактивировать в ней эндогенную активность ADAMTS13. Затем смешивают плазму пациента с нормальной донорской плазмой в различных соотношениях (1:1, 2:1 и 3:1, 4:1) и инкубируют в течение 2 ч, после чего определяют резидуальную активность ADAMTS13, рассчитывается титр ингибитора [75, 77, 78].

Не все антитела обладают ингибиторной активностью. С помощью ИФА антитела класса IgG выявлялись у 58% пациентов с ТТП, а в тесте смешивания ингибирующие антитела обнаружены лишь у 27,5% [77]. При обследовании 35 пациентов с впервые выявленной ТТП антитела анти-ADAMTS13, относящиеся к IgM, IgG и IgA, выявлены у 94% пациентов, в то время как ингибирующие антитела – лишь у 89%. Не имелось корреляции между титром антител, относящихся к Ig всех трех классов, и титром ингибирующей активности в тесте смешивания [76]. Какой из методов выявления ингибитора следует выбрать? Выявление ингибирующих анти-ADAMTS13-антител в тесте смешивания имеет большее значение, чем обнаружение с помощью ИФА анти-ADAMTS13 IgG, поскольку обнаружение этих Ig еще не свидетельствует, что они будут обладать ингибирующей активностью, и пациенту следует назначить иммуносупрессивную терапию. Описано клиническое наблюдение [79] пациента, у которого выявлен синдром Апшоу–Шульмана: низкая активность ADAMTS13, мутации гена *ADAMTS13*, однако с помощью ИФА выявлены анти-ADAMTS13 IgG в концентрации 95 ед/мл. Казалось бы, пациент нуждается в проведении иммуносупрессивной терапии, однако в тесте смешивания, выполненного с помощью метода FRET, а затем с помощью ИФА, ингибитор не обнаружен. В ряде ситуаций выполнение теста смешивания экономически более выгодно. ТТП – редкое заболевание, при каждом новом случа-

чае должен выполняться тест на наличие ингибитора и/или антител, поскольку это определяет тактику терапии. ИФА для каждой отдельной пробы является дорогостоящим. Выгоднее выполнять тест смешивания тем же методом, которым определялась активность ADAMTS13.

Таким образом, можно сформулировать следующие основные принципы диагностики ТТП:

- Предположительный диагноз ТТП устанавливают на основании клинической картины – анемия, тромбоцитопения, поражение различных органов и систем.
- Характерны выраженная тромбоцитопения без тяжелого нарушения функции почек, повышение сывороточной концентрации лактатдегидрогеназы, отрицательная прямая проба Кумбса, анемия, сниженное содержание гаптоглобина.
- Диагноз ТТП подтверждается при активности ADAMTS13 в плазме менее 10%. При активности

ADAMTS13 10–20% и характерной клинической картине необходимо повторить исследование. Образцы плазмы на исследование должны быть взяты до начала трансфузий плазмы либо плазмообмена.

При выявлении низкой активности ADAMTS13 необходимо обследовать на наличие ингибитора ADAMTS13, его выявление определяет тактику дальнейшего лечения. Обнаружение анти-ADAMTS13-антител, относящихся к IgG, не всегда свидетельствует о выявлении ингибитора, поскольку они могут не обладать ингибирующей активностью. Ингибирующее действие анти-ADAMTS13-антител подтверждается в тесте смешивания.

Необходимо обследовать всех впервые выявленных пациентов на наличие мутаций гена *ADAMTS13*. Наличие ингибитора не исключает мутации гена *ADAMTS13*.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001;413(6855):488-94. doi: 10.1038/35097008
2. Zheng X. Structure-function and regulation of ADAMTS13. *J Thromb Haemost*. 2013;11(Suppl. 1):11-23. doi: 10.1111/jth.12221
3. Колосков А.В., Мангушло А.А. Металлопротеаза ADAMTS-13. Гематология и трансфузиология. 2019;64(4):471-82 [Koloskov AV, Mangushlo AA. Metalloprotease ADAMTS-13. *Gematologiya i transfusiologiya*. 2019;64(4):471-82 (In Russ.)]. doi: 10.35754/0234-5730-2019-64-4-471-482
4. South K, Luken BM, Crawley JTB, et al. Conformational activation of ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(52):18578-83. doi: 10.1073/pnas.1411979112
5. Deforche L, Roose E, Vandenbulcke A, et al. Linker regions and flexibility around the metalloprotease domain account for conformational activation of ADAMTS-13. *J Thromb Haemost*. 2015;13(11):2063-75. doi: 10.1111/jth.13149
6. Ai J, Smith P, Wang S, et al. The Proximal Carboxyl-terminal Domains of ADAMTS13 Determine Substrate Specificity and Are All Required for Cleavage of von Willebrand Factor. *J Biol Chem*. 2005;280(33):29428-34. doi: 10.1074/jbc.M505513200
7. Roose E, Schelpe AS, Joly BS, et al. An open conformation of ADAMTS-13 is a hallmark of acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2018;16(2):378-88. doi: 10.1111/jth.13922
8. Luken BM, Turenhout EAM, Hulstein JJJ, et al. The spacer domain of ADAMTS13 contains a major binding site for antibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*. 2005;93(2):267-74. doi: 10.1160/TH04-05-0301
9. Sadler JE. Pathophysiology of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Blood*. 2017;130(10):1181-8. doi: 10.1182/blood-2017-04-636431
10. Ridolfi RL, Hutchins GM, Bell WR. The heart and cardiac conduction system in thrombotic thrombocytopenic purpura. A clinicopathologic study of 17 autopsied patients. *Ann Intern Med*. 1979;91(3):357-63. doi: 10.7326/0003-4819-91-3-357
11. Zheng Y, Chen J, Lopez JA. Flow-driven assembly of VWF fibres and webs in in vitro microvessels. *Nat Commun*. 2015;6:7858. doi: 10.1038/ncomms8858
12. Hosler GA, Cusumano AM, Hutchins GM. Thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome are distinct pathologic entities: A review of 56 autopsy cases. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127(7):834-9. doi: 10.1043/1543-2165(2003)127<834:TTPA-HU>2.0.CO;2
13. Roriz M, Landais M, Desprez J, et al. Risk factors for autoimmune diseases development after thrombotic thrombocytopenic purpura. *Med (United States)*. 2015;94(42):e1598. doi: 10.1097/MD.0000000000001598
14. Van Dorland HA, Taleghani MM, Sakai K, et al. The International Hereditary Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Registry: Key findings at enrollment until 2017. *Haematologica*. 2019;104(10):2107-15. doi: 10.3324/haematol.2019.216796
15. Sánchez-Luceros A, Fariás CE, Amaral MM, et al. von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb Haemost*. 2004;92(6):1320-6. doi: 10.1160/TH03-11-0683
16. Момот А.П., Молчанова И.В., Батрак Т.А. и др. Референтные значения показателей системы гемостаза при физиологически протекающей беременности и после родоразрешения. *Проблемы репродукции*. 2015;21(1):89-97 [Момот AP, Molchanova IV, Batrak TA, et al. Reference values of hemostatic system parameters in normal pregnancy and after delivery. *Problemi reproductcii*. 2015;21(1):89-97 (In Russ.)]. doi: 10.17116/repro20152189-97
17. Fakhouri F. Pregnancy-related thrombotic microangiopathies: Clues from complement biology. *Transfus Apher Sci*. 2016;54(2):199-202. doi: 10.1016/j.transci.2016.04.009
18. Moatti-Cohen M, Garrec C, Wolf M, et al. Unexpected frequency of Upshaw-Schulman syndrome in pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2012;119(24):5888-97. doi: 10.1182/blood-2012-02-408914
19. Morgand M, Buffet M, Busson M, et al. High prevalence of infectious events in thrombotic thrombocytopenic purpura and genetic relationship with toll-like receptor 9 polymorphisms: Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *Transfusion*. 2014;54(2):389-97. doi: 10.1111/trf.12263
20. Zhaoyue Wang, Ziqiang Yu, Jian Su, et al. Sepsis-induced disseminated intravascular coagulation with features of thrombotic thrombocytopenic purpura: A fatal fulminant syndrome. *Clin App Thromb Hemost*. 2011;17(3):251-3. doi: 10.1177/1076029609357739
21. Douglas KW, Pollock KGJ, Young D, et al. Infection frequently triggers thrombotic microangiopathy in patients with preexisting risk factors: A single-institution experience. *J Clin Apher*. 2010;25(2):47-53. doi: 10.1002/jca.20226
22. Page EE, Kremer Hovinga JA, Terrell DR, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura: Diagnostic criteria, clinical features, and long-term outcomes from 1995 through 2015. *Blood Adv*. 2017;1(10):590-600. doi: 10.1182/bloodadvances.2017005124
23. Mariotte E, Azoulay E, Galicier L, 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):e237-45. doi: 10.1016/S2352-3026(16)30018-7
24. Blombery P, Kivivali L, Pepperell D, 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. *Int Med J.* 2016;46(1):71-9. doi: 10.1111/imj.12935
25. Fujimura Y, Matsumoto M, Isonishi A, et al. Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Thromb Haemost.* 2011;9(1S):283-301. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04341.x
 26. Lotta LA, Wu HM, Mackie IJ, et al. Residual plasmatic activity of ADAMTS13 is correlated with phenotype severity in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2012;120(2):440-8. doi: 10.1182/blood-2012-01-403113
 27. Roose E, Tersteeg C, Demeersseman R, et al. Anti-ADAMTS13 Antibodies and a Novel Heterozygous p.R1177Q Mutation in a Case of Pregnancy-Onset Immune-Mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *TH Open.* 2018;02(01):e8-15. doi: 10.1055/s-0037-1615252
 28. Von Krogh AS, Quist-Paulsen P, Waage A, et al. High prevalence of hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura in central Norway: From clinical observation to evidence. *J Thromb Haemost.* 2016;14(1):73-82. doi:10.1111/jth.13186
 29. Joly BS, Boisseau P, Roose E, et al. ADAMTS13 Gene Mutations Influence ADAMTS13 Conformation and Disease Age-Onset in the French Cohort of Upshaw-Schulman Syndrome. *Thromb Haemost.* 2018;118(11):1902-17. doi: 10.1055/s-0038-1673686
 30. Camilleri RS, Cohen H, Mackie IJ, et al. Prevalence of the ADAMTS-13 missense mutation R1060W in late onset adult thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2008;6(2):331-8. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.02846.x
 31. Plaimauer B, Fuhrmann J, Mohr G, et al. Modulation of ADAMTS13 secretion and specific activity by a combination of common amino acid polymorphisms and a missense mutation. *Blood.* 2006;107(1):118-25. doi: 10.1182/blood-2005-06-2482
 32. Dai YL, Tang X, Chen HB, et al. Hereditary Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in a Chinese Boy With a Novel Compound Heterozygous Mutation of the ADAMTS13 Gene. *Front Pediatr.* 2020;8:1-5. doi: 10.3389/fped.2020.00554
 33. Ling J, Ma Z, Liu L, et al. Identification of a crucial tryptophan residue in ADAMTS13 required for its secretion and enzymatic activity. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018;45(11):1181-6. doi: 10.1111/1440-1681.12996
 34. George JN. Forecasting the future for patients with hereditary TTP. *Blood.* 2012;120(2):243-4. doi: 10.1182/blood-2012-05-427419
 35. Amorosi EL, Ultman JE. Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of the literature. *Med.* 1966;45(3):139-59
 36. Chiasakul T, Cuker A. Clinical and laboratory diagnosis of TTP: An integrated approach. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2018;2018(1):530-8. doi: 10.1182/asheducation-2018.1.530
 37. Nambiar AM, Amalakuhan B. Diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Blood Disord Symptoms Treat.* 2017;2(3):605-13. doi: 10.1007/978-3-319-43341-7_70
 38. Azoulay E, Bauer PR, Mariotte E, et al. Expert statement on the ICU management of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Intensive Care Med.* 2019;45(11):1518-39. doi: 10.1007/s00134-019-05736-5
 39. Benhamou Y, Boelle PY, Baudin B, 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):293-302. doi: 10.1111/jth.12790
 40. Meloni G, Proia A, Antonini G, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura: prospective neurologic, neuroimaging and neurophysiologic evaluation. *Haematologica.* 2001;86(11):1194-9.
 41. Burrus TM, Wijdicks EFM, Rabinstein AA. Brain lesions are most often reversible in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *Neurology.* 2009;73(1):66-70. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181aaea1b
 42. Alwan F, Vendramin C, Vanhoorelbeke K, et al. Presenting ADAMTS13 antibody and antigen levels predict prognosis in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2017;130(4):466-71. doi: 10.1182/blood-2016-12-758656
 43. Zafrani L, Mariotte E, Darmon M, 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):380-9. doi: 10.1111/jth.12826
 44. Wahla AS, Ruiz J, Nouredine N, et al. Myocardial infarction in thrombotic thrombocytopenic purpura: A single-center experience and literature review. *Eur J Haematol.* 2008;81(4):311-6. doi: 10.1111/j.1600-0609.2008.01112.x
 45. Griffin D, Al-Nouri Z, Muthurajah D, et al. First symptoms in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): what are they and when do they occur? *Transfusion.* 2013;53(1):235-7. doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03934.x
 46. Muñoz AE, Barbee RW. Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) presenting as pancreatitis. *J Emerg Med.* 2003;24(4):407-11. doi: 10.1016/S0736-4679(03)00038-6
 47. Fox LC, Cohn SJ, Kausman JY, et al. Consensus opinion on diagnosis and management of thrombotic microangiopathy in Australia and New Zealand. *Int Med J.* 2018;48(6):624-36. doi: 10.1111/imj.13804
 48. Scully M, Cataland S, Coppo P, et al. Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. *J Thromb Haemost.* 2017;15(2):312-22. doi: 10.1111/jth.13571
 49. Scully M, Hunt BJ, Benjamin S, et al. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol.* 2012;158(3):323-35. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09167.x
 50. Aksay E, Kiyani S, Ersel M, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura mimicking acute ischemic stroke. *Emerg Med J.* 2006;23(9):2-3. doi: 10.1136/emj.2006.036327
 51. Филатов Л.Б., Томилов А.Ф., Алексеева Т.А. Гемолитическая анемия, вызванная фрагментацией эритроцитов. *Клин. онкогематология.* 2011;4(4):346-55 [Filatov LB, Tomilov AF, Alekseeva TA. Hemolytic anemia caused by red blood cells fragmentation. *Klin. onkohematologiya.* 2011;4(4):346-55 (In Russ)].
 52. Burns ER, Lou Y, Pathak A. Morphologic Diagnosis of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Am J Hematol.* 2004;75(1):18-21. doi: 10.1002/ajh.10450
 53. Zini G, D'Onofrio G, Briggs C, et al. ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes. *Int J Lab Hematol.* 2012;34(2):107-16. doi: 10.1111/j.1751-553X.2011.01380.x
 54. Uderzo CC, Jodele S, Eli Missiry M, et al. Transplant-Associated Thrombotic Microangiopathy (TA-TMA) and Consensus Based Diagnostic and Therapeutic Recommendations: Which TA-TMA Patients to Treat and When? *J Bone Marrow Res.* 2014;2(3):10000152. doi: 10.4172/2329-8820.1000152
 55. Joly BS, Coppo P, Veyradier A. An update on pathogenesis and diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Expert Rev Hematol.* 2019;12(6):383-95. doi: 10.1080/17474086.2019.1611423
 56. Coppo P, Schwarzinger M, Buffet M, et al. Predictive features of severe acquired ADAMTS13 deficiency in idiopathic thrombotic microangiopathies: The French TMA reference center experience. *PLoS One.* 2010;5(4). doi: 10.1371/journal.pone.0010208
 57. Bendapudi PK, Hurwitz S, Fry A, et al. Derivation and external validation of the PLASMIC score for rapid assessment of adults with thrombotic microangiopathies: a cohort study. *Lancet Haematol.* 2017;4(4):e157-64. doi: 10.1016/S2352-3026(17)30026-1
 58. Matsumoto M, Fujimura Y, Wada H, et al. Diagnostic and treatment guidelines for thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) 2017 in Japan. *Int J Hematol.* 2017;106(1):3-15. doi: 10.1007/s12185-017-2264-7
 59. Just S. Methodologies and clinical utility of ADAMTS-13 activity testing. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36(1):82-90. doi: 10.1055/s-0030-1248727
 60. Rock G, Yousef H, Neurath D, et al. ADAMTS-13 levels in fresh, stored, and solvent detergent treated plasma. *Transfus Apher Sci.* 2006;35(3):235-8. doi: 10.1016/j.transci.2006.08.006
 61. Furlan M, Robles R, Lammle B, et al. 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):4223-34. doi: 10.1182/blood.v87.10.4223.bloodjournal87104223
 62. Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1998;339(22):1585-94. doi: 10.1056/NEJM199811263392203
 63. Gerritsen HE, Turecek PL, Schwarz HP, 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):1386-9.
64. 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(8):430-5. doi: 10.1007/s00277-002-0502-3
 65. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, et al. FRETs-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Brit J Haematol.* 2005;129(1):93-100. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05420.x
 66. Miyata T, Kokame K, Banno F. Measurement of ADAMTS13 activity and inhibitors. *Curr Opin Hematol.* 2005;12(5):384-9. doi: 10.1097/01.moh.0000169286.74464.3a
 67. Crist RA, Rodgers GM. A comparison of two commercial adamts13 activity ASSAYS with a reference laboratory method. *Lab Med.* 2009;40(4):232-5. doi: 10.1309/LM95OQN0GLZPYHBP
 68. Valsecchi C, Mirabet M, Mancini I, et al. Evaluation of a New, Rapid, Fully Automated Assay for the Measurement of ADAMTS13 Activity. *Thromb Haemost.* 2019;119(11):1767-72. doi: 10.1055/s-0039-1696718
 69. Vetr H, Binder N. Novel antibody for determination of ADAMTS-13 activity. Austria; US2019/0369095A1, 2019; p. 1-10.
 70. Moore GW, Meijer D, Griffiths M, et al. A multi-center evaluation of TECHNOSCREEN® ADAMTS-13 activity assay as a screening tool for detecting deficiency of ADAMTS-13. *J Thromb Haemost.* 2020;18(7):1686-94. doi: 10.1111/jth.14815
 71. Langley K, Fretwell R, Kitchen S, et al. Multiple centre evaluation study of ADAMTS13 activity and inhibitor assays. *Int J Lab Hematol.* 2018;40(1):21-5. doi: 10.1111/ijlh.12718
 72. Nakashima MO, Zhang X, Rogers HJ, et al. Validation of a panel of ADAMTS13 assays for diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura: activity, functional inhibitor, and autoantibody test. *Int J Lab Hematol.* 2016;38(5):550-9. doi: 10.1111/ijlh.12542
 73. Ayanambakkam A, Kremer Hovinga JA, Vesely SK, et al. Diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura among patients with ADAMTS13 Activity 10%–20%. *Am J Hematol.* 2017;92(11):E644-6. doi: 10.1002/ajh.24885
 74. Yang S, Jin M, Lin S, et al. ADAMTS13 activity and antigen during therapy and follow-up of patients with idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: Correlation with clinical outcome. *Haematologica.* 2011;96(10):1521-7. doi: 10.3324/haematol.2011.042945
 75. Mancini I. ADAMTS13-related assays in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Università degli studi di Milano; 2012.
 76. Ferrari S, Scheiflinger F, Rieger M, et al. Prognostic value of anti-ADAMTS13 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 ADAMTS13 activity. *Blood.* 2007;109(7):2815-22. doi: 10.1182/blood-2006-02-006064
 77. Shelat SG, Smith P, Ai I, et al. Inhibitory autoantibodies against ADAMTS-13 in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura bind ADAMTS-13 protease and may accelerate its clearance in vivo. *J Thromb Haemost.* 2006;4(8):1707-17. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.02025.x
 78. Vendramin C, Thomas M, Westwood J-P, et al. Bethesda Assay for Detecting Inhibitory Anti-ADAMTS13 Antibodies in Immune-Mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *TH Open.* 2018;2(3):e329-33. doi: 10.1055/s-0038-1672187
 79. Накастоев И.М., Авдонин П.П., Грибанова Е.О. и др. Врожденная форма тромботической тромбоцитопенической пурпуры. Краткий обзор и описание клинического случая. *Гематология и трансфузиология.* 2018;63(2):191-9 [Nakastoev IM, Avdonin PP, Gribanova EO, et al. Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. case report and review. *Gematologiya i transfusiologiya* 2018;63(2):191-9 (In Russ.)]. doi: 10.25837/HAT.2018.39..2..010

Поступила 17.11.2020