



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ: ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Επίπεδα ADAMTS13 σε ασθενείς με COVID-19»

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ

Τζοάνα Γκίνι

A.M 18678056

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ

Ευθυμία Παύλου

Αθήνα, 2022



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE
SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
DIVISION: MEDICAL LABORATORIES



DISSERTATION

«Adamts13 Levels on COVID-19 Patients»

STUDENT NAME

Joanna Gkini

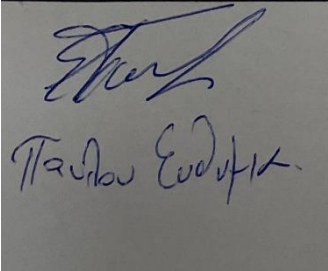
C.N 18678056

NAME OF SUPERVISOR

Efthimia Pavlou

Athens,2022

Η παρακάτω εργασία εξετάστηκε από την τριμελή επιτροπή στις
02/03/2023:

A/A	1 ^{ος} εξεταστής	2 ^{ος} εξεταστής	3 ^{ος} εξεταστής
	Ευθυμία Παύλου	Κριεμπάρδης Αναστάσιος	Μπίρτσας Βασίλειος
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"><p>(Όνομο, Υπογραφή)</p><p>Ευθυμία Παύλου</p></div>		
	Υποψήφια Διδάκτρων	Αναπληρωτής Καθηγητής	Ακαδημαϊκός Υπότροφος

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Τζοάνα Γκίνι του Μαρτίν, με αριθμό μητρώου 18678056 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας & Πρόνοιας του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγω για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πτυχιακή εργασία για τις σπουδές μου στο τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών και τομέα Ιατρικών Εργαστηρίων. Η εκπόνηση της οποίας, απαιτεί ιδιαίτερη αφοσίωση για την επιτυχή ολοκλήρωσή της. Αποτελεί το τελευταίο στάδιο για την ολοκλήρωση των σπουδών μου και το έναυσμα για την επαγγελματική μου πορεία ως Βιοϊατρικός Εργαστηριακός Επιστήμονας.

Μέσα από τις επόμενες γραμμές θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Ευθυμία Παύλου κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την ενθάρρυνσή της και την καθοδήγησή της για την διεκπεραίωση της εργασίας και την πολύτιμη βοήθειά της. Τέλος, θα ήθελα επίσης να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στο προσωπικό του εργαστηρίου της Αιμόστασης στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Ιπποκράτειο» για την πολύτιμη βοήθειά τους στο τεχνικό κομμάτι της πτυχιακής μου εργασίας παρά τον περιορισμένο χρόνο τους.

Αφιερώσεις

Αφιερώνω την εργασία μου στην οικογένειά μου για την ηθική και οικονομική υποστήριξη που μου προσφέρουν όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
ACE2:	Angiotensin-converting enzyme 2	Ένζυμο μετατροπής αγγειοτενσίνης 2
ADAMTS Ab:	adamts antibody	adamts αντίσωμα
ADAMTS1:	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1	Μια δισιντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεάση με τομέα θρομβοσπονδίνης 1
ADAMTS13:	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1 member 13	Μια δισιντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεάση με τομέα θρομβοσπονδίνης 1, μέλος 13
APS:	Antiphospholipid syndrome	Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο
cDNA:	Complementary DNA	Συμπληρωματικό DNA
COVID-19:	Coronavirus Disease 2019	Νόσος κορωνοϊού 2019
ECs:	Endothelial cells	Ενδοθηλιακά κύτταρα
FRET:	Fluorescence/Förster resonance energy transfer	Μεταφορά ενέργειας συντονισμού Förster
GPIb:	Glycoprotein Ib	Γλυκοπρωτεΐνη Ib
GPIb α :	Glycoprotein Ib Platelet Subunit Alpha	Γλυκοπρωτεΐνη Ib αιμοπεταλίων υποομάδα άλφα
hACE2	human Angiotensin-converting enzyme 2	Ανθρώπινο Ένζυμο μετατροπής αγγειοτενσίνης 2
HELLP:	Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelets	Αιμόλυση, Αυξημένα ηπατικά ένζυμα και χαμηλά αιμοπετάλια
HPCT:	Hematopoietic Progenitor Cell Transplantation	Μεταφύτευση Αιμοποιητικού Προγονικού Κυττάρου
HSCs:	Hematopoietic stem cells	Αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα
HUS:	Hemolytic uremic syndrome	Αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο
ICSH:	International Council for Standardization in Hematology	Διεθνές Συμβούλιο Τυποποίησης στην Αιματολογία

IgA:	Immunoglobulin A	Ανοσοσφαιρίνη Α
IgG:	Immunoglobulin G	Ανοσοσφαιρίνη G
IgM:	Immunoglobulin M	Ανοσοσφαιρίνη M
iTTP:	Idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura	Ιδιοπαθής θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα
IU/dL:	International Unit/dL	Διεθνής Μονάδα/dL
kb:	kilobase	κιλοβάση
kDA:	kilodalton	κιλοντάλτον
LDH:	lactate dehydrogenase	γαλακτική αφυδρογονάση
MAHA:	Microangiopathic Hemolytic Anemia	Μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία
MERS-CoV:	Middle East Respiratory Syndrome coronavirus	Αναπνευστικό Σύνδρομο Μέσης Ανατολής κορονοϊός.
NET:	Neutrophil	Ουδετερόφιλο
ORF:	Open Reading Frame	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης
pp:	polyprotein	πολυπρωτενείη
PSGL-1:	P-selectin glycoprotein ligand-1 purpura	γλυκοπρωτεΐνη P-σελεκτίνης 1 πορφύρα
RBD:	Receptor-binding domain	Περιοχή δέσμησης υποδοχέα
RBM:	Receptor-binding motif	Τομέας δέσμησης υποδοχέα
SARS-CoV-2:	Severe Acute Respiratory Syndrome- Coronavirus 2	Σοβαρό Οξύ Αναπνευστικό Σύνδρομο- Κορωνοϊός 2
SDS-PAGE:	Sodium Dodecyl Sulfate– Polyacrylamide Gel Electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου
SPSS:	Statistical Package for the Social Sciences	Στατιστικό Πακέτο για τις Κοινωνικές Επιστήμες
TMA:	Thrombotic microangiopathies	Θρομβωτικές μικροαγγειοπάθειες
TSP1:	Thrombospondin-1	Θρομποσπονδίνη-1
TTP:	Thrombotic thrombocytopenic purpura	Θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα
ULVWF:	Ultra Large Von Willebrand Factor	Μεγάλος παράγοντας Von

		Willebrand
VWF:	Von Willebrand Factor	Von Willebrand Factor
VWF:Ag:	Von Willebrand Factor Antigen	Von Willebrand Factor Αντιγόνο
VWF:RCo:	Von Willebrand Ristocetin Cofactor	Von Willebrand Συμπράγοντας Ριστοσεΐνης
VWFpp:	Von Willebrand factor propeptide	προπεπτίδιο Von Willebrand παράγοντα
WHO:	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας	World Health Organization
ΜΕΘ:	Intensive care unit-ICU	Μονάδα Εντατικής Θεραπείας

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	6
Αφιερώσεις.....	7
Συνοτομογραφίες.....	8
Περίληψη.....	12
Abstract.....	13
Εισαγωγή.....	14
1. Ιστορική αναδρομή περιστατικών TTP-ADAMTS13	14
1.1 Επίκτητη TTP.....	14
1.2 Von Willebrand Factor και η απομόνωση της ADAMTS13.....	15
2. Νόσος Covid-19	17
2.1 Αρχή της πανδημίας	17
2.2 SARS-CoV-2 και η παθογένειά του στην άγρια ζωή	18
2.3 Ο ρόλος του ενδιάμεσου ξενιστή στον SARS-CoV-2.....	20
2.4 Δομή και δράση του SARS-CoV-2.....	21
2.5 Υποδοχείς SARS-CoV2 και παθογένεια	22
2.6 Η νόσος covid-19 και η συσχέτισή της με τον von Willebrand Factor και το ADAMTS13	26
3. Εργαστηριακά ευρήματα ADAMTS13	29
3.1 Δομή και λειτουργία ADAMTS13.....	29
3.2 Μεταλλάξεις ADAMTS13 στην οικογενή-συγγενή TTP.....	32
3.3 Μηχανισμός αναστολής αυτοαντισώματος ADAMTS13 (anti-ADAMTS13).....	32
4. Παράγοντας von Willebrand	34
4.1 Ταυτοποίηση της πρωτεΐνης διάσπασης VWF ως ADAMTS13	36
5. Η σχέση του von Willebrand παράγοντα με την αιμόσταση	38
5.1 Αιμοπετάλια και ο ρόλος τους στην TTP.....	38
5.2 Αιμόσταση και η σχέση της με τον von Willebrand Factor	40
5.3 Ενδοθηλιακή ενεργοποίηση και η σύνδεση αυτής με το VWF.....	41
Σκοπός	44
Υλικά	45
Ασθενείς.....	45
Αντιδραστήρια	45
Διαλύματα	46
Μέθοδοι	47
Αρχή της Διαδικασίας.....	47
Συλλογή δείγματος	48
Αποθήκευση δείγματος.....	49
Εργαστηριακές μετρήσεις- Επεξεργασία δειγμάτων.....	49
Αποτελέσματα	52
Συμπεράσματα	62
Βιβλιογραφία	63

Περίληψη

Τίτλος: Επίπεδα ADAMTS13 σε ασθενείς με COVID-19

Με αφορμή την πανδημία που προκλήθηκε από τον ιό SARS-CoV-2 το 2019 και το αντίκτυπο αυτού στην ιατρική κοινότητα, η εργασία αυτή ασχολείται με την αλληλεπίδραση της νόσου COVID-19 και τα επίπεδα δραστηριότητας ADAMTS13 σε ασθενείς με COVID-19. Η αναφορά στην θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (TTP) γίνεται στις αρχές της δεκαετίας του '20 με κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό αυτής της ασθένειας να είναι η παρουσία μικροθρόμβων, οι οποίοι είναι πλούσιοι σε αιμοπετάλια. Στο πλάσμα ασθενών με TTP βρέθηκαν μεγάλα πολυμερή του von Willebrand Factor τα οποία οφείλονταν στην απουσία μιας αποπολυμεράσης εν ονόματι ADAMTS13. Η νόσος COVID-19 φαίνεται να επηρεάζει διάφορα συστήματα του ανθρώπινου σώματος και εκδηλώνεται με ήπια έως και σοβαρά συμπτώματα. Η δομή του ιού είναι τέτοια που διευκολύνει την είσοδό του στα κύτταρα, δημιουργώντας έτσι διάφορα στάδια στην πορεία της λοίμωξης. Οι δομές αυτές οδηγούν σε θρομβωτικές επιπλοκές και αναπνευστική ανεπάρκεια. Ο VWF είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία έπειτα από διεργασίες, αποθηκεύεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, σε μορφή UL-VWFs τα οποία στη συνέχεια διασπά και ρυθμίζει το ADAMTS13, εμποδίζοντας τον σχηματισμό θρόμβων.

Τα εργαστηριακά ευρήματα που βρέθηκαν στους ασθενείς σχετίζονται με αιμολυτική αναιμία και θρομβοπενία. Η διάγνωση της TTP γίνεται με την μέτρηση των επιπέδων δραστηριότητας του ADAMTS13, του αναστολέα και του αντισώματος. Η TTP χωρίζεται με βάση τον μηχανισμό ανεπάρκειας του ADAMTS13 σε συγγενή και επίκτητη. Οι μέτριες ανεπάρκειες της δραστηριότητας του γονιδίου στο πλάσμα σχετίζονται με άλλες παθολογικές καταστάσεις. Τα αιμοπετάλια αποτελούν κύριο παράγοντα της αιμόστασης, καθώς σχετίζονται με την άμυνα του ξενιστή σε λοιμώξεις αλλά και με διαδικασίες που έχουν σκοπό την αποφυγή σχηματισμού θρόμβων. Αυτά στη νόσο COVID-19, είναι υπεύθυνα για την έκκριση παραγόντων που συμβάλλουν στην θρομβοφλεγμονή και την ανεπάρκεια οργάνων. Τα συσσωματώματα αιμοπεταλίων καθώς και άλλα κύτταρα εντοπίστηκαν σε ασθενείς με COVID-19 και οδήγησαν σε θρομβωτικά επεισόδια. Ο VWF αποτελεί δείκτη ο οποίος λαμβάνεται υπόψη σε περιπτώσεις που σχετίζονται με ενδοθηλιακά τραύματα και την πήξη στον COVID-19. Τέλος, τα ευρήματα που προέκυψαν από την έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με COVID-19, συμφωνούν με αυτά παλαιότερων ερευνών ως προς τις παθολογικές τιμές αιματολογικών, ανοσολογικών και βιοχημικών δεικτών αλλά και τον συσχετισμό με άλλα νοσήματα όπως η οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια και η πνευμονία. Ωστόσο, απαιτείται περισσότερη έρευνα για τον προσδιορισμό της προγνωστικής αξίας του άξονα VWF/ADAMTS13 σε ασθενείς με COVID-19.

Λέξεις Κλειδιά: θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα, ADAMTS13, SARS-CoV-2, παράγοντας von Willebrand, αιμολυτική αναιμία, θρομβοπενία, αιμοπετάλια, πήξη, οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια, πνευμονία

Abstract

Title: ADAMTS13 levels in patients with COVID-19

Occasioned by the 2019 SARS-CoV-2 pandemic and its impact on the medical community, this paper deals with the interaction of COVID-19 disease and ADAMTS13 activity levels in patients with COVID-19. Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) was first reported in the early '20s, with the main pathological feature of this disease being the presence of microthrombi, which are rich in platelets. Large polymers of von Willebrand Factor were found in the plasma of TTP patients due to the absence of a depolymerase called ADAMTS13. The disease COVID-19 appears to affect various systems of the human body and manifests itself with mild to severe symptoms. The structure of the virus is such that it facilitates its entry into cells, thus creating various stages in the course of the infection. These structures lead to thrombotic complications and respiratory failure. VWF is a glycoprotein which, after processes, is stored in the endothelial cells, in the form of UL-VWFs which then breaks down and regulates ADAMTS13, preventing the formation of clots.

The laboratory findings found in the patients are related to hemolytic anemia and thrombocytopenia. TTP is diagnosed by measuring the levels of ADAMTS13 activity, the inhibitor, and the antibody. TTP is divided based on the mechanism of ADAMTS13 deficiency into congenital and acquired. Moderate deficiencies of plasma gene activity are associated with other pathological conditions. Platelets are a major factor in hemostasis, as they are related to the host's defense against infections but also to processes aimed at avoiding the formation of clots. These in the disease COVID-19, are responsible for the secretion of factors that contribute to thrombo-inflammation and organ failure. Platelet aggregates as well as other cells have been identified in patients with COVID-19 and lead to thrombotic events. VWF is a marker to consider in cases related to endothelial injury and coagulation in COVID-19. Finally, the findings obtained from the research carried out in patients with COVID-19, agree with those of earlier research in terms of the pathological values of hematological, immunological, and biochemical indicators as well as the correlation with other diseases such as acute respiratory failure and pneumonia. However, more research is needed to determine the prognostic value of the VWF/ADAMTS13 axis in patients with COVID-19.

Keywords: thrombotic thrombocytopenic purpura, ADAMTS13, SARS-CoV-2, von Willebrand factor, hemolytic anemia, thrombocytopenia, platelets, coagulation, acute respiratory failure, pneumonia

Εισαγωγή

1. Ιστορική αναδρομή περιστατικών TTP-ADAMTS13

1.1 Επίκτητη TTP

Η ασθένεια με την ονομασία θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (TTP) περιεγράφηκε για πρώτη φορά το 1924 (Εικόνα 1) όταν ο Eli Moschcowitz ανέφερε το περιστατικό ενός 16χρονου κοριτσιού με ξαφνική έναρξη πυρετού, αιμολυτική αναιμία και αδυναμία, συμπτώματα τα οποία γρήγορα ακολουθήθηκαν από παράλυση, κώμα στις δύο εβδομάδες πριν από τον θάνατό της (Moschcowitz, 1952). Η αυτοψία που πραγματοποιήθηκε στο κορίτσι, αποκάλυψε διάχυτους υαλικούς θρόμβους στα τερματικά αρτηρίδια και τα τριχοειδή αγγεία της καρδιάς της, του νεφρού και του ήπατος, ωστόσο παρατηρήθηκε ότι τα αγγεία μέτριου μεγέθους παρέμειναν ανεπηρέαστα (Moschcowitz E., 1952). Από εκείνη την έκθεση, η ασθένεια TTP είχε πυροδοτήσει το ενδιαφέρον των αιματολόγων και έτσι βρέθηκε στο επίκεντρο κλινικής και επιστημονικής έρευνας. Μεγάλο μέρος του ενδιαφέροντος για τη TTP πιθανότατα σχετίζεται με τη δραματική εμφάνισή της σε υγιή άτομα, αλλά και στην ταχέως μοιραία πορεία που ακολουθεί η ασθένεια, αλλά και στο γεγονός ότι η έγκαιρη διάγνωσή της μπορεί να σώσει ζωές.

Το 1960 οι Schulman et al (I SCHULMAN et al., 1960), (Εικόνα 1) ανέφεραν μια παρόμοια διαταραχή σε ένα κοριτσάκι 8 ετών που εμφάνισε υποτροπιάζοντα επεισόδια θρομβοπενίας. Αυτός ο ασθενής ανταποκρίθηκε καλά στην έγχυση πλάσματος και ο Schulman πρότεινε ότι η διαταραχή οφειλόταν σε ανεπάρκεια ενός διεγερτικού αιμοπεταλιακού παράγοντα.

Ο Urshaw αργότερα, ανέφερε συγκρίσιμα ευρήματα με αυτά του Schulman σε μια 29χρονη γυναίκα της οποίας το πρώτο επεισόδιο εμφανίστηκε σε ηλικία 6 μηνών. Ο ίδιος πρότεινε την ανεπάρκεια ενός παράγοντα πλάσματος ,που προάγει την επιβίωση των αιμοπεταλίων και των ερυθρών αιμοσφαιρίων ,ως τον υποκείμενο παθογόνο μηχανισμό (Urshaw, 2010).

Είναι πλέον σαφές ότι η διαταραχή που περιγράφεται από τους Schulman και Urshaw, η οποία τώρα φέρει το όνομά τους (σύνδρομο Urshaw-Schulman, Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] αρ. 274150),(National Center for Biotechnology Information, n.d.) αντιπροσωπεύει μια επίκτητη μορφή TTP.

Οι μελέτες και οι παρατηρήσεις που πραγματοποιήθηκαν από τους Amorosí και

Ullman το 1996 μετά από ανασκόπηση σε περισσότερες από 270 περιπτώσεις, οδήγησαν στην διατύπωση της πεντάδας των συμπτωμάτων που ορίζουν την TTP. Τα συμπτώματα αυτά είναι ο πυρετός, η θρομβοπενία, η μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία, η νεφρική δυσλειτουργία που παρουσιάζεται με αιματουρία και/ή πρωτεϊνουρία ή το αυξημένο άζωτο ουρίας στο αίμα και τα νευρολογικά συμπτώματα. Ωστόσο σε αρκετές περιπτώσεις η παρουσία των συμπτωμάτων αυτών σε ασθενείς είναι μεταβλητή (E. AMOROSI et al., n.d.; Chauhan et al., 2006; Moake, 2002; X. L. Zheng et al., 2004). Το κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό αυτής της ασθένειας είναι η παρουσία μικροθρόμβων, οι οποίοι είναι πλούσιοι σε αιμοπετάλια και εντοπίζονται στα μικρά αγγεία πολλαπλών οργάνων (Asada et al., 1985). Ο όρος TTP αναφέρεται σε πολλές διαφορετικές μορφές της διαταραχής, με την πιο κοινή να είναι η επίκτητη TTP, η οποία συνήθως εμφανίζεται χωρίς προφανή προηγούμενο περιστατικό σε άτομα ηλικίας μεταξύ 20 και 60 ετών (Moake, 2002). Οι αρχικές περιγραφές της TTP ανέφεραν θνησιμότητα μεγαλύτερη από 90%. Η έλευση της ανταλλαγής πλάσματος και η σύγχρονη υποστηρικτική θεραπεία μείωσαν τη θνησιμότητα αυτής, σε λιγότερο από 20% (Rock et al., 2010). Η νοσηρότητα, ωστόσο, παραμένει υψηλή και η θεραπεία ενέχει σοβαρούς κινδύνους, μέσα σε αυτούς τους κινδύνους είναι η έκθεση σε προϊόντα αίματος από πολλούς δότες. Οι υποτροπές μετά από ένα αρχικό επεισόδιο επίκτητης TTP είναι συχνές, με περίπου το ένα τρίτο των περιπτώσεων να γίνονται χρόνιες (Asada et al., 1985; Rock et al., 2010). Η οικογενής-συγγενής TTP συνήθως εκδηλώνεται στην άμεση μεταγεννητική περίοδο ή κατά τη βρεφική ηλικία, αν και έχουν αναφερθεί ορισμένες περιπτώσεις με έναρξη από τη δεύτερη έως την τρίτη δεκαετία ζωής του ανθρώπου (Furlan & Lämmle, 2001; Moake, 2003; Saitoh et al., 1990; Sasahara et al., 2001; Shinohara et al., 1982; Shumak et al., 1995; Wallace et al., 1975). Μελέτες δείχνουν ότι η επίκτητη TTP, ανταποκρίνεται καλά στην έγχυση πλάσματος και συνήθως δεν απαιτείται ανταλλαγή πλάσματος (Barbot et al., 2001).

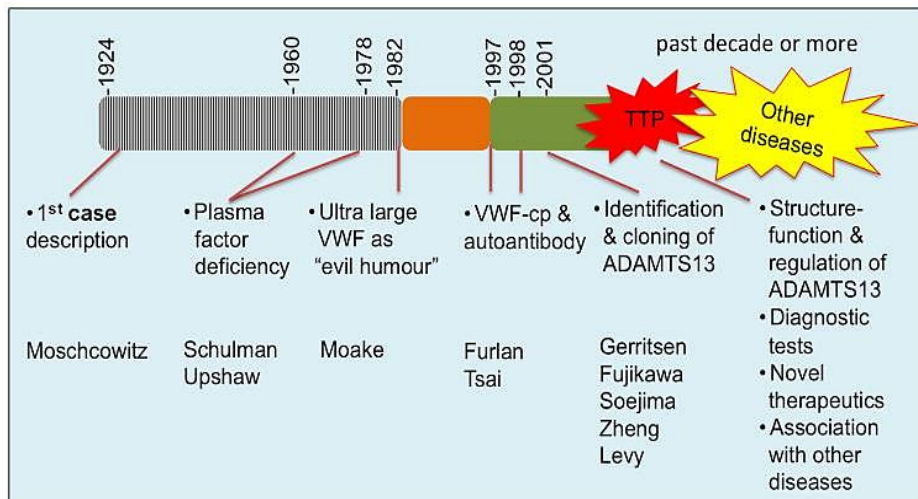
1.2 Von Willebrand Factor και η απομόνωση της ADAMTS13

Η παρουσίαση του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (HUS) μπορεί να είναι πολύ παρόμοια με αυτή του TTP, και αυτές οι 2 διαταραχές ομαδοποιούνται από ορισμένους ειδικούς στην ενιαία κατηγορία TTP/HUS (George, 2000). Ωστόσο, οι

περισσότερες περιπτώσεις οξείας HUS προκαλούνται από τα στελέχη *Escherichia coli* και *Shigella dysenteriae* που παράγουν σιγατοξίνες και η φύση των θρόμβων που παρατηρούνται στην TTP (πλούσια σε αιμοπετάλια και παράγοντα von Willebrand Factor (VWF) είναι διαφορετικά από αυτά που παρατηρούνται στο HUS (πλούσιο σε ινώδες). Επομένως, αυτές οι 2 διαταραχές είναι πιθανό να διαφέρουν τουλάχιστον εν μέρει ως προς τους μηχανισμούς παθογένειάς τους. Επί του παρόντος, η παρουσία θρομβοπενίας και μικροαγγειοπαθητικής αναιμίας (MAHA) που συνοδεύεται από αυξημένη γαλακτική αφυδρογονάση (LDH), μειωμένη αιμοσφαιρίνη και αιπτοσφαιρίνη, και ο κατακερματισμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αποτελούν επαρκή ευρήματα για την πιθανή διάγνωση της TTP.

Μια θεμελιώδης αναφορά από τους Moake et al (Εικόνα 1) αφορά την περιγραφή της παρουσίας «ασυνήθιστα μεγάλων» (UL) πολυμερών του παράγοντα von Willebrand (VWF) στο πλάσμα ασθενών με χρόνια υποτροπιάζουσα TTP (Moake et al., 2010). Τα ULVWF μπορούσαν να ανιχνευθούν στο πλάσμα κατά τη διάρκεια της ύφεσης της ασθένειας αλλά εξαφανίστηκαν στα οξέα επεισόδια αυτής. Η παρατήρηση αυτή, οδήγησε στην υπόθεση ότι η έλλειψη μιας αποπολυμεράσης VWF μπορεί να είναι η αιτία της TTP σε αυτούς τους ασθενείς. Η ανεπάρκεια αυτής της μυστηριώδους αποπολυμεράσης VWF αναφέρθηκε αρχικά σε ασθενείς με κληρονομική TTP από τους Furlan et al (Furlan et al., 1997), (Εικόνα 1) και αργότερα σε ασθενείς με επίκτητη χρόνια υποτροπιάζουσα TTP από τον Tsai (Tsai & Lian, 1998).

Τα επόμενα χρόνια και συγκεκριμένα το 2001, αρκετές ομάδες απομόνωσαν με επιτυχία αυτή την μυστηριώδη πρωτεάση η οποία ονομάστηκε ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type I τομέα (ADAMTS), 13)(Fujikawa et al., 2001; Gerritsen et al., 2001; X. Zheng et al., 2001). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο ADAMTS13 αναγνωρίστηκαν ως τα αίτια της κληρονομικής TTP (Levy et al., 2001).



Εικόνα 1-Σχηματική απεικόνιση ιστορικής αναδρομής TTP και ADAMTS13[J Thromb Haemost. 2017 Oct; 15(10): 1889–1900.Published online 2017 Jul 27.]

2. Νόσος Covid-19

2.1 Αρχή της πανδημίας

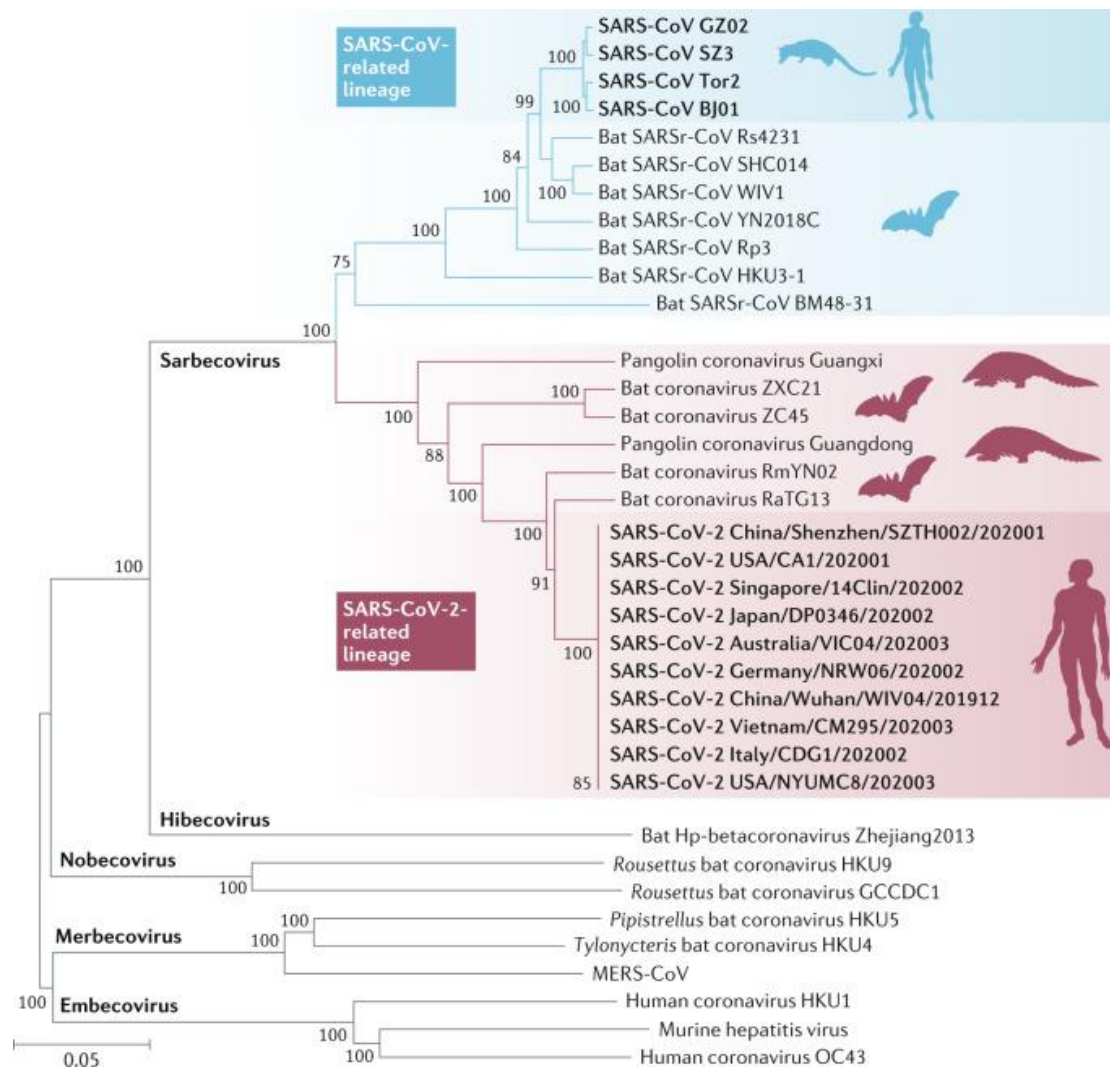
Η επιδημία του COVID-19 ξεκίνησε στη Γιουχάν της Κίνας στα τέλη του 2019 και εξαπλώθηκε γρήγορα στον υπόλοιπο κόσμο. Στις 11 Μαρτίου 2020, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας κήρυξε το ξέσπασμα του COVID-19 ως πανδημία. Έως και σήμερα τα καταγεγραμμένα κρούσματα SARS-CoV-2 ανέρχονται στα 666 εκατομμύρια σύμφωνα με τον WHO (*Coronavirus Disease (COVID-19)*, n.d.). Οι αναφερόμενες επιπλοκές του COVID-19 υποδεικνύουν τη συμμετοχή του αιμοστατικού, του κεντρικού νευρικού, του καρδιαγγειακού και του ουρογεννητικού συστήματος στους μηχανισμούς της νόσου (Güven et al., 2021; Hanff et al., 2020; Sisniega & Reynolds, 2021; С Бабкина et al., 2021). Ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς που συμβάλλει σε εξωπνευμονικές επιπλοκές στον COVID-19 είναι η καιμία, η οποία έχει εντοπιστεί σε ασθενείς με σοβαρή λοίμωξη σε αρκετές μελέτες (Jacobs et al., 2022),(Li et al., 2021).

Ο SARS-CoV-2 είναι ένας μονόκλωνος ιός ριβονουκλεϊκού οξέος με περίβλημα, θετικής πολικότητας που ανήκει στην οικογένεια Coronaviridae. Ως νέος betacoronavirus, ο SARS-CoV-2 μοιράζεται 79% ομοιότητας αλληλουχίας γονιδιώματος με τον SARS-CoV και 50% με τον MERS-CoV (Lu et al., 2020). Η οργάνωση του γονιδιώματός του είναι κοινή με άλλους betacoronaviruses. Τα έξι λειτουργικά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF) είναι διατεταγμένα με σειρά από το 5' έως 3': αντίγραφο (ORF1a/ORF1b), ακίδα (S), φάκελος (E), μεμβράνη (M) και

νουκλεοκαψίδιο (N) (Chan et al., 2020). Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τον SARS-CoV-2 έχουν παρόμοιο μήκος με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του SARS-CoV. Από τα τέσσερα δομικά γονίδια, ο SARS-CoV-2 μοιράζεται περισσότερο από 90% ταυτότητα αμινοξέων με το SARS-CoV εκτός από το γονίδιο S, το οποίο παρατηρήθηκε ότι αποκλίνει (Lu et al., 2020),(P. Zhou et al., 2020). Το γονίδιο ρεπλικάσης καλύπτει τα δύο τρίτα του γονιδιώματος 5' και κωδικοποιεί μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη (pp1ab), η οποία διασπάται πρωτεολυτικά σε 16 μη δομικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγραφή και την αντιγραφή του ιού. Οι περισσότερες από αυτές τις μη δομικές πρωτεΐνες SARS-CoV-2 έχουν περισσότερο από 85% ταυτότητα αλληλουχίας αμινοξέων με το SARS-CoV (Chan et al., 2020).

2.2 SARS-CoV-2 και η παθογένειά του στην άγρια ζωή

Οι νυχτερίδες είναι σημαντικοί φυσικοί ξενιστές των αλφα-κορονοϊών και των βήτα-κορονοϊών. Ο πλησιέστερος συγγενής με τον SARS-CoV-2 που είναι γνωστός μέχρι σήμερα είναι ένας κορονοϊός νυχτερίδας που ανιχνεύθηκε στο *Rhinolophus affinis* από την επαρχία Γιουχάν της Κίνας, με το όνομα «RaTG13», του οποίου η αλληλουχία γονιδιώματος πλήρους μήκους είναι 96,2% ίδια με αυτή του SARS-CoV-2. Αυτός ο ιός της νυχτερίδας μοιράζεται περισσότερο από 90% ομοιότητα στην αλληλουχία με τον SARS-CoV-2 σε όλα τα ORF σε όλο του το γονιδίωμα, συμπεριλαμβανομένων των μεταβλητών S πρωτεϊνών και ORF8 (P. Zhou et al., 2020). Η φυλογενετική ανάλυση επιβεβαιώνει ότι ο SARS-CoV-2 μοιάζει πολύ με το RaTG13 (Εικόνα 2.1), η υψηλή αυτή γενετική ομοιότητα μεταξύ του SARS-CoV-2 και του RaTG13 ,υποστηρίζει την υπόθεση ότι ο SARS-CoV-2 πιθανότατα προήλθε από νυχτερίδες (Paraskevis et al., 2020).



Εικόνα 2.1 Φυλογενετικό δέντρο αλληλουχιών γονιδιώματος SARS-COV-2 και άλλων βήτα-κορονοϊών. Η κατασκευή έγινε με τη μέθοδο γειτονικής ένωσης με χρήση του προγράμματος MEGA6 με τις τιμές bootstrap να υπολογίζονται από 1.000 δέντρα. Το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο κορονοϊός 2 (SARS-CoV-2) έχει μεγάλη συγγένεια με ιούς σε νυχτερίδες και παγκολίνους και μαζί με τον SARS-CoV και τους σχετιζόμενους με το SARS κορονοϊούς νυχτερίδων (SARSr-CoVs) σχηματίζουν τους σαρμπεκοϊούς. Οι αλληλουχίες λήφθηκαν από τη βάση δεδομένων GISAID και την GenBank. [Nat Rev Microbiol. 2021; 19(3): 141–154.]

Ένας άλλος σχετικός κορονοϊός έχει αναφερθεί πιο πρόσφατα σε μια νυχτερίδα *Rhinolophus malayanus* που έγινε δείγμα στη Γιουχάν. Αυτός ο νέος ιός της νυχτερίδας, που ονομάζεται «RmYN02», είναι 93,3% πανομοιότυπος με τον SARS-CoV-2 σε όλο το γονιδίωμα. Στο μακρύ γονίδιο 1ab, εμφανίζει 97,2% ταυτότητα με τον SARS-CoV-2, το οποίο είναι ακόμη υψηλότερο από το γονιδίωμα του RaTG13 (H. Zhou et al., 2020).

Εκτός από τα RaTG13 και RmYN02, η φυλογενετική ανάλυση δείχνει ότι οι κορονοϊοί νυχτερίδων ZC45 και ZXC21 που είχαν ανιχνευθεί προηγουμένως σε νυχτερίδες *Rhinolophus pusillus* από την ανατολική Κίνα ανήκουν επίσης στη γενεαλογία SARS-

CoV-2 του υπογένους Sarbecovirus (Εικόνα 2.1) (Hu et al., 2018). Η ανακάλυψη διαφορετικών κορονοϊών νυχτερίδων που σχετίζονται στενά με τον SARS-CoV-2 υποδηλώνει ότι οι νυχτερίδες είναι πιθανές δεξαμενές του SARS-CoV-2 (Lau et al., 2020).

Πέρα από τις νυχτερίδες, οι παγκολίνοι είναι ένας άλλος ξενιστής που ανήκει στα ζώα άγριας ζωής που πιθανώς συνδέεται με τον SARS-CoV-2. Πολλαπλοί ιοί που σχετίζονται με τον SARS-CoV-2 έχουν εντοπιστεί σε ιστούς παγκολίνων της Μαλαισίας που εισήχθησαν λαθραία από τη Νοτιοανατολική Ασία στη νότια Κίνα από το 2017 έως το 2019. Τα στελέχη Guangdong, τα οποία απομονώθηκαν ή αλληλουχήθηκαν από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες από λαθρεμπορείους παγκολίνους, έχουν 99,8% ομοιότητα στην αλληλουχία μεταξύ τους (P. Liu et al., 2019) και σχετίζονται πολύ στενά με τον SARS-CoV-2, παρουσιάζοντας 92,4% ομοιότητα στην μεταξύ τους αλληλουχία. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι το RBD των κορονοϊών παγκολίνου του Guangdong είναι πολύ παρόμοιο με αυτό του SARS-CoV-2. Το μοτίβο δέσμησης υποδοχέα (RBM, το οποίο είναι μέρος του RBD) αυτών των ιών έχει μόνο μία παραλλαγή αμινοξέων συγκριτικά με τον SARS-CoV-2 (Xiao et al., 2020). Η επαναλαμβανόμενη εμφάνιση λοιμώξεων από κορονοϊό που σχετίζονται με το SARS-CoV-2 σε παγκολίνους που προέρχονται από διαφορετικά είδη λαθρεμπορίου υποδηλώνει ότι αυτά τα ζώα είναι πιθανοί ξενιστές των ιών. Ωστόσο, σε αντίθεση με τις νυχτερίδες, οι οποίες μεταφέρουν κορονοϊούς χωρίς να νοσούν, οι μολυσμένοι παγκολίνοι εμφάνισαν κλινικά συμπτώματα και ιστοπαθολογικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένης της διάμεσης πνευμονίας και της φλεγμονώδους κυτταρικής διήθησης σε διάφορα όργανα. Αυτές οι ανωμαλίες υποδηλώνουν ότι οι παγκολίνοι είναι απίθανο να είναι η δεξαμενή αυτών των κορονοϊών, αλλά είναι πιο πιθανό να απέκτησαν τους ιούς μετά από διάχυση από τους φυσικούς ξενιστές.

2.3 Ο ρόλος του ενδιάμεσου ξενιστή στον SARS-CoV-2

Ένας ενδιάμεσος ξενιστής παίζει συνήθως σημαντικό ρόλο στο ξέσπασμα των αναδυόμενων κορονοϊών που προέρχονται από νυχτερίδες. Για παράδειγμα, η Ασιατική μοσχογάλη για τον SARS-CoV και οι καμήλες dromedary για τον MERS-CoV. Τα στελέχη του ιού που μεταφέρθηκαν από αυτούς τους δύο ενδιάμεσους ξενιστές ήταν σχεδόν γενετικά πανομοιότυπα με τους αντίστοιχους ιούς στον άνθρωπο (πάνω

από 99% ομοιότητα αλληλουχίας του γονιδιώματος). Μέχρι στιγμής, κανένα στοιχείο δεν έχει δείξει ότι οι παγκολίνοι συμμετείχαν άμεσα στην εμφάνιση του SARS-CoV-2, επίσης οι γνώσεις μας σχετικά με τη ζωική προέλευση του SARS-CoV-2 παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ελλιπείς έως και σήμερα. Οι δεξαμενές ξενιστές του ιού δεν έχουν αποδειχθεί με σαφήνεια. Δεν είναι γνωστό εάν ο SARS-CoV-2 μεταδόθηκε στους ανθρώπους μέσω ενός ενδιάμεσου ξενιστή και ποια ζώα μπορεί να λειτουργήσουν ως ενδιάμεσος ξενιστής του. Η ανίχνευση των κορωνοϊών RaTG13, RmYN02 και παγκολίνου υποδηλώνει ότι στην άγρια ζωή κυκλοφορούν διάφοροι κορωνοϊοί παρόμοιοι με τον SARS-CoV-2. Επιπλέον, καθώς προηγούμενες μελέτες έδειξαν τον ανασυνδυασμό ως πιθανή προέλευση ορισμένων σαρμπεκοϊών όπως ο SARS-CoV, δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι ο ανασυνδυασμός ιικού RNA μεταξύ διαφορετικών κοροναϊών συμμετείχε στην εξέλιξη του SARS-CoV-2. Η συνεχής και ενδεδειγμένη παρατήρηση των ιών που σχετίζονται με τον SARS-CoV-2 στην Κίνα, τη Νοτιοανατολική Ασία και άλλες περιοχές με στόχο νυχτερίδες, άγριους και αιχμαλωτισμένους παγκολίνους και άλλα είδη άγριας ζωής θα μας βοηθήσει να κατανοήσουμε καλύτερα τη ζωνοσογόνο προέλευση του SARS-CoV-2. Εκτός από την άγρια ζωή, οι ερευνητές ερεύνησαν την ευαισθησία των εξημερωμένων και εργαστηριακών ζώων στη μόλυνση από SARS-CoV-2. Η μελέτη έδειξε πειραματικά ότι ο SARS-CoV-2 αναπαράγεται αποτελεσματικά σε γάτες και στην ανώτερη αναπνευστική οδό των κουναβιών, ενώ οι σκύλοι, οι χοίροι, τα κοτόπουλα και οι πάπιες δεν ήταν ευαίσθητα στον SARS-CoV-2 (Shi et al., 2020). Τόσο οι ιολογικές όσο και οι ορολογικές δοκιμές βρήκαν στοιχεία για φυσική μόλυνση από SARS-CoV-2 σε δύο σκύλους από νοικοκυριά με ανθρώπινα κρούσματα COVID-19 στο Χονγκ Κονγκ, αλλά οι σκύλοι φάνηκαν ασυμπτωματικοί (C Sit et al., 2020).

2.4 Δομή και δράση του SARS-CoV-2

Οι δομικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών της ακίδας (Spike), του φακέλου (Envelope), της μεμβράνης (Membrane) και των πρωτεϊνών νουκλεοκαψιδίου (Nucleocapsid), διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των ιών, καθώς και στη συγκρότηση και τη δομή του ιού (Weiss & Leibowitz, 2011). Η γλυκοπρωτεΐνη S έχει πολύ ισχυρή επίδραση στον παθογόνο φαινότυπο του ιού και έχει επιβεβαιωθεί ότι είναι η κύρια πρωτεΐνη που μεσολαβεί στη δέσμευση του SARS-

CoV-2 στον υποδοχέα ACE2 των κυττάρων-ξενιστών και προκαλεί τη σύντηξη της μεμβράνης, η οποία διαδραματίζει βασικό ρόλο στην είσοδο του ιού στα κύτταρα (Walls et al., 2020),(Lan et al., 2020). Η πρωτεΐνη S είναι ο πρωταρχικός στόχος των εξουδετερωτικών αντισωμάτων (Abs) και αποτελεί το επίκεντρο της θεραπείας και της ανάπτυξης των εμβολίων. Στον SARS-CoV, η πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου (N) συνδέεται με το ιικό RNA και συμμετέχει στην αντιγραφή του ιού, η πρωτεΐνη (M) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση της ιικής δομής, στο σχηματισμό του φακέλου, καθώς και στην εκβλάστηση και απελευθέρωση του ιού. Για την πρωτεΐνη (E) έχει αποδειχθεί ότι ένας τομέας της έχει λοιμογόνο δράσης που ενεργοποιεί την ανοσοπαθολογία στη μόλυνση από SARS-CoV (Jimenez-Guardeño et al., 2014). Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι η πορεία της λοίμωξης περνά από τα ακόλουθα στάδια: Πρώτον, ο ιός εισέρχεται στα κύτταρα-ξενιστές, όπου αναδιπλασιάζεται, συναρμολογείται και απελευθερώνεται εξωκυτταρικά στα κύτταρα-στόχους, και αυτό προκαλεί άμεσα τη βλάβη και την καταστροφή των παρεγχυματικών κυττάρων όπως τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα, ακολουθεί η απορρύθμιση της ανοσοαπόκρισης, έχουμε πολλαπλή βλάβη οργάνων και τελικά οδηγούμαστε στην ανάρρωση (Weiss & Leibowitz, 2011),(Millet & Whittaker, 2015; Navas-Martín & Weiss, 2004; Skariyachan et al., 2019; van den Brand et al., 2015).

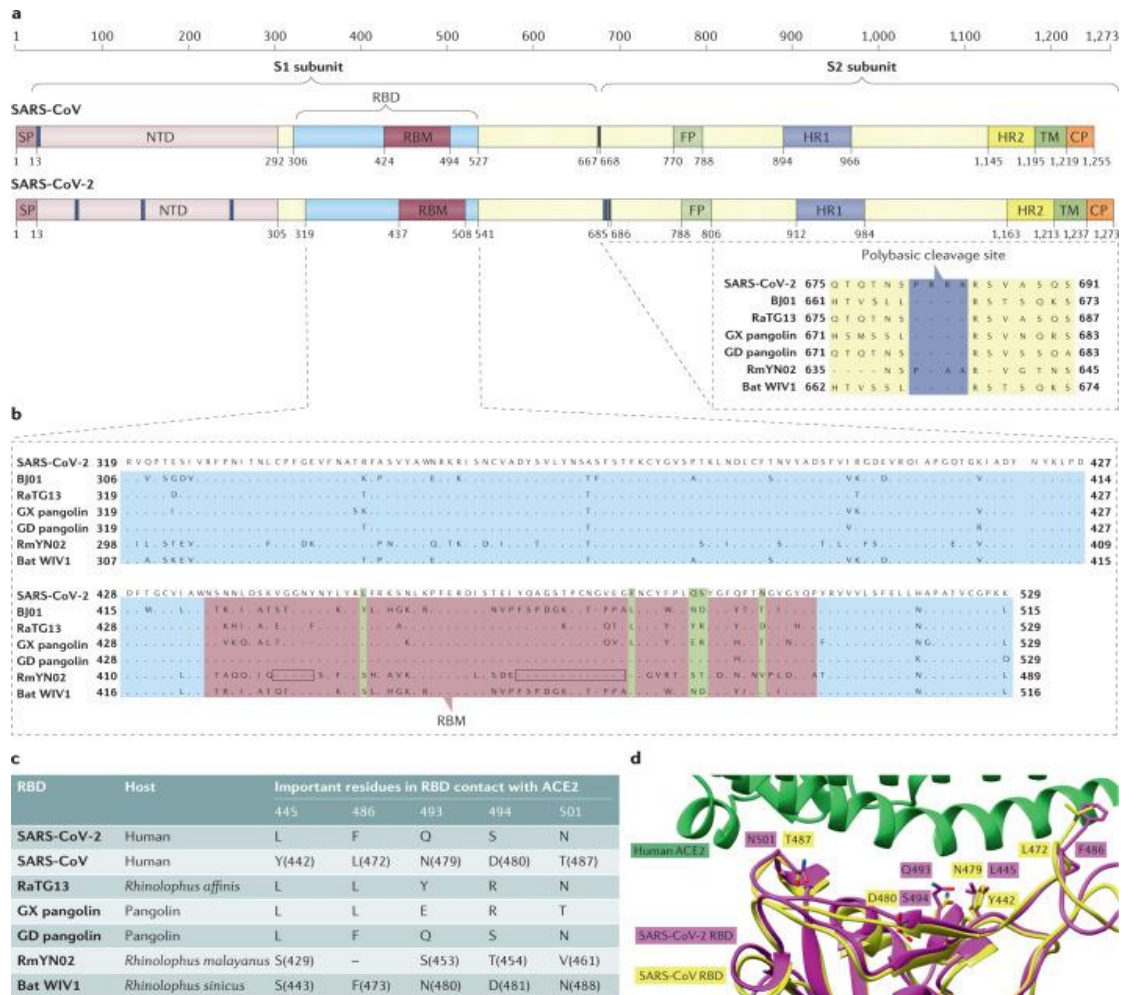
2.5 Υποδοχείς SARS-CoV2 και παθογένεια

2.5.1 Υποδοχέας ACE2 και ο ρόλος του στην μόλυνση από SARS-Cov-2

Εκτός από το ανθρώπινο ACE2 (hACE2), ο SARS-CoV-2 αναγνωρίζει επίσης το ACE2 από χοίρο, κουνάβι, πίθηκο, γάτα, παγκολίνο, κουνέλι και σκύλο.

Ο SARS-CoV-2 χρησιμοποιεί τον ίδιο υποδοχέα με τον SARS-CoV, το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) (H. Zhou et al., 2020),(Hoffmann et al., 2020). (Shi et al., 2020),(Chandrashekar et al., n.d.),(Zhao et al., 2020). Η ευρεία χρήση υποδοχέα του SARS-CoV-2 υποδηλώνει ότι μπορεί να έχει ευρύ φάσμα ξενιστών και η ποικίλη αποτελεσματικότητα της χρήσης του ACE2 σε διαφορετικά ζώα, μπορεί να υποδεικνύει τη διαφορετική ευαισθησία τους στη μόλυνση από SARS-CoV-2. Η

υπομονάδα S1 ενός κορονοϊού διαιρείται περαιτέρω σε δύο λειτουργικές περιοχές, έναν N-τερματικό τομέα και έναν C-τερματικό τομέα. Οι δομικές και βιοχημικές αναλύσεις εντόπισαν μια περιοχή 211 αμινοξέων (αμινοξέα 319–529) στην C-τελική περιοχή S1 του SARS-CoV-2 ως RBD, η οποία έχει βασικό ρόλο στην είσοδο του ιού και είναι ο στόχος εξουδετέρωσης αντισωμάτων (Shang, Ye, et al., 2020),(Walls et al., 2020) (Εικόνα 2.2α).



Εικόνα 2.2 α | Σχηματικό διάγραμμα της πρωτεΐνης ακίδας (S) του SARS-CoV και του SARS-CoV-2. Οι αριθμοί υπολειμμάτων κάθε περιοχής αντιστοιχούν στις θέσεις τους στις πρωτεΐνες S του SARS-CoV και του SARS-CoV-2. Τα σκούρα μπλε μπλοκ αντιπροσωπεύουν εισαγωγές στην πρωτεΐνη S. Οι εισαγωγές στα αμινοξέα 675-691 της πρωτεΐνης SARS-CoV-2 φαίνονται σε μεγέθυνση κάτω δεξιά και ευθυγραμμίζονται με εκείνες άλλων κοροναϊών στην ίδια περιοχή. β | Ευθυγράμμιση του τομέα δέσμευσης υποδοχέα (RBD) σε SARS-CoV-2, SARS-CoV BJ01, RaTG13, κορωνοϊός παγκολίνου που αναφέρθηκε από το Guangdong της Κίνας, καθώς και άλλα είδη κορονοϊών. Το μοτίβο δέσμευσης υποδοχέα (RBM) εμφανίζεται με μωβ και τα πέντε βασικά υπολείμματα που έρχονται σε άμεση επαφή με το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) επισημαίνονται με πράσινο χρώμα. γ | Πέντε κρίσιμα υπολείμματα στο RBD του SARS-CoV-2 και άλλων ιών. δ | Σύγκριση της δομής του SARS-CoV-2 και του SARS-CoV RBD συμπλεγμένου με ανθρώπινο ACE2 (hACE2). SARS-CoV-2 RBM σε μωβ, SARS-CoV RBM σε κίτρινο και hACE2 σε πράσινο. Δείχνονται πέντε κρίσιμα υπολείμματα που εμπλέκονται στη δέσμευση RBM-ACE2. Οι κωδικοί της Τράπεζας Δεδομένων Πρωτεϊνών είναι 2AJF για SARS-CoV

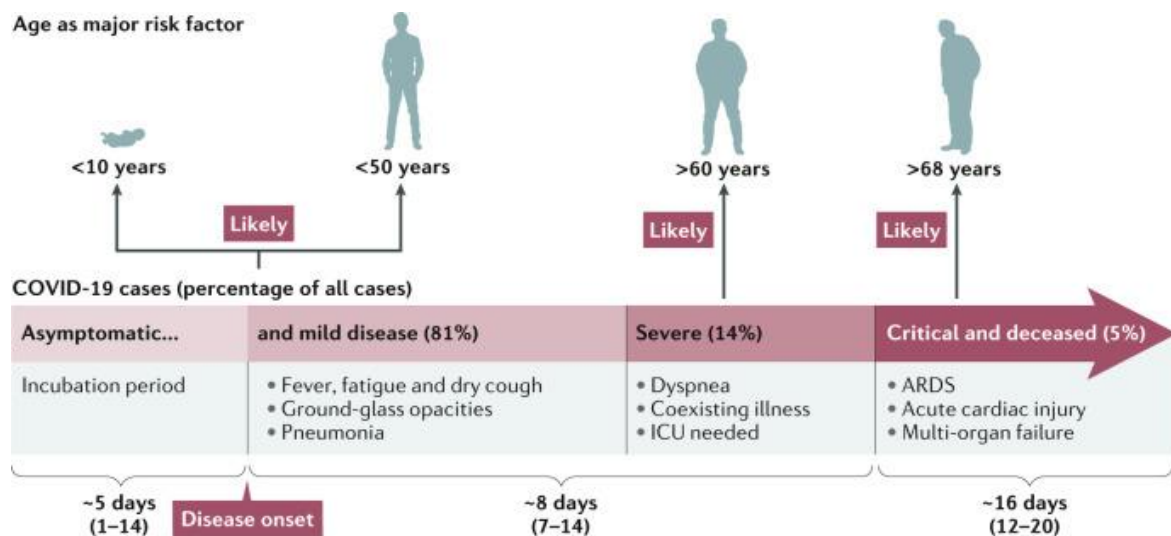
RBD-hACE2 και 6VW1 για SARS-CoV-2 RBD-hACE2. Οι εγγραφές της GenBank είναι AY278488 για SARS-CoV BJ01, MN996532 για τη νυχτερίδα SARS-CoV RaTG13, MT121216 και MT072864 για τους κορονοϊούς GD παγκολίνος και GX παγκολίνος, και KF367457 για τους κορονοϊούς παγκολίνου GD και GX, αντίστοιχα, και KF367457. CP=κυτταροπλασματική περιοχή, FP=πεπτικό σύντηξης, HR1= επταδική επανάληψη 1, HR2= επταδική επανάληψη 2, NTD=N-τερματικό πεδίο, SP=πεπτικό σήματος, TM=διαμεμβρανική περιοχή. [Nat Rev Microbiol. 2021; 19(3): 141–154.]

Το RBM μεσολαβεί στην επαφή με τον υποδοχέα ACE2 (αμινοξέα 437-507 της πρωτεΐνης SARS-CoV-2 S) και αυτή η περιοχή στον SARS-CoV-2 διαφέρει από αυτή στον SARS-CoV στα πέντε κρίσιμα υπολείμματα για τη δέσμευση του ACE2, συγκεκριμένα τα σημεία είναι τα Y455L, L486F, N493Q, D494S και T501N52 (Εικόνα 2.2 b,c). Λόγω αυτών των αλλαγών στα υπολείμματα, η αλληλεπίδραση του SARS-CoV-2 με τον υποδοχέα του σταθεροποιεί τα δύο σημαντικά σημεία που δεσμεύουν τον ιό στην επιφάνεια του hACE2 (Εικόνα 2.2 d),(Wan et al., 2020). Τα βιοχημικά δεδομένα επιβεβαίωσαν ότι τα δομικά χαρακτηριστικά του SARS-CoV-2 RBD έχουν ενισχύσει τη συγγένεια δέσμευσης του hACE2 σε σύγκριση με αυτή του SARS-CoV (Shang, Ye, et al., 2020),(Wan et al., 2020),(Letko et al., 2020). Ομοίως με άλλους κορονοϊούς, ο SARS-CoV-2 χρειάζεται πρωτεολυτική επεξεργασία της πρωτεΐνης S για να ενεργοποιήσει την ενδοκυτταρική οδό. Έχει αποδειχθεί ότι οι πρωτεάσες του ξενιστή συμμετέχουν στη διάσπαση της πρωτεΐνης S και ενεργοποιούν την είσοδο του SARS-CoV-2, συμπεριλαμβανομένης της διαμεμβρανικής πρωτεάσης σερινοπρωτεάσης 2, της καθεψίνης L και της φουρίνης (Hoffmann et al., 2020),(Ou et al., 2020),(Shang, Wan, et al., 2020).

2.5.2 Η παθογένεια του SARS-CoV-2

Η παθογένεση της λοίμωξης SARS-CoV-2 στους ανθρώπους εκδηλώνεται με ήπια συμπτώματα έως σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια. Όταν δεσμεύεται με επιθηλιακά κύτταρα στην αναπνευστική οδό, ο SARS-CoV-2 αρχίζει να αναπαράγεται και να μεταναστεύει στους αεραγωγούς και να εισέρχεται στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα στους πνεύμονες. Η ταχεία αναπαραγωγή του SARS-CoV-2 στους πνεύμονες μπορεί να προκαλέσει ισχυρή ανοσολογική απόκριση. Το σύνδρομο καταιγίδας κυτοκινών προκαλεί σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας και αναπνευστικής ανεπάρκειας, που θεωρείται η κύρια αιτία θανάτου σε ασθενείς με COVID-19 (C. Huang et al., 2020),(Mehta et al., 2020). Ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας

(>60 ετών) και με σοβαρές προ-υπάρχουσες ασθένειες έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης συνδρόμου οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας και θανάτου (C. Wu et al., 2020),(Y. Liu et al., 2020),(Tian et al., 2020). Τα τυπικά συμπτώματα της νόσου του κορονοϊού 2019 (COVID-19) είναι ο πυρετός, ο ξηρός βήχας, η κόπωση και σε σοβαρότερες περιπτώσεις η δύσπνοια. Πολλές λοιμώξεις, ιδίως σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες, είναι ασυμπτωματικές, ενώ οι ηλικιωμένοι ή και τα άτομα με συννοσηρότητες διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο σοβαρής νόσου, αναπνευστικής ανεπάρκειας και θανάτου. Η περίοδος επώασης υπολογίζεται ότι είναι περίπου 5 ημέρες, η σοβαρή νόσος αναπτύσσεται συνήθως σε διάστημα 8 ημερών μετά την έναρξη των συμπτωμάτων και η κρίσιμη ασθένεια και ο θάνατος συμβαίνουν σε διάστημα 16 ημερών (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3 Κλινικά χαρακτηριστικά του COVID-19. [Nat Rev Microbiol. 2021; 19(3): 141–154.]

Σε ορισμένες περιπτώσεις COVID-19 έχει παρατηρηθεί πολλαπλή οργανική ανεπάρκεια (Z. Wu & McGoogan, 2020),(N. Chen et al., 2020),(Xiaohong et al., 2020). Οι ιστοπαθολογικές αλλαγές σε ασθενείς με COVID-19 συμβαίνουν κυρίως στους πνεύμονες και συγκεκριμένα οι ιστοπαθολογικές αναλύσεις έδειξαν αμφίπλευρη διάχυτη φατνιακή βλάβη, σχηματισμό υαλώδους μεμβράνης, επιθηλιακή απολέπιση πνευμονοκυττάρων και εναποθέσεις ινών στους πνεύμονες ασθενών με COVID-19. Επιπρόσθετα οι δοκιμές Ανοσοϊστοχημείας που πραγματοποιήθηκαν , ανίχνευσαν αντιγόνο SARS-CoV-2 στον ανώτερο αεραγωγό, στο βρογχιολικό επιθήλιο και στο

επιθήλιο του υποβλεννογόνιου αδένου, καθώς και σε πνευμονοκύτταρα τύπου I και τύπου II, κυψελιδικά μακροφάγα και υαλώδεις μεμβράνες στους πνεύμονες (C. Huang et al., 2020),(N. Chen et al., 2020),(Martines et al., 2020),(Zeng et al., 2020). Ωστόσο, είναι ακόμα ασαφές εάν αυτές οι επιπλοκές προκύπτουν από τις κυτταροπαθητικές επιδράσεις του ιού SARS-CoV-2 ή οφείλονται σε υποξία που σχετίζεται με την αναπνευστική ανεπάρκεια. Εξάλλου, ο ρόλος των συννοσηροτήτων στην παθογένεση των μηχανισμών ασθένειας και θανάτου στον COVID-19 δεν μπορεί να αποκλειστεί εντελώς. Εάν η σοβαρότητα της λοίμωξης εξελιχθεί σε συστηματική φλεγμονώδη φάση, ο μηχανισμός με το οποίο δρα ο ιός, είναι πιθανότατα ένας πολύπλοκος συνδυασμός του ιού που εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και μολύνει άλλα κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς ACE2. Επιπλέον, σε σοβαρές περιπτώσεις COVID-19, ενεργοποιούνται τα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs), τα οποία εκφράζουν επίσης υποδοχείς ACE2, οδηγώντας σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και πιθανό τραυματισμό που έχει ως αποτέλεσμα κλινικές εκδηλώσεις, όπως η πήξη και η προθρομβωτική τάση (Libby & Lüscher, 2020). Καθώς οι θρομβωτικές επιπλοκές είναι συχνά θανατηφόρες, η πήξη θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη μαζί με την αναπνευστική ανεπάρκεια ως την πιο σημαντική πτυχή της παθογένεσης του COVID-19. Θρομβωτικές επιπλοκές, συμπεριλαμβανομένης της φλεβικής και αρτηριακής θρόμβωσης, της θρομβοεμβολής και της διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης, είναι γνωστό ότι αναπτύσσονται στο ένα τρίτο των βαρέως πασχόντων ασθενών με COVID-19 στη μονάδα εντατικής θεραπείας (Klok et al., 2020). Παρατηρήθηκε ότι η έντονη υπερπηκτικότητα και η διαταραχή του ενδοθηλίου αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νόσου COVID19 για την οποία έχει σημειωθεί σταθερά υψηλό ποσοστό φλεβικής θρομβοεμβολής ιδιαίτερα σε ασθενείς με κρίσιμες ασθένειες στις ΜΕΘ (Cugno et al., 2020; Klok et al., 2020; Middeldorp et al., 2020; Panigada et al., 2020; Poissy et al., 2020).

2.6 Η νόσος covid-19 και η συσχέτισή της με τον von Willebrand Factor και το ADAMTS13

Για την διερεύνηση του μηχανισμού μικροθρόμβωσης στην εξέλιξη του COVID-19 είναι σημαντικό να αξιολογηθούν το αντιγόνο του παράγοντα Von Willebrand (VWF:Ag), ο συμπαράγοντας ριστοσεΐνης (VWF:RCo), τα πολυμερή VWF, το

προπεπτίδιο VWF(VWFpp) και η δραστηριότητα του γονιδίου ADAMTS13. Ο VWF είναι υψίστης σημασίας τόσο για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στις υποενδοθηλιακές ίνες κολλαγόνου όσο και για τη συσσώρευση αιμοπεταλίων υπό υψηλή διάτμηση . Ο VWF απελευθερώνεται στην κυκλοφορία από τα ενδοθηλιακά κύτταρα με την μορφή υπερδραστήριων υπερμεγεθών πολυμερών VWF (ULVWFMs > 10,000 kDa). Το ADAMTS13 ελέγχει τη διάσπαση και τη ρύθμιση των ULVWFMs με αποτέλεσμα μια ισορροπημένη κατανομή μεταξύ VWF χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού < 10,000 kDa (Lillicrap, 2013). Η μικροθρόμβωση, ιδιαίτερα στους πνεύμονες, είναι πλέον χαρακτηριστικό του COVID-19 (Woywodt et al., 2006) και επομένως ο ρόλος του VWF στην πρωτοπαθή αιμόσταση είναι ουσιαστικός, μεσολαβώντας στην προσκόλληση και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων στα σημεία της αγγειακής βλάβης (Ruggeri, 2003). Ο VWF είναι επίσης δείκτης ενεργοποίησης του ενδοθηλίου, που απελευθερώνεται μαζί μετά από αγγειακή βλάβη που προκαλείται από φλεγμονή. Τα πολυμερή VWF ρυθμίζονται σε μέγεθος από το ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin 1 Motif , number 13), η σοβαρή ανεπάρκεια του οποίου (δραστηριότητα κάτω από 10 IU/dL) είναι διαγνωστική για τη θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (TTP), μια σοβαρή και απειλητική θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια που προκαλείται από τη συσσώρευση υπερκινητικών υπερμεγάλων πολυμερών VWF (Lip & Blann, 1997),(Scully et al., 2017),(Sadler, 2017). Τα μειωμένα επίπεδα αυτής της μεταλλοπρωτεάσης έχουν αναφερθεί ότι αποτελούν παράγοντα κινδύνου για θρόμβωση σε ασθενείς με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο και έμφραγμα του μυοκαρδίου (Sonneveld et al., 2015),(Maino et al., 2015). Σε σοβαρή νόσο COVID-19, έχει περιγραφεί παθολογική υπερπαραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών (που ονομάζεται καταιγίδα κυτοκινών). Η επακόλουθη συστηματική υπερφλεγμονή είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες επιζήμιες συνέπειες της νόσου (G. Chen et al., 2020). Παράλληλα με τις προφλεγμονώδεις αλλαγές, υπάρχει επίσης μια προθρομβωτική κατάσταση, η οποία υποδηλώνεται από αυξημένο κίνδυνο θρομβωτικών επεισοδίων και από χαρακτηριστικές αλλαγές στις εργαστηριακές παραμέτρους, όπως αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου και D-διμερούς (Helms et al., 2020; Levi et al., 2020; Yue et al., 2020; F. Zhou et al., 2020). Άλλοι παράμετροι που επίσης επηρεάζονται είναι η συγκέντρωση του παράγοντα von Willebrand (VWF) η οποία φαίνεται να είναι αυξημένη (Escher et al., 2020a, 2020b;

Rauch et al., 2020) , ενώ η δραστηριότητα μιας (ADAMTS13) μεταλλοπρωτεάσης— υπεύθυνη για τη διάσπαση πολύ μεγάλων VWF —μειώνεται (Bazzan et al., 2020; *Involvement of ADAMTS13 and von Willebrand Factor in Thromboembolic Events in Patients Infected with SARS-CoV-2*, 2020; Martinelli et al., 2020; Tiscia et al., 2020) και έτσι έχουμε σαν αποτέλεσμα την ανισορροπία του άξονα VWF-ADAMTS13 (Delrue et al., 2021; *Involvement of ADAMTS13 and von Willebrand Factor in Thromboembolic Events in Patients Infected with SARS-CoV-2*, 2020; Mancini et al., 2021) η οποία συσχετίστηκε με υψηλότερη σοβαρότητα και θνησιμότητα του COVID-19 (Tiscia et al., 2020),(Favaloro et al., 2021; Philippe et al., 2021; Rodríguez Rodríguez et al., 2021; Sweeney BS et al., 2020; von Meijenfeldt et al., 2020a). Έτσι, η παρουσία χαμηλού ADAMTS13 σε συνδυασμό με υψηλό VWF μπορεί να αντιπροσωπεύει μια «διπλή προσβολή» που οδηγεί σε μια αυξημένη κατάσταση υπερπηκτικότητας και επίσης σε ένα φαινόμενο παρόμοιο με TMA- θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια, που αρχικά εντοπίζεται στον πνεύμονα, αλλά τελικά εξαπλώνεται συστηματικά, οδηγώντας σε βλάβη των τελικών οργάνων. Τα αυξημένα επίπεδα D-dimer είναι η πιο συχνά ανιχνευόμενη ανωμαλία πήξης στον COVID-19 και συγκεκριμένα σε σοβαρή μορφή COVID-19, τα αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου έχουν βρεθεί ότι παρουσιάζουν μια προθρομβωτική κατάσταση που οδηγεί σε θρόμβωση και αποτελεί προγνωστικό παράγοντα θνησιμότητας (Rostami & Mansouritorghabeh, 2020; Zhang et al., 2020). Το διαμεμβρανικό ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) επιτρέπει στον SARS-CoV-2 να εισβάλει στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα καθώς και στα ενδοθηλιακά κύτταρα στις αρτηρίες και τις φλέβες. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι μια πηγή σωματών αποθήκευσης Weibel-Palade που απελευθερώνουν προθρομβωτικούς μεσολαβητές όπως ο παράγοντας von Willebrand (VWF) και ο παράγοντας πήξης VIII (McFadyen et al., 2020). Τα ηπατικά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν ADAMTS-13, μια δισεντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεάση με μοτίβο θρομβοσπονδίνης τύπου 1. Διασπά πολύ μεγάλα πολυμερή του VWF, μειώνει την έκταση της θρομβογονικότητας του VWF και αποκαθιστά την ισορροπία στο σύστημα αιμόστασης . Δεδομένου ότι το επίπεδο ADAMTS-13 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη θρόμβωσης, θεωρείται προγνωστικός παράγοντας θνησιμότητας σε ασθενείς με COVID-19 (Bazzan et al., 2020)

2.6.1 Η νόσος Covid-19 σε συνδυασμό με την παρουσία της TTP

Οι μικροθρόμβοι αποτελούν συχνή κλινική εμφάνιση στον COVID-19, με συχνότητα εμφάνισης 91,3% σε αποθανόντες ασθενείς με COVID-19 (W. Chen & Pan, 2021). Οι θρομβωτικές μικροαγγειοπάθειες είναι παθήσεις πήξης που εκδηλώνονται με αιμολυτική αναιμία και θρομβοπενία, η παθοφυσιολογία των παθήσεων αυτών οφείλεται στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Οι θρομβωτικές μικροαγγειοπάθειες χωρίζονται σε πρωτογενείς και δευτερογενείς (Htet & Karim, 2020; Zipfel et al., 2010). Οι πρωτογενείς είναι αποτέλεσμα της γενετικά εγγενούς ανεπάρκειας ενός ή περισσοτέρων παραγόντων, για παράδειγμα η ανεπάρκεια πρωτεϊνών που ρυθμίζουν το συμπλήρωμα στο ουραιμικό σύνδρομο ή η πρωτογενής ανεπάρκεια ADAMTS13 στην πρωτοπαθή θρομβοπενική πορφύρα.

Οι δευτερογενείς μορφές προκύπτουν από εξωγενείς παράγοντες όπως είναι οι αυτοάνοσες διαταραχές, τα φάρμακα, η μεταμόσχευση μυελού των οστών, η εγκυμοσύνη, οι οποίοι οδηγούν σε επίκτητη έναρξη της πάθησης όπως είναι η επίκτητη πρωτοπαθή θρομβοπενική πορφύρα, το σύνδρομο HELLP ή το καταστροφικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο-APS (George et al., 2015).

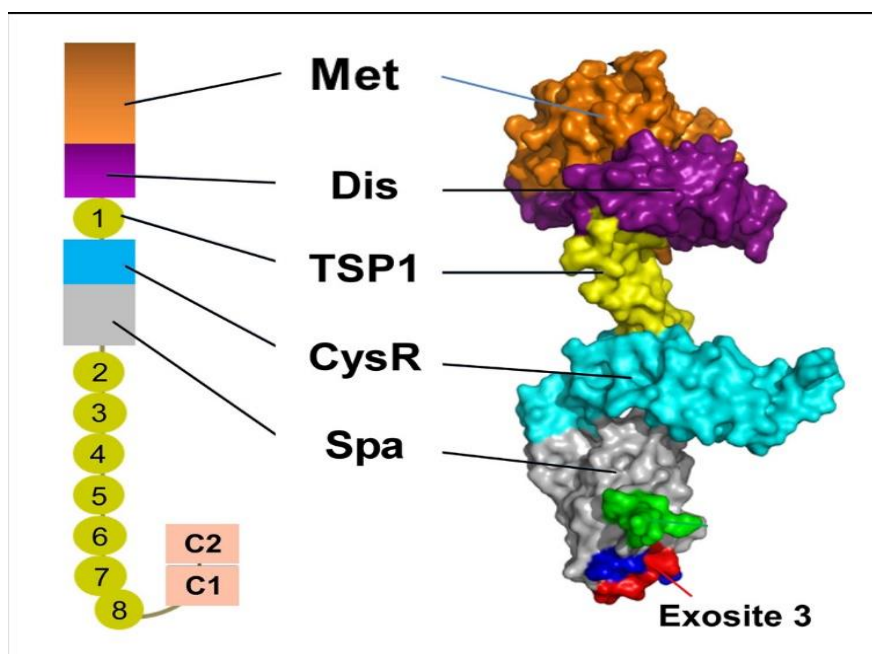
Κατά αυτόν τον τρόπο, η υπερπηκτικότητα είναι βασικό χαρακτηριστικό της φλεγμονής στο COVID-19. Αυτό συμβαίνει γιατί οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες οδηγούν σε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και επίσης σε καταρράκτη πήξης στον οποίο εμφανίζεται θρόμβωση (Bester & Pretorius, 2016).

3.Εργαστηριακά ευρήματα ADAMTS13

3.1 Δομή και λειτουργία ADAMTS13

Από την απομόνωση και την κλωνοποίηση του cDNA της μεταλλοπρωτεάσης ADAMTS13, αρκετά εργαστήρια έχουν καταφέρει να εκφράσουν ανασυνδυασμένο ADAMTS13 σε κυτταρική καλλιέργεια. Το ανασυνδυασμένο ADAMTS13 διασπά τον VWF in vitro, παρέχοντας επίσημη απόδειξη ότι η ADAMTS13 είναι πράγματι η πρωτεάση διάσπασης του VWF που εντοπίστηκε σε προηγούμενες μελέτες (Kokame et al., 2002; Plaimauer et al., 2002). Το ADAMTS13 είναι μια κυκλοφορούσα μεταλλοπρωτεάση της οικογένειας ενζύμων «μιας δισιντεγκρίνης και μεταλλοπρωτεάσης με τομέα θρομβοσπονδίνης τύπου 1» που διασπά τον παράγοντα von Willebrand Factor (VWF) του πλάσματος στον πεπτιδικό δεσμό του

Y1605-M1606 . Το γονίδιο ADAMTS13 περιέχει 29 εξόνια που εκτείνονται περίπου σε 37 kb στο χρωμόσωμα 9q34 (Soejima et al., 2001). Το ADAMTS13 κωδικοποιεί ένα αντίγραφο 4,7 kb που είναι ανιχνεύσιμο στο ήπαρ και ένα αντίγραφο 2,4 kb ανιχνεύσιμο στον πλακούντα, στους σκελετικούς μύες και σε ορισμένες κυτταρικές σειρές όγκου. Στο ήπαρ, το ADAMTS13 εκφράζεται κυρίως στα εμπλουτισμένα με βιταμίνη Α αστρικά κύτταρα (Uemura et al., 2005; W. Zhou et al., 2005). Επιπλέον, αρκετές ομάδες έχουν προχωρήσει στην εκτέλεση αναλύσεων της δομής-λειτουργίας του ADAMTS13 για να καθορίσουν τις δομικές απαιτήσεις για τη δραστηριότητά του. Δύο ομάδες έχουν διερευνήσει τις επιδράσεις των C-τερματικών περικοπών στην έκκριση ADAMTS13 και στη δραστηριότητα διάσπασης του VWF (Kokame et al., 2002),(X. Zheng et al., 2003). Το γονίδιο ADAMTS13 μοιράζεται την ίδια βασική δομή σε σχέση με όλες τις πρωτεάσες της οικογένειας ADAMTS. Διαθέτει δηλαδή ένα πεπτιδίο σήματος, ένα προπεπτιδίο, μια μεταλλοπρωτεάση, περιοχή παρόμοια με την δισεντεγκρίνη, μία επανάληψη θρομβοσπονδίνης τύπου 1 η οποία είναι πλούσια σε κυστεΐνη και σε περιοχές διαχωρισμού (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Βασική οργάνωση και κρυσταλλική δομή του ADAMTS13. Αριστερά φαίνεται η οργάνωση του ανθρώπινου ώριμου γονιδίου ADAMTS13, που αποτελείται από μία περιοχή μεταλλοπρωτεάσης (M), μία περιοχή παρόμοια με δισεντεγκρίνη, την πρώτη επανάληψη του TSP1, μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες (Cys) και ένα διαχωριστικό τομέα (Spa). Ακόμη το C-άκρο περιέχει ακόμη 7 επαναλήψεις του TSP1 (2-8) και δύο τομείς C1, C2, οι ίδιες δομές περιγράφονται και στα δεξιά σε κρυσταλλική δομή. [J Thromb Haemost. 2013 Jun; 11(0 1): 11–23.]

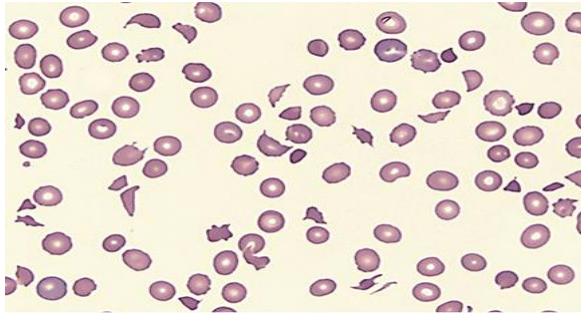
Η περικοπή του ADAMTS13 εντός ή σε απόσταση από το TSP1 έχει ως αποτέλεσμα πρωτεΐνες που διατηρούν τη δραστηριότητα διάσπασης του VWF in vitro, ενώ οι περικοπές κοντά στο TSP1 (εντός των περιοχών πρωτεάσης, TSP1, πλούσιων σε κυστεΐνη ή διαχωριστικών περιοχών) καταλήγουν σε μια ανενεργή πρωτεΐνη. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι αλληλουχίες εντός της περιοχής που καλύπτουν την περιοχή πρωτεάσης έως την περιοχή διαχωρισμού του ADAMTS13 είναι επαρκείς για τη δραστικότητα διάσπασης του VWF, τουλάχιστον in vitro.

Τα εργαστηριακά στοιχεία συνήθως περιλαμβάνουν αιμολυτική αναιμία (σχιστοκύτταρα, αυξημένη έμμεση χολερυθρίνη, μειωμένη απτοσφαιρίνη, αυξημένη γαλακτική αφυδρογονάση) και θρομβοπενία.

Η μέτρηση των επιπέδων της δραστικότητας ADAMTS13, του αναστολέα ADAMTS13 και του αντισώματος ADAMTS13 καθίσταται τυπική για την επιβεβαίωση της διάγνωσης της TTP, για τον προσδιορισμό του εάν είναι συγγενής ή επίκτητη και για τη διάκρισή της από θρομβοπενικές καταστάσεις όπως το αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο, η ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα, και η θρομβοπενία που προκαλείται από ηπαρίνη (George & Al-Nouri, 2012; Imanirad et al., 2012).

Το δείγμα αίματος για την αξιολόγηση των ενδείξεων θρομβοπενίας, μικροαγγειοπαθητικής αιμόλυσης, της δραστηριότητας ADAMTS13 και του τραυματισμού τελικών οργάνων, πρέπει να λαμβάνεται πριν από την έναρξη της θεραπείας με πλάσμα. Οι ασθενείς με TTP παρουσιάζουν σοβαρή θρομβοπενία (αριθμός αιμοπεταλίων συνήθως $<30 \times 10^9/L$), μειωμένη αιμοσφαιρίνη και αιματοκρίτη, σημαντικά αυξημένη γαλακτική αφυδρογονάση (LDH), χαμηλή απτοσφαιρίνη, αυξημένη έμμεση χολερυθρίνη και παρουσία σχιστοκυττάρων στο επίχρισμα περιφερικού αίματος (X. L. Zheng et al., 2004),(Rock et al., 2010). Τα σχιστοκύτταρα σχηματίζονται όταν τα ερυθρά αιμοσφαίρια ταξιδεύουν μέσω του δικτύου VWF-αιμοπεταλίων ή ινώδους, με αποτέλεσμα τη μηχανική καταστροφή τους. Το Διεθνές Συμβούλιο Τυποποίησης στην Αιματολογία (ICSH) συνιστά τα σχιστοκύτταρα να αναφέρονται ως το ποσοστό μετά την καταμέτρηση τουλάχιστον 1.000 ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ένα περιφερικό επίχρισμα (Zini et al., 2012). Τα σχιστοκύτταρα μπορεί να απουσιάζουν στην πρώιμη πορεία της νόσου, αλλά μπορεί να επιμείνουν παρά την κλινική ύφεση (δηλαδή την ομαλοποίηση του αριθμού των αιμοπεταλίων και της LDH) μετά από θεραπεία ανταλλαγής πλάσματος (Egan et al.,

2004) (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2 Επίχρισμα περιφερικού αίματος που δείχνει μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία με πολυάριθμα σχιστοκύτταρα και θρομβοπενία (Wright-Giemsa, x 500). [Heesun J. Rogers et al. CCJM 2016;83:597-603]

3.2 Μεταλλάξεις ADAMTS13 στην οικογενή-συγγενή TTP

Αρκετοί ερευνητές έχουν εξετάσει την επίδραση των σημειακών μεταλλάξεων ADAMTS13 στη σύνθεση και την έκκριση του ADAMTS13 σε κυτταρική καλλιέργεια. Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις φαίνεται να οδηγούν σε πολύ μειωμένη έκκριση ADAMTS13 στο μέσο της κυτταροκαλλιέργειας. Οι λίγες μεταλλάξεις που επιδεικνύουν μικρή ποσότητα έκκρισης ADAMTS13 έχουν επίσης ως αποτέλεσμα την κατάργηση της ενζυμικής δραστηριότητας. Μέχρι σήμερα, δεν έχουν παρατηρηθεί σαφείς συσχετίσεις γονότυπου προς φαινότυπο. Είναι δελεαστικό να υποθέσουμε ότι οι μεταλλάξεις κοντά στο αμινοτελικό άκρο του ADAMTS13 (π.χ. μια μετάλλαξη στην περιοχή της πρωτεάσης) μπορεί να είναι πιο «σοβαρές» από τις μεταλλάξεις κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο. Ωστόσο, η ανάλυση μέχρι σήμερα έχει γενικά περιοριστεί σε ασθενείς που φέρουν ήδη μια ξεκάθαρη διάγνωση οικογενούς-συγγενούς TTP. Έτσι, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα λιγότερο σοβαρές μεταλλάξεις να σχετίζονται με ηπιότερες μορφές αυτής της νόσου (Kokame et al., 2002), (Matsumoto et al., 2004; Uchida et al., 2004).

3.3 Μηχανισμός αναστολής αυτοαντισώματος ADAMTS13 (anti-ADAMTS13)

Το TTP χαρακτηρίζεται από MAHA με σοβαρή θρομβοπενία και μεταβλητή ισχαιμία οργάνων, συνηθέστερα νευρολογική, καρδιακή ή νεφρική ανεπάρκεια (E. L. M. D. ; AMOROSI & ULTMANN, 1966; Mariotte et al., 2016; Page et al., 2017; SINGER et al., 1947). Η διάγνωση επιβεβαιώνεται από σοβαρή ανεπάρκεια (<10%) της δραστηριότητας του ADAMTS13. Το TTP χωρίζεται περαιτέρω σε δύο κατηγορίες με

βάση τον μηχανισμό της ανεπάρκειας ADAMTS13: συγγενής (κληρονομική) έναντι ανοσοδιαμεσολαβούμενης (επίκτητης). Η συγγενής TTP, γνωστή και ως σύνδρομο Urshaw-Schulman ή κληρονομική TTP, ορίζεται από μια επίμονη σοβαρή ανεπάρκεια (<10%) στο ADAMTS13 που προκαλείται από διαλλαλικές παθογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο ADAMTS13. Το ανοσοδιαμεσολαβούμενο TTP, που μερικές φορές αναφέρεται ως επίκτητο TTP, προκαλείται από ανεπάρκεια ADAMTS13 που προκαλείται από αυτοαντισώματα. Τα αντισώματα anti-ADAMTS-13 είναι κυρίως του ισότοπου IgG (Bettoni et al., 2012; Ferrari et al., 2007; Pos et al., 2011; Rieger et al., 2005; Scheifflinger et al., 2003). Ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι σε έως και 20% των ασθενών, έχουν εντοπισθεί αντισώματα IgA και IgM anti-ADAMTS-13. Οι πιο άφθονες υποκατηγορίες IgG είναι οι IgG4 και IgG1. Η διάκριση μεταξύ ισότοπων και υποκατηγοριών IgG μπορεί να έχει κάποια προγνωστική αξία, καθώς η παρουσία ICSH και IgG1 κατά την παρουσίαση με οξύ επεισόδιο iTTP συσχετίστηκε με υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας και υψηλά επίπεδα IgG4 βρέθηκαν να είναι συνδεδεμένα με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής· σε υποτροπιάζουσες περιπτώσεις, το IgG4 ήταν συχνά ο μόνος παρών ισότοπος. Ο πρωτεύων επίτοπος που αναγνωρίζεται από τα αντισώματα anti-ADAMTS-13 εντοπίζεται στην περιοχή διαχωρισμού (Klaus et al., 2004; Long Zheng et al., 2010; Luken et al., 2005). Η λεπτή χαρτογράφηση του επιτόπου στην περιοχή διαχωρισμού ADAMTS-13 αποκάλυψε ότι πέντε υπολείμματα, συγκεκριμένα τα θετικά φορτισμένα Arg568 και Arg660 και Phe592, Tyr661 και Tyr665, αποτελούσαν την κύρια αντιγονική επιφάνεια της πλειονότητας των ανασταλτικών αντισωμάτων ADAMTS-13 (Casina et al., 2015; Jin et al., 2010; Pos et al., 2010, 2011; Schaller et al., 2014). Όταν το ADAMTS-13 υιοθετεί μια διπλωμένη διαμόρφωση, αυτά τα υπολείμματα θωρακίζονται από τις δύο περιοχές CUB, αλλά πιθανότατα προεξέχουν στην ανοιχτή διαμόρφωση, μια υπόθεση που υποστηρίζεται από την κρυσταλλική δομή των N-τερματικών περιοχών ADAMTS-13 (Akiyama et al., 2009). Νέα δεδομένα σχετικά με τη διαμόρφωση ADAMTS-13 και σχετικά με τη δέσμευση αυτοαντισωμάτων παρουσιάστηκαν στο συνέδριο ISTH 2017 στο Βερολίνο. Οι Underwood et al. έδειξε ότι η πλειονότητα των ασθενών με iTTP είχαν αντισώματα ADAMTS-13 που αναγνωρίζουν τόσο την κλειστή όσο και την ανοιχτή διαμόρφωση ADAMTS-13. Η τελευταία, ωστόσο, ήταν η μόνη διαμόρφωση που αναγνωρίστηκε σε τρεις από τους 17 (16,7%) ασθενείς.

4. Παράγοντας von Willebrand

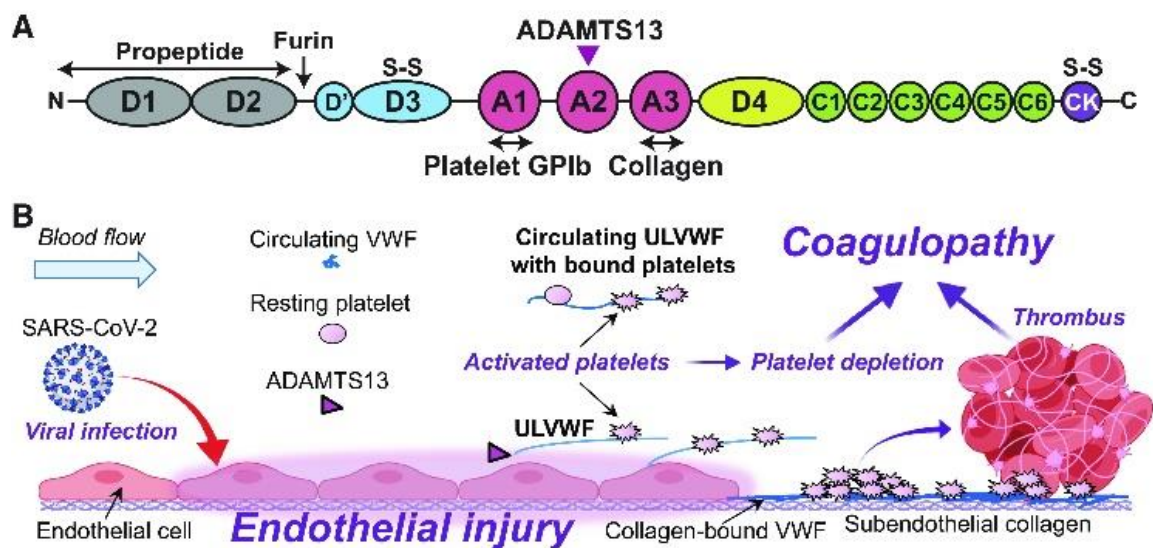
Ο VWF παράγεται αποκλειστικά σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και μεγακαρυοκύτταρα. Το ADAMTS13, είναι μια μεταλλοπρωτεάση που διασπά τον παράγοντα von Willebrand (VWF). Η σοβαρή ανεπάρκεια της δραστηριότητας του ADAMTS13 στο πλάσμα οδηγεί σε θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (TTP), ενώ οι ήπιες έως μέτριες ανεπάρκειες της δραστηριότητας του ADAMTS13 στο πλάσμα αποτελούν αναδυόμενους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη εμφράγματος του μυοκαρδίου και του εγκεφάλου καθώς και προεκλαμψίας. Αξιοσημείωτο είναι ότι η πρωτεολυτική διάσπαση του VWF από το ADAMTS13 επιταχύνεται από τον FVIII και τα αιμοπετάλια, υπό διατμητική τάση υγρού. Μια διακοπή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ FVIII (ή γλυκοπρωτεΐνης αιμοπεταλίων 1bα) και VWF μπορεί να επηρεάσει δραματικά την εξαρτώμενη από το ADAMTS13 πρωτεόλυση του VWF in vitro και in vivo. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ο FVIII και τα αιμοπετάλια μπορεί να είναι φυσιολογικοί συμπαράγοντες που ρυθμίζουν την πρωτεόλυση του VWF.

Ο VWF είναι μια πολυμερής γλυκοπρωτεΐνη που κυμαίνεται από 2 έως >60 προ πολυπεπτιδικές αλυσίδες που έχουν μήκος 2.138 αμινοξέα η καθεμία. Η αλληλουχία του προπεπτιδίου VWF χρησιμεύει για την ευθυγράμμιση 2 αλυσίδων μεταξύ τους για να επιτρέπεται η σωστή διασύνδεση κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πολυμερισμού. Περαιτέρω μετα-μεταφραστική τροποποίηση οδηγεί σε αφαίρεση της προπεπτιδικής αλληλουχίας καθώς και σε γλυκοζυλίωση, συμπεριλαμβανομένης της προσθήκης καθοριστικών παραγόντων της ομάδας αίματος. Αυτή η προσθήκη ενός καθοριστικού παράγοντα της ομάδας αίματος A ή B συμβαίνει μόνο κατά τη διάρκεια της γλυκοζυλίωσης ECs. Μετά από αυτές τις διεργασίες, ένα ετερογενές μίγμα μορίων εξαιρετικά μεγάλων VWF (UL-VWF) συντίθεται και αποθηκεύεται σε μεγακαρυοκύτταρα και ECs, αντίστοιχα, σε άλφα κοκκία και σώματα Weibel–Palade (WPB).

Αν και τα αιμοπετάλια παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην αποθήκευση όσο και στην έκκριση του VWF, αυτή η ανασκόπηση θα επικεντρωθεί στα ECs. Όταν ενεργοποιούνται τα EC, απελευθερώνονται μόρια UL-VWF και μπορούν είτε να παραμείνουν ελεύθερα και να επιπλέουν στο πλάσμα, είτε να εντοπιστούν στις

ενδοθηλιακές επιφάνειες. Τα UL-VWF έχουν μεγαλύτερη προθρομβωτική δράση από τα μικρότερα πολυμερή VWF. Ως εκ τούτου, καθώς εκκρίνονται τα μόρια UL-VWF, το ADAMTS-13, διασπά τον VWF σε μικρότερα πολυμερή για να μετριάσει τον ανεπιθύμητο σχηματισμό θρόμβου και οδηγεί σε μια παραλλαγή στα μεγέθη του VWF τόσο στο πλάσμα όσο και στις ενδοθηλιακές επιφάνειες. Τα αυξημένα επίπεδα δραστηριότητας VWF εξαρτώνται από την παρουσία των μεγαλύτερων πολυμερών VWF και την ενεργοποίηση μέσω διατμητικής τάσης στο κυκλοφορικό σύστημα. Το γονίδιο VWF ανταποκρίνεται στη διατμητική τάση ξεδιπλώνοντας και εκθέτοντας θέσεις για δραστηριότητα όπως η αυτοσύνδεση, η δέσμευση αιμοπεταλίων και η διάσπαση ADAMTS-13. Κατά συνέπεια, η ανισορροπία αυτών των συστατικών μπορεί να οδηγήσει σε μια προθρομβωτική κατάσταση (Mei et al., 2021).

Το VWF είναι μια μεγάλη πολυμερής πρωτεΐνη που σχηματίζεται από έως και 200 μονομερή. Μετά τη σύνθεση σε αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα και την απομάκρυνση των πεπτιδίων-σηματοδότη τους, οι υπομονάδες pro-VWF καταλήγουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο σε διμερή. Αυτά τα διμερή πολυμερίζονται περαιτέρω στη συσκευή Golgi σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς «κεφαλής με κεφαλή» που συνδέουν το αμινοτελικό D3 πριν από την έκκριση τους (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1 A: σχηματική απεικόνιση της διάταξης τομέα του VWF B: μοντέλο που συνδέει την ιογενή λοίμωξη, τον ενδοθηλιακό τραυματισμό, τον άξονα VWF/ADAMTS13 και την πήξη COVID-19 [Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2022 Jan 1; 322(1): H87–H93.]

Στο Golgi εμφανίζεται επίσης το στάδιο ωρίμανσης, όπου το pro-VWF διασπάται από τη φουρίνη και γίνεται η ώριμη πρωτεΐνη (από D' σε CK). Μεταξύ των 12 τομέων του

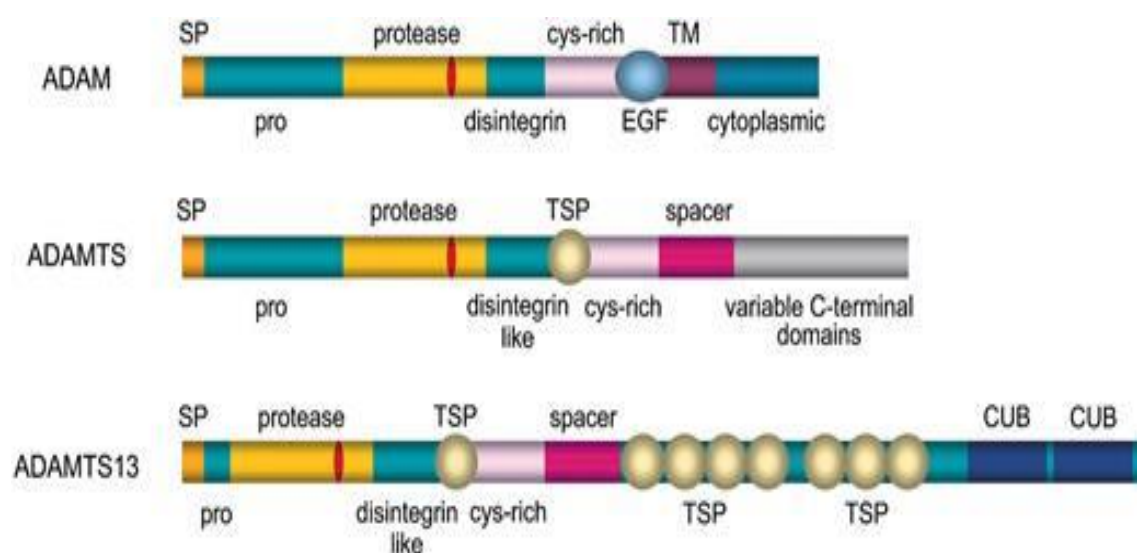
ωριμασμένου VWF, ο τριτομέας A1-A2-A3 είναι κεντρικός στη λειτουργία του VWF. Μετά τη βλάβη του ιστού, η περιοχή A3 αγκυρώνει πρώτη το VWF στο υποενδοθηλιακό κολλαγόνο υπό τη ροή του αίματος. Στη συνέχεια, η περιοχή A1, μέσω της εμπλοκής της με το GPIb των αιμοπεταλίων, συλλαμβάνει τα αιμοπετάλια από το αίμα που ρέει (Εικόνα 7, A και B) (Springer, 2014). Η περιοχή A2, η οποία μπορεί να υποβληθεί σε μηχανο-ενζυματική διάσπαση από το ADAMTS13, παρέχει έναν μηχανισμό για την πρόληψη της υπερβολικής προσκόλλησης αιμοπεταλίων. Το ώριμο μονομερές VWF περιέχει τρεις ενότητες: D (D'-D3, D4), A (A1-A2-A3) και C (C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK) (Y. F. Zhou et al., 2012). Η λειτουργία του A1A2A3 διαμορφώνεται από διατμητική τάση. Ο δεσμός A1-GPIba παρουσιάζει χαρακτηριστικά ενισχυμένα με δύναμη, τα οποία θα μπορούσαν να εξηγηθούν από τον μηχανισμό δέσμευσης catch-bond ή flex-bond (Yago et al., 2008).

Το VWF δρα επίσης ως φορέας —και σταθεροποιητής— του προπηκτικού παράγοντα VIII (FVIII) στην κυκλοφορία, ο οποίος επιτυγχάνεται με το σχηματισμό ενός μη ομοιοπολικά δεσμευμένου συμπλέγματος VWF-FVIII που προστατεύει τον FVIII από την αποικοδόμηση από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (J. Huang et al., 2009; Peyvandi et al., 2011). Μια πιο σημαντική παράμετρος για την παθολογία του COVID-19 είναι ότι, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο VWF είναι και αιμορραγικός (όταν είναι χαμηλός) και θρομβωτικός δείκτης (όταν αυξάνεται) (Lazzari et al., 2013).

4.1 Ταυτοποίηση της πρωτεάσης διάσπασης VWF ως ADAMTS13

Το 2001, αρκετές ομάδες αναγνώρισαν την πρωτεάση διάσπασης του VWF ως ADAMTS13 (μια όμοια με δισιντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεάση με τομέα θρομβοσπονδίνης τύπου 1), ένα νέο μέλος της οικογένειας μεταλλοπρωτεασών ADAMTS. Το ADAMTS13 είναι το 13ο μέλος της οικογένειας των μεταλλοπρωτεασών ADAMTS, που σχετίζεται με τη μεγάλη οικογένεια ADAM. Οι πρωτεάσες ADAM είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I που διαθέτουν ένα πεπτίδιο-σηματοδότη και ένα προπεπτίδιο που προηγείται μιας περιοχής μεταλλοπρωτεάσης, μιας περιοχής παρόμοια με δισιντεγκρίνη, της επανάληψης EGF, της διαμεμβρανικής περιοχής και της κυτταροπλασματικής περιοχής (Εικόνα 4.2). Μέχρι σήμερα, περισσότερα από 30 μέλη της οικογένειας ADAM έχουν περιγραφεί, και αυτά τα μόρια εξυπηρετούν μια ποικιλία λειτουργιών που κυμαίνονται από τη σύντηξη σπέρματος-ωαρίου (ADAMs 1

και 2) έως την αποβολή εξωκυτταρικών προσδεμάτων όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF- α ; ADAM 17) και το Notch (ADAM10) (Black & White, 1998). Παρόμοια με τις μεταλλοπρωτεάσες ADAM, τα μέλη της οικογένειας ADAMTS (από τα οποία υπάρχουν 19) παρουσιάζουν παρόμοια δομή περιοχής με το πεπτικό σηματοδότηση, το προπεπτικό, το τομέα μεταλλοπρωτεάσης και την περιοχή η οποία είναι παρόμοια με δισιντεγκρίνη (Cal et al., 2002). Σε αντίθεση με τις πρωτεάσες ADAM, τα ADAMTS δεν έχουν παρόμοια περιοχή με αυτή της επαναμβalόμενης EGF αλλά ούτε και μια διαμεμβρανική περιοχή και, ως εκ τούτου, εκκρίνονται αντί να συνδέονται με τη μεμβράνη. Επιπροσθέτως, όλα τα μέλη της οικογένειας ADAMTS διαθέτουν ένα ή περισσότερους τομείς θρομβοσπονδίνης τύπου 1 (TSP1) καθώς και μεταβλητές πρόσθετες C-τερματικές περιοχές (Εικόνα 4.2). Το ADAMTS2 διασπά το προπεπτικό του κολλαγόνου II και οι μεταλλάξεις αυτής της πρωτεΐνης προκαλούν σύνδρομο Ehlers-Danlos τύπου VII C (Cal et al., 2002; Colige et al., 1999).



Εικόνα 4.2 Σχηματικό διάγραμμα μεταλλοπρωτεασών ADAM και ADAMTS και ADAMTS13. [Gallia G. Levy, David G. Motto, David Ginsburg, ADAMTS13 turns 3, Blood, Volume 106, Issue 1, 2005]

Το ADAMTS13 είναι ένα από τα μεγαλύτερα μέλη της οικογένειας ADAMTS και παρουσιάζει τη χαρακτηριστική δομή τομέα (Εικόνα 4.2). Σε αντίθεση με άλλα μέλη της οικογένειας, η ακολουθία ADAMTS13 περιέχει 2 C-τερματικές περιοχές CUB άγνωστης λειτουργίας. Οι περιοχές CUB βρίσκονται σε πολλές αναπτυξιακά ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες (π.χ. η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 1 και οι

σπερμαδεσίνες) και μπορεί να παίζουν ρόλο στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Bork & Beckmann, 1993).

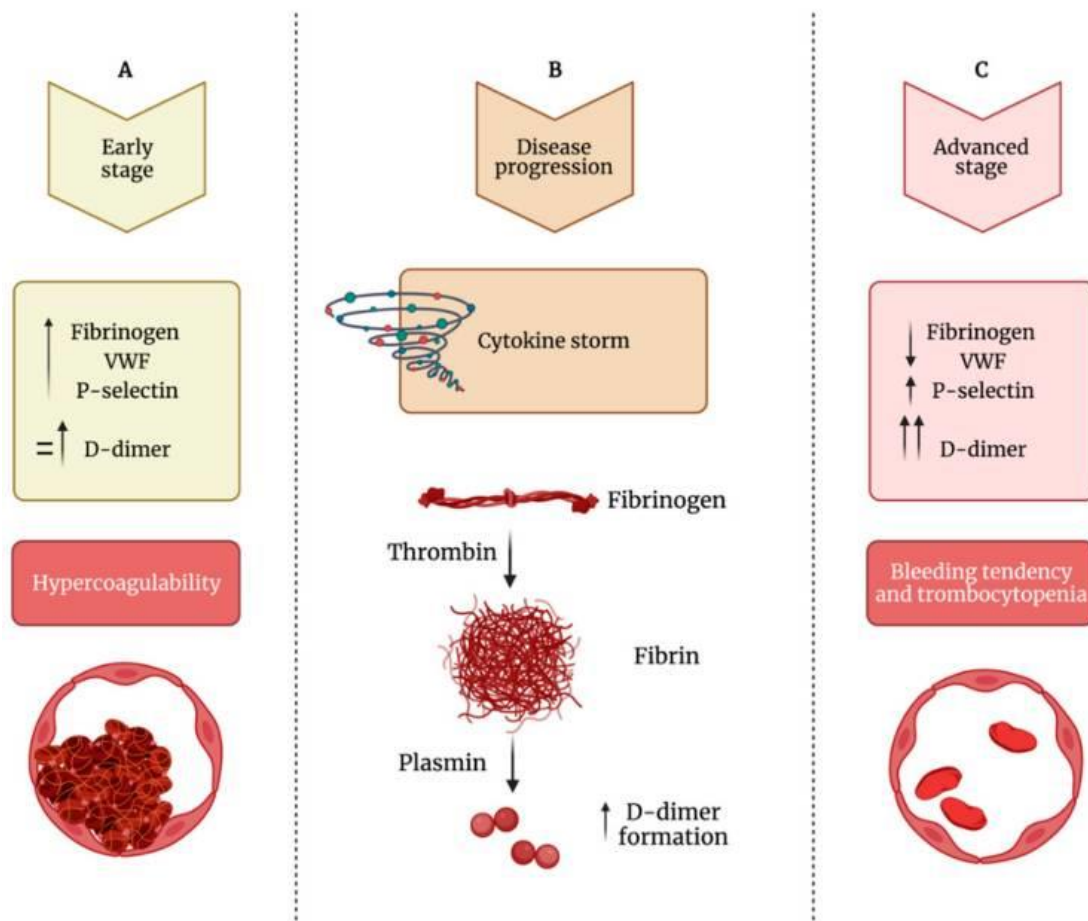
5. Η σχέση του von Willebrand παράγοντα με την αιμόσταση

5.1 Αιμοπετάλια και ο ρόλος τους στην ΤΤΡ

Παραδοσιακά τα αιμοπετάλια αναγνωρίζονται ως βασικοί παράγοντες στην αιμόσταση. Πράγματι, πρέπει να λάβουμε υπόψη ότι τα αιμοπετάλια εμπλέκονται επίσης βαθιά στην άμυνα του ξενιστή σε περίπτωση λοιμώξεων (Yeaman, 2010) δεδομένου ότι, μαζί με άλλα ανοσοκύτταρα και τη διαδικασία πήξης, δρουν ως ρυθμιστές και τελεστές των ανοσοκυττάρων εκτός από τον σχηματισμό θρόμβων (de Stoppelaar et al., 2014). Η ικανότητα εκκίνησης μακροφάγων, στρατολόγησης και ενεργοποίησης ουδετερόφιλων και της ενεργής συμμετοχής στην ενδοαγγειακή θρόμβωση χαρακτηρίζει τα αιμοπετάλια ως σύνδεσμο μεταξύ της άμυνας του ξενιστή και της θρομβοφλεγμονής. Είναι γεγονός ότι η φλεγμονή μπορεί να προκαλέσει αιμοστατικές αλλοιώσεις που οδηγούν σε θρόμβωση (Liverani et al., 2018; Mussbacher et al., 2019), και, από την άλλη πλευρά, η θρόμβωση μπορεί να επιδεινώσει τη φλεγμονή προάγοντας έτσι έναν βρόχο που αυξάνει τη βλάβη των ιστών και τις θρομβωτικές επιπλοκές (Acanfora et al., 2021; Cicala & Cirino, 1998; Esmo et al., 2011).

Στην παθογένεση του COVID-19, η υπερβολική απελευθέρωση κυτοκινών είναι ζωτικής σημασίας για τον επακόλουθο επηρεασμό των συστηματικών αιμοδυναμικών ανωμαλιών και των καρδιαγγειακών παθήσεων και σε αυτό το πλαίσιο, τα αιμοπετάλια εκκρίνουν έναν αριθμό προφλεγμονωδών κυτοκινών, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων, που συμβάλλουν σημαντικά στη θρομβοφλεγμονή, η οποία είναι υπεύθυνη για τα επακόλουθα της λοίμωξης και τη σοβαρότητα στην ανεπάρκεια οργάνων. Φυσικά, στη διασταύρωση μεταξύ φλεγμονής και θρόμβωσης, τα αιμοπετάλια απαιτείται να συνομιλούν με άλλα κυκλοφορούντα κύτταρα, όπως τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, και καθένα από αυτά επικοινωνεί με τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Hansson et al., 2006; Stark & Massberg, 2021). Τα κυκλοφορούντα συσσωματώματα αιμοπεταλίων-ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων και Τ-κυττάρων βρέθηκαν να είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με COVID-19 σε σύγκριση με υγιή άτομα, καθώς τα ίδια τα

αιμοπετάλια εκδηλώνουν υπεραντιδραστικότητα, συμβάλλοντας έτσι στην παθοφυσιολογία της νόσου COVID-19 (Barrett et al., 2021; Kanth Manne et al., 2020). Όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 5.1), κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων, οι ασθενείς με COVID-19 εμφανίζουν φυσιολογικά έως ελαφρώς αυξημένα επίπεδα D-διμερούς, ινωδογόνου, VWF και P-σελεκτίνης, και παρατηρείται ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Εάν δεν αντιμετωπιστεί, το D-διμερές αυξάνεται ταχέως και επίσης το ινωδογόνο, ο VWF και η P-σελεκτίνη αυξάνονται περαιτέρω, οδηγώντας σε υπερ ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, σχηματισμό θρόμβων και θρομβωτικά επεισόδια. Κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου της νόσου, οι ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση εμφανίζουν καταίγίδα κυτοκινών, υψηλά επίπεδα P-σελεκτίνης και D-διμερούς, ενώ το ινωδογόνο και το VWF μειώνονται επειδή εξαντλούνται από τα κατεστραμμένα ενδοθηλιακά κύτταρα ή τα υπερενεργοποιημένα αιμοπετάλια που, σε αυτό το στάδιο, δείχνουν θρομβοκυτταροπενία.



Εικόνα 5.1 Διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ υπερπηκτικότητας και αιμορραγικής τάσης κατά την εξέλιξη του COVID-19. (A) Κατά την πρώιμη φάση της λοίμωξης, οι ασθενείς εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου, VWF (παράγοντας von Willebrand) και P-σελεκτίνης και φυσιολογικά έως ήπια αυξημένα επίπεδα D-διμερούς, οδηγώντας σε υπερπηκτικότητα. (B) Κατά την εξέλιξη της νόσου, υπάρχει

αυξημένος σχηματισμός D-διμερούς. (Γ) Στο προχωρημένο στάδιο της λοίμωξης, τα επίπεδα ινωδογόνου και VWF μειώνονται, ενώ τα επίπεδα D-διμερούς αυξήθηκαν έντονα. αυτή η φάση χαρακτηρίζεται από θρομβοπενία και αιμορραγική διάθεση. [Barale C, Melchionda E, Morotti A, Russo I. Prothrombotic Phenotype in COVID-19: Focus on Platelets. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(24):13638. <https://doi.org/10.3390/ijms222413638>]

5.2 Αιμόσταση και η σχέση της με τον von Willebrand Factor

Η πρωτογενής αιμόσταση είναι η διαδικασία σχηματισμού θρόμβου αιμοπεταλίων στο σημείο του τραυματισμού των αιμοφόρων αγγείων. Για να συμβεί σωστή πρωτογενής αιμόσταση, πρέπει να προκύψει προσκόλληση και συσσώρευση αιμοπεταλίων. Κατά τη διάρκεια της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο σημείο του τραυματισμού των αιμοφόρων αγγείων, τα αιμοπετάλια μπορούν να συνδεθούν απευθείας στο εκτεθειμένο υποενδοθηλιακό κολλαγόνο (μέσω υποδοχέων GPIa-IIa ή GPVI) ή έμμεσα μέσω VWF. Στην τελευταία περίπτωση, τα αιμοπετάλια συνδέονται με το μόριο VWF μέσω του υποδοχέα της γλυκοπρωτεΐνης των αιμοπεταλίων Ib-V-IX (GPIb) ενώ το VWF συνδέεται με το υποενδοθηλιακό κολλαγόνο. Επιπλέον, το VWF προάγει επίσης τη συσσώρευση αιμοπεταλίων (αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-αιμοπεταλίων) δεσμεύοντας στον υποδοχέα της επιφάνειας των αιμοπεταλίων GPIIb/IIIa. Αν και το GPIIb/IIIa είναι πιο γνωστό ως υποδοχέας ινωδογόνου, μπορεί να συνδεθεί τόσο με το ινωδογόνο όσο και με το VWF. Συνοπτικά, το VWF παίζει ζωτικό ρόλο στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων και στη συσσώρευση στο σχηματισμό θρόμβων.

Το VWF παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη δευτερογενή αιμόσταση. Η δευτερογενής αιμόσταση περιλαμβάνει παράγοντες πήξης και τον καταρράκτη πήξης για την παραγωγή ενός πλέγματος ινώδους στο σημείο του τραυματισμού του αγγείου. Το VWF διευκολύνει τη δευτερογενή διαδικασία αιμόστασης με δύο τρόπους. Πρώτον, το VWF χρησιμεύει ως πρωτεΐνη φορέας για τον Παράγοντα VIII, επεκτείνοντας τον χρόνο ημιζωής του παράγοντα VIII στο πλάσμα. Αν και αυτό μπορεί αρχικά να φαίνεται ασήμαντο, η δραστηριότητα του φορέα VWF σταθεροποιεί τον Παράγοντα VIII και επεκτείνει σημαντικά τον χρόνο ημιζωής του 4 έως 6 φορές. Δεύτερον, απελευθερώνει και συγκεντρώνει τον παράγοντα VIII στο σημείο του τραυματισμού. Ο παράγοντας VIII είναι ένας παράγοντας πήξης που, όταν ενεργοποιείται, συμπλέκεται με άλλους παράγοντες για να παράγει τελικά ινώδες. Για να τονιστεί η σημασία του VWF σε αυτή τη διαδικασία, μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη θέση

δέσμευσης του VWF για τον Παράγοντα VIII οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα του Παράγοντα VIII, γνωστού ως νόσου τύπου 2N von Willebrand (VWD), με αποτέλεσμα μια κλινική εικόνα παρόμοια με την αιμορροφιλία A, η οποία είναι μια αιμορραγική διαταραχή που εμφανίζεται όταν ένα άτομο δεν έχει την ικανότητα να παράγει επαρκείς ποσότητες Παράγοντα VIII για σωστή πήξη (Mei et al., 2021).

5.3 Ενδοθηλιακή ενεργοποίηση και η σύνδεση αυτής με το VWF

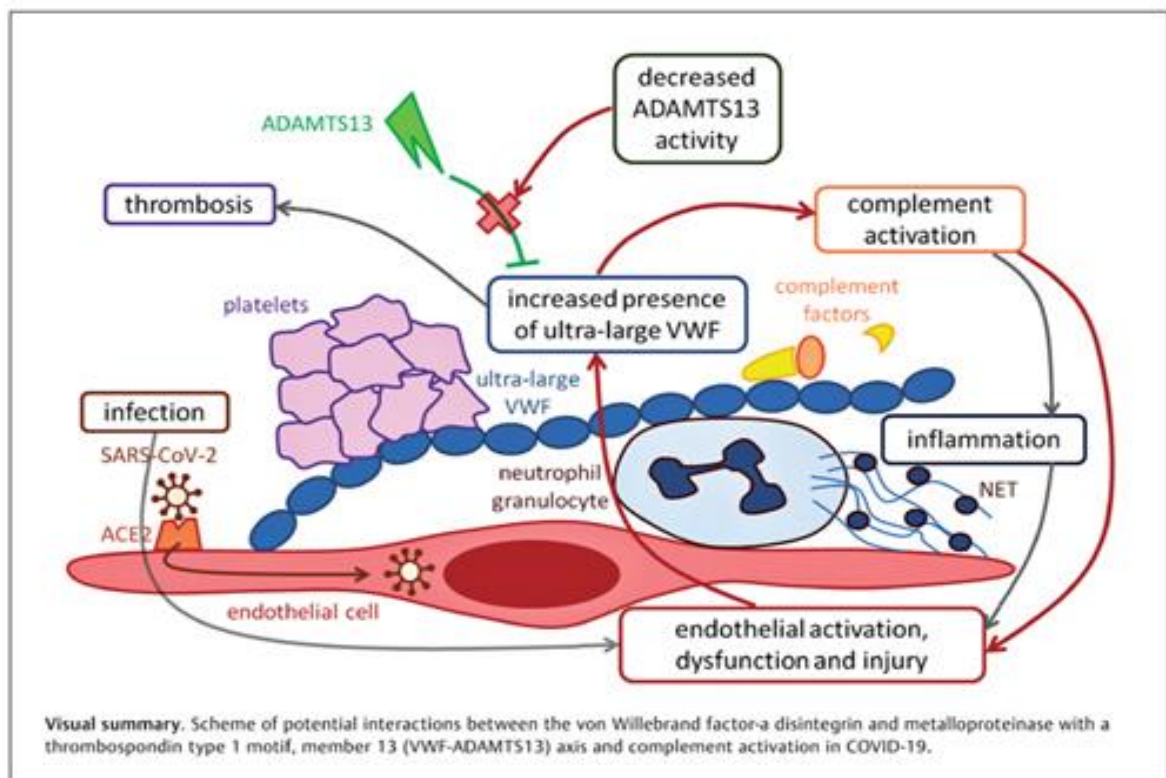
Ως μόριο που υπάρχει στα EC και παίζει θεμελιώδη ρόλο στην αιμόσταση και τη θρόμβωση, ο VWF είναι ένας σημαντικός υποψήφιος δείκτης που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την παρακολούθηση κλινικών περιπτώσεων που σχετίζονται με ενδοθηλιακά τραύματα και πήξη στον COVID-19. Οι πρώτες μελέτες σημείωσαν ότι τα επίπεδα D-διμερούς ήταν ένας σημαντικός προγνωστικός δείκτης στον COVID-19. Ωστόσο, οι μελέτες άρχισαν επίσης να αναγνωρίζουν και να καταδεικνύουν ότι υπήρχαν επίσης σημαντικά αυξημένα επίπεδα VWF (Goshua et al., 2020; Helms et al., 2020; Panigada et al., 2020; Rauch et al., 2020). Περαιτέρω, οι μελέτες αναγνώρισαν, ότι η δραστηριότητα του VWF είναι επίσης αυξημένη και ότι τα επίπεδα δραστηριότητας του ADAMTS-13 είναι σχετικά ήπια έως μέτρια μειωμένα, οδηγώντας σε μια ανισορροπία που ευνοεί τη θρόμβωση (Escher et al., 2020a, 2020b).

Η θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (TTP) σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα δραστηριότητας του ADAMTS-13. Το TTP οφείλεται γενικά σε μια παρεμποδισμένη ή απουσία δραστηριότητας ADAMTS-13 είτε από επίκτητο αναστολέα είτε από συγγενή απουσία. Τα μειωμένα επίπεδα δραστηριότητας του ADAMTS-13 έχουν ως αποτέλεσμα την περίσσεια υπερδραστικών πολυμερών UL-VWF που προάγουν το σχηματισμό μικροθρόμβων. Τα υψηλά επίπεδα τόσο του αντιγόνου VWF όσο και της δραστηριότητάς του, έχουν συσχετιστεί κλινικά με αυξημένα θρομβωτικά συμβάντα (Helms et al., 2020), αυξημένη πιθανότητα θεραπείας σε ΜΕΘ (Goshua et al., 2020), καθώς και με άλλες εργαστηριακές δοκιμές όπως οι μειωμένοι χρόνοι πήξης, οι αυξημένες ταχύτητες σχηματισμού θρόμβων και τα αυξημένα επίπεδα άλλων δεικτών ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και ενδοθηλίου, όπως ο Παράγοντας VIII και η θρομβομοντουλίνη (Escher et al., 2020a, 2020b; Rauch et al., 2020),(Goshua et al., 2020; Panigada et al., 2020; Rauch et al., 2020). Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο

COVID-19 σχετίζεται με μια χαρακτηριστική πηκτικότητα. Δεδομένου του φυσιολογικού ρόλου των EC στη ρύθμιση της παραγωγής θρομβίνης, της απελευθέρωσης του παράγοντα von Willebrand (VWF) και της προσκόλλησης και ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, φαίνεται πιθανό ότι η βλάβη των EC είναι κρίσιμη για την πυροδότηση αυτής της πήξης και της τάσης για θρόμβωση. Σύμφωνα με αυτήν την ιδέα, έχουν παρατηρηθεί σημαντικά αυξημένα επίπεδα αντιγόνου VWF (VWF:Ag) και προπεπτιδίου VWF (VWF:pp) στο πλάσμα σε ασθενείς με σοβαρή νόσο COVID-19 (Goshua et al., 2020),(Ladikou et al., 2020; Ward et al., 2021).

Ο τραυματισμός των ενδοθηλιακών κυττάρων ήταν ένα πρωταρχικό εύρημα σε αυτοψίες μη επιζώντων από COVID-19 και μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην προπηκτική κατάσταση που παρατηρείται σε αυτούς τους ασθενείς. Οίδημα, διακοπή των συνδέσεων και απώλεια επαφής με τη βασική μεμβράνη έχουν παρατηρηθεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψε επίσης υπερ δομική βλάβη στο ενδοθήλιο (Magro et al., 2020). Μια μελέτη 68 ασθενών με COVID-19 υποστηρίζει περαιτέρω, ότι η βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο στην παρατηρούμενη πήξη. Το αντιγόνο του παράγοντα von Willebrand (VWF), η διαλυτή P-σελεκτίνη και ο PAI-1, δείκτες βλάβης των ενδοθηλιακών κυττάρων, ήταν αυξημένοι σε ασθενείς MEΘ σε σύγκριση με ασθενείς που δεν ήταν σε MEΘ (Goshua et al., 2020),(Blasi et al., 2020; Lopez-Castaneda et al., 2021; von Meijenfeldt et al., 2020b). Επιπλέον, η θρομβομοντουλίνη, μια αγγειοπροστατευτική γλυκοπρωτεΐνη μεμβράνης, που εκφράζεται στην επιφάνεια του αυλού των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων που σχετίζεται επίσης με τραυματισμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, συσχετίστηκε με αυξημένη θνησιμότητα (Goshua et al., 2020). Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι ένας γνωστός παράγοντας θρόμβωσης, όπου η δυσλειτουργία οδηγεί στην έκθεση του υποενδοθηλιακού κολλαγόνου στο αίμα, προκαλώντας την αρχική προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο. Ο τραυματισμός των ενδοθηλιακών κυττάρων που προκαλείται από φλεγμονή στο COVID-19, μπορεί επίσης να οδηγήσει σε μεγάλη απελευθέρωση ενεργοποιητών πλασμινογόνου, παρέχοντας έτσι μια πιθανή εξήγηση για τα υψηλά επίπεδα D-διμερούς και τα προϊόντα αποικοδόμησης του ινώδους που παρατηρούνται σε σοβαρή πήξη COVID-19 (Levi et al., 2020) ,(Yau et al., 2015). Το ένζυμο μετατροπής της αγγιοτενσίνης 2 (ACE2), έχει αναφερθεί ως ο

υποδοχέας που μεσολαβεί στην είσοδο του SARS-CoV-2 και προηγούμενες μελέτες υποδηλώνουν την έκφραση του ACE2 στο ανθρώπινο ενδοθήλιο (Levi et al., 2020),(Abassi et al., 2020; Ashraf et al., 2021; South et al., 2020). Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν ελάχιστα έως καθόλου ACE2 και μπορεί να μην υποστηρίζουν παραγωγική μόλυνση του SARS-CoV-2 (McCracken et al., 2021). Επομένως, η ενδοθηλιακή βλάβη που παρατηρείται σε ασθενείς με COVID-19 μπορεί πιθανότατα να προέρχεται από έμμεσους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της μόλυνσης γειτονικών κυττάρων, της ενεργοποίησης του συμπληρώματος ή και των κυκλοφορούντων προφλεγμονωδών κυτοκινών. (Εικόνα 5.2)



Εικόνα 5.2 Σχήμα πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του παράγοντα von Willebrand- α αποσυντεθρίνης και της μεταλλοπρωτεϊνάσης με μοτίβο θρομβοσπονδίνης τύπου 1, μέλος 13 (VWF-ADAMTS13) άξονας και ενεργοποίηση συμπληρώματος στον COVID-19. [Sinkovits G, Réti M, Müller V, Iványi Z, Gál J, Gopcsa L, Reményi P, Szathmáry B, Lakatos B, Szlávik J, Bobek I, Prohászka ZZ, Föhréc Z, Mező B, Csuka D, Hurler L, Kajdácsi E, Cervenak L, Kiszél P, Masszi T, Vályi-Nagy I, Prohászka Z. Associations between the von Willebrand Factor-ADAMTS13 Axis, Complement Activation, and COVID-19 Severity and Mortality. *Thromb Haemost.* 2022 Feb;122(2):240-256. doi: 10.1055/s-0041-1740182. Epub 2022 Jan 21.]

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι να διερευνήσει την συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας του ADAMTS13 και των παθοφυσιολογικών χαρακτηριστικών ατόμων με COVID-19.

Υλικά

Ασθενείς

Για την διεξαγωγή της εργασίας αυτής επιστρατεύθηκαν ασθενείς με COVID-19 (n=38) από το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Ιπποκράτειο».

Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διενέργεια της εργασίας ανήκουν στην εταιρία Immucor Gamma και το kit των αντιδραστηρίων έχει την ονομασία LIFECODES ATS-13 Activity Assay. Ο μέγιστος αριθμός τεστ που περιέχει κάθε kit είναι 40. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

ATS-MS	403575	Black Microwell Strips: Μαύρες λωρίδες Microwell. Μόλις αφαιρεθούν από τη θήκη από αλουμινόχαρτο, προσέξτε να μην εκτεθούν οι ταινίες σε σκόνη ή σωματίδια. Φροντίστε να προστατεύσετε από την υγρασία. Οι λωρίδες πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.
ATS-SUB	403614	Substrate: Υπόστρωμα: λυοφιλοποιημένο. Διατηρήστε το υπόστρωμαπροστατευμένο από το φως. Αποθηκεύστε το λυοφιλοποιημένο υλικό στους -15 έως -30°C. Το ενυδατωμένο υπόστρωμα πρέπει να φυλάσσεται σε όρθια θέση στο αρχικό πωματισμένο φιαλίδιο, σφραγισμένο με μεμβράνη Parafilm, στους -15 έως -30°C στο σκοτάδι.
ATS-SD	403600	Specimen Diluent: Αραιωτικό δείγματος: Έτοιμο για χρήση. Φυλάσσεται στους 2 έως 8°C.
ATS-SB	403612	Substrate Buffer: Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος: Έτοιμο για χρήση. Φυλάσσεται στους 2 έως 8°C.
PCH	403597	Positive Control: High: Θετικός μάρτυρας: Υψηλός. Φυλάσσεται στους -15 έως -30 °C. Περιέχει υλικό ανθρώπινης προέλευσης. Ξεπαγώστε και ανακατέψτε καλά πριν τη χρήση. Έτοιμο για χρήση. Οι τιμές μπορούν να βρεθούν στο Φύλλο Καταγραφής Βαθμονόμησης Δοκιμασίας Δραστηριότητας και Ελέγχου ATS-13. Απορρίψτε μετά από μία χρήση.
PCL	403598	Positive Control: Low: Θετικός μάρτυρας: Χαμηλό: Φυλάσσετε στους -15 έως -30°C. Περιέχει υλικό ανθρώπινης προέλευσης. Ξεπαγώστε και ανακατέψτε καλά πριν τη χρήση. Έτοιμο για χρήση. Οι τιμές μπορούν να βρεθούν στο Φύλλο Καταγραφής Βαθμονόμησης Δοκιμασίας Δραστηριότητας και Ελέγχου ATS-13. Απορρίψτε μετά από μία χρήση.
ATS-CALA	403577	Calibrator A: Βαθμονομητής A: Φυλάσσετε στους -15 έως -30°C. Περιέχει υλικό ανθρώπινης προέλευσης. Ξεπαγώστε και ανακατέψτε καλά πριν τη χρήση. Έτοιμο για χρήση. Οι τιμές μπορούν να βρεθούν στο Φύλλο Καταγραφής Βαθμονόμησης Δοκιμασίας Δραστηριότητας και Ελέγχου ATS-13. Απορρίψτε μετά από μία χρήση.
ATS-CALB	403578	Calibrator B: Βαθμονομητής B: Φυλάσσετε στους -15 έως -30°C. Περιέχει υλικό ανθρώπινης προέλευσης. Ξεπαγώστε και ανακατέψτε καλά πριν τη χρήση. Έτοιμο για χρήση. Οι τιμές μπορούν να βρεθούν στο Φύλλο Καταγραφής Βαθμονόμησης Δοκιμασίας Δραστηριότητας και Ελέγχου ATS-13. Απορρίψτε μετά από μία χρήση.
ATS-CALC	403579	Calibrator C: Βαθμονομητής C: Φυλάσσετε στους -15 έως -30°C. Περιέχει υλικό ανθρώπινης προέλευσης. Ξεπαγώστε και ανακατέψτε καλά πριν τη χρήση. Έτοιμο για χρήση. Οι τιμές μπορούν να βρεθούν στο Φύλλο Καταγραφής Βαθμονόμησης Δοκιμασίας Δραστηριότητας και Ελέγχου ATS-13. Απορρίψτε μετά από μία χρήση.
ATS-CALD	403580	Calibrator D: Φυλάσσεται στους -15 έως -30°C. Περιέχει υλικό ανθρώπινης προέλευσης. Ξεπαγώστε και ανακατέψτε καλά πριν τη χρήση. Έτοιμο για χρήση. Οι τιμές μπορούν να βρεθούν στο Φύλλο καταγραφής βαθμονομητή και ελέγχου ATS-13. Απορρίψτε μετά από μία χρήση.

ATS- CALE	403581	Calibrator E: Φυλάσσεται στους -15 έως -30°C. Περιέχει υλικό ανθρώπινης προέλευσης. Ξεπαγώστε και ανακατέψτε καλά πριν τη χρήση. Έτοιμο για χρήση. Οι τιμές μπορούν να βρεθούν στο Φύλλο εγγραφής βαθμονομητή και ελέγχου ATS-13. Απορρίψτε μετά από μία χρήση.
--------------	--------	---

Διαλύματα

Το κουτί A (303281) περιέχει:

1. 6 x 130 μ L Θετικός μάρτυρας: Υψηλός
2. 6 x 130 μ L Θετικός μάρτυρας: Χαμηλό
3. 6 σετ βαθμονομητών, 5 επιπέδων, 130 μ L το καθένα:

Βαθμονομητής Α, Βαθμονομητής Β, Βαθμονομητής Γ, Βαθμονομητής Δ,
Βαθμονομητής Ε.

4. 1 x 0,10 mg Υπόστρωμα

Το κουτί Β (303282) περιέχει:

1. 2 πλαίσια Microwell, το καθένα περιέχει 6 – 2 x 8 Μαύρες ταινίες Microwell
2. 1 x 14 mL αραιωτικό δείγματος
3. 1 x 14 mL ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος

Επιπρόσθετα υλικά:

1. Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου για αραιώσεις δειγμάτων ασθενών και για την αραιώση υποστρώματος
2. Πιπέτες για την μεταφορών δειγμάτων
3. Ρυθμιζόμενες μικροπιπέτες για την μεταφορά 10 - 100 μ L και 100 – 1000 μ L
4. Ρήγξη μιας χρήσεως
5. DMSO (Βαθμός αντιδραστηρίου)
6. Συσκευή ανάγνωσης πλάκας φθορισμού ικανή να μετρήσει φθορισμό σε διέγερση = 340 - 350 nm και εκπομπή = 440 - 450 nm
7. Χρονόμετρο
8. Φυγόκεντρος
9. Αλουμινόχαρτο

Μέθοδοι

Αρχή της Διαδικασίας

Όλοι οι συμμετέχοντες ασθενείς είχαν θετικό αποτέλεσμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο SARS-CoV-2. Το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε για τη συλλογή δειγμάτων είναι το εξής: τα δείγματα συλλέγονται από τους ασθενείς κατά την είσοδο τους στην ΜΕΘ. Η συλλογή των δειγμάτων γίνεται με ειδικό στυλεό με πλαστικό άξονα και βύσμα από συνθετικό υλικό, όχι βαμβακοφόροι στυλεοί και στην συνέχεια μεταφέρονται σε ειδικά αποστειρωμένα φιαλίδια τα οποία περιέχουν υγρό υλικό μεταφοράς ιών σε ποσότητα 1-3 ml. Η συλλογή των δειγμάτων προέρχεται από την ανώτερη αναπνευστική οδό και συγκεκριμένα τα επιχρίσματα αποτελούν συνδυασμό ρινικών και στοματοφαρυγγικών επιχρισμάτων. Κατά την συλλογή αυτών, ακολουθήθηκαν όλα τα μέτρα προστασίας καθώς και η εφαρμογή και η αφαίρεση του εξοπλισμού ατομικής προστασίας που προτείνει ο ΠΟΥ από το προσωπικό που διενεργούσε την συλλογή. Τα μέτρα αφορούν την χρήση μάσκας υψηλής αναπνευστικής προστασίας FFP3, την χρήση γαντιών, ποδιάς μιας χρήσεως και ποδοναρίων, καθώς και την εφαρμογή της υγιεινής των χεριών μετά την αφαίρεση του εξοπλισμού.

Τα δείγματα στάλθηκαν στο μικροβιολογικό εργαστήριο του νοσοκομείου για την επεξεργασία τους και την εξαγωγή ιικού RNA. Δύο γονίδια στόχοι, το ORF1ab (ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 1ab) και το N (πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου), ενισχύθηκαν ταυτόχρονα και δοκιμάστηκαν χρησιμοποιώντας μια ανάλυση RT-PCR σε πραγματικό χρόνο. Το ιικό φορτίο υποδείχθηκε ως η τιμή κατωφλίου κύκλου (Ct) του γονιδίου N του SARS-CoV-2. Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Μια τιμή Ct <40 ορίστηκε ως θετική για το RNA του SARS-CoV-2 και >40 ορίστηκε ως αρνητική. Δείγματα με τιμή Ct μεταξύ 37 και 40 δοκιμάστηκαν ξανά τουλάχιστον δύο φορές.

Η ATS-13 Activity Assay βασίζεται στην τεχνολογία μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού (FRET). Ένα συνθετικό θραύσμα της πρωτεΐνης παράγοντα von Willebrand χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα. Η διάσπαση αυτού του πεπτιδίου μεταξύ δύο τροποποιημένων υπολειμμάτων απελευθερώνει τις δυνατότητες απόσβεσης του φθορισμού.

Αυτή η δοκιμασία βασίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό της διάσπασης ενός μικρού θραύσματος του παράγοντα von Willebrand από την πρωτεάση ADAMTS-13. Η διάσπαση αυτού του συνθετικού υποστρώματος ανιχνεύεται με ανάγνωση του φθορισμού που προκύπτει όταν το υπόστρωμα αποκόπτεται. Στο εργαστήριο μετρήθηκε η δραστηριότητα του αναστολέα του ADAMTS13. Δραστηριότητα της μεταλλοπρωτεάσης $\leq 30\%$ θεωρείται παθολογική .

Συλλογή δείγματος

Για την πραγματοποίηση της εργασίας, χρησιμοποιήθηκε μόνο πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια που συλλέγεται σε σωλήνα με κιτρικό νάτριο 3,2% , αυτό είναι το δείγμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αυτόν τον προσδιορισμό. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε πλάσμα που έχει συλλεχθεί ή υποβληθεί σε θεραπεία με EDTA. Στην ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο πλάσμα. Ο ορός θα δώσει ανακριβή αποτελέσματα. Η αντίδραση του ενζυμικού υποστρώματος είναι ευαίσθητη στη θερμοκρασία και πρέπει να εκτελείται σε ελεγχόμενη περιοχή στους 22 έως 25°C.

Η συλλογή πλάσματος πρέπει να γίνεται ως εξής:

1. Συλλέγουμε αίμα σε ρυθμισμένο κιτρικό νάτριο (3,2%) πλαστικούς σωλήνες (διατίθεται σε σωλήνες πλήρους έλξης 4,5 mL, 2,7 mL ή 1,8 mL).

Οι σωλήνες μερικής έλξης δεν υποβάλλονται σε επεξεργασία, δεδομένου ότι τα σωληνάκια είναι προ-βαθμονομημένα ώστε να λαμβάνεται η καθορισμένη ποσότητα αίματος, το δείγμα που προκύπτει δεν θα έχει την κατάλληλη αναλογία αίματος προς αντιπηκτικό 9:1 εάν δεν συλλεχθεί πλήρες δείγμα.

2. Μετά τη συλλογή, αποθηκεύουμε το σωληνάριο σε όρθια θέση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη φυγοκέντρηση.

Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν μεταξύ δεκαπέντε λεπτών και δύο ωρών μετά τη συλλογή αίματος για καλύτερα αποτελέσματα.

3. Αναμειγνύουμε ξανά το δείγμα αίματος αμέσως πριν από τη φυγοκέντρηση αναστρέφοντας απαλά το σωληνάριο 8 έως 10 φορές.
4. Φυγοκεντρούμε το δείγμα αίματος σε θερμοκρασία δωματίου σε

οριζόντιο ρότορα (swing-out rotor) για 15 - 20 λεπτά σε 1500 έως 1800 RCF (Σχετική Φυγοκέντρη Δύναμη) με το φρένο σβηστό.

Ο αριθμός των στροφών που φυγοκεντρούμε είναι συγκεκριμένος , καθώς η υπερβολική ταχύτητα φυγοκέντρωσης (πάνω από 2000 RCF) μπορεί να προκαλέσει σπάσιμο του σωλήνα και έκθεση στο αίμα και πιθανό τραυματισμό.

5. Μετά τη φυγοκέντρωση, μεταφέρουμε τα υπερκείμενα του στρώματος πλάσματος (2/3 της ποσότητας που φυγοκεντρήσαμε) σε ένα νέο πλαστικό σωλήνα.
6. Φυγοκεντρούμε ξανά το συλλεχθέν πλάσμα στους 1500 έως 1800 RCF με το φρένο κλειστό για επιπλέον 15 - 20 λεπτά για να αφαιρέσουμε τυχόν ερυθρά αιμοσφαίρια ή αιμοπετάλια.
7. Μεταφέρουμε ξανά το υπερκείμενο (τα πάνω 2/3) του πλάσματος σε ένα νέο πλαστικό σωλήνα, προσέχοντας να μην μεταφέρουμε κανένα κύτταρο από το κάτω μέρος του σωλήνα.

Αποθήκευση δείγματος

1. Το πλάσμα πρέπει να φυλάσσεται στους 2 έως 8°C και να αναλύεται εντός 4 ωρών ή να λαμβάνεται σε κλάσματα και να καταψύχεται στους -70°C ή ψυχρότερα για έως και 6 μήνες.
2. Το κατεψυγμένο πλάσμα πρέπει να αποψυχθεί γρήγορα στους 37°C. Το αποψυγμένο πλάσμα πρέπει να φυλάσσεται στους 2 έως 8°C και να αναλύεται εντός 4 ωρών.

Εργαστηριακές μετρήσεις- Επεξεργασία δειγμάτων

1. Αφήνουμε όλα τα αντιδραστήρια να θερμανθούν σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρούμε μόνο ένα σετ βαθμονομητών και μαρτύρων ανά ανάλυση.

2. Προσδιορίζουμε τον αριθμό των δειγμάτων ασθενών που θα εξεταστούν. Χρησιμοποιώντας το Φύλλο Καταγραφής, αντιστοιχίζουμε κάθε δείγμα σε μια θέση που αποτελείται από δύο (όμοια) πηγαδάκια .

Καταγράφουμε την ταυτότητα κάθε δείγματος στο Φύλλο Καταγραφής. Τοποθετούμε τα αντίγραφα του δείγματος οριζόντια .

3. Αφαιρούμε το πλαίσιο μικροβυθισμάτων από τη θήκη. Αφαιρούμε αμέσως τις λωρίδες που δεν χρειαζόμαστε από το πλαίσιο και κλείνουμε ξανά την προστατευτική θήκη.
4. Σε έναν πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα, αραιώνουμε κάθε δείγμα πλάσματος ασθενούς που πρόκειται να εξεταστεί προσθέτοντας 18 μL πλάσματος σε 132 μL Αραιωτικού Δείγματος.
5. Προσθέτουμε 50 μL από κάθε Βαθμονομητή (σε δύο αντίτυπα) στις κατάλληλες μικροϋποδοχές των μαύρων λωρίδων μικροβυθισμάτων, όπως ορίζονται στο Φύλλο Καταγραφής, χωρίς να αραιώσουμε.
6. Προσθέτουμε 50 μL θετικού μάρτυρα: Χαμηλό (εις διπλούν) στις κατάλληλες μικροϋποδοχές των μαύρων λωρίδων μικροβυθισμάτων, όπως ορίζονται στο Φύλλο Καταγραφής, χωρίς να αραιώσουμε.
7. Προσθέτουμε 50 μL θετικού μάρτυρα: Υψηλό (εις διπλούν) στις κατάλληλες μικροϋποδοχές των μαύρων λωρίδων μικροβυθισμάτων, όπως ορίζονται στο Φύλλο Καταγραφής, χωρίς να αραιώσουμε.
8. Προσθέτουμε 50 μL του προαραιωμένου διαλύματος πλάσματος του δείγματος (που παρασκευάσαμε στο στάδιο 4) εις διπλούν στις κατάλληλες μικροϋποδοχές των μαύρων λωρίδων μικροβυθισμάτων όπως ορίζονται στο Φύλλο Καταγραφής.
9. Προετοιμάζουμε απόθεμα διαλύματος υποστρώματος. Αφαιρούμε προσεκτικά το πώμα καθώς κάποιο υπόστρωμα μπορεί να κολλήσει στο πλαστικό. Ανασυστούμε το λυοφιλοποιημένο υπόστρωμα προσθέτοντας 37 μL αντιδραστηρίου βαθμού DMSO στο φιαλίδιο του υποστρώματος. Αναμιγνύουμε το διάλυμα και προσθέτουμε 113 μL αντιδραστηρίου βαθμού H₂O. Επανατοποθετούμε το πώμα και κλείνουμε καλά το καπάκι. Ανακατεύουμε καλά ανακατεύοντας απαλά μέχρι να διαλυθεί όλο το περιεχόμενο.
10. Προετοιμάζουμε το διάλυμα υποστρώματος ανάλυσης (3%) σε πλαστικό σωλήνα σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Δείγματα ασθενών για δοκιμή	Όγκος αποθέματος διαλύματος του υποστρώματος (μL)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μL)
1	25	795
5	37	1193
10	53	1714
40*	150	4850

* Αυτό μπορεί να παρασκευαστεί προσθέτοντας ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος απευθείας στο φιαλίδιο αποθέματος υποστρώματος εάν χρησιμοποιείται για δοκιμή σε μία ανάλυση

Δεν ξεχνάμε ότι κατά τις αραιώσεις που πραγματοποιούμε δεν πρέπει να χρησιμοποιούμε επαναλαμβανόμενη πιπέτα.

11. Αναμειγνύουμε καλά το διάλυμα και το προστατεύουμε από το φως. Αμέσως μετά την προετοιμασία, προσθέτουμε 50 μL Διαλύματος Υποστρώματος σε κάθε μικροπηγάδι που περιέχει δείγμα ασθενούς, βαθμονομητή ή μάρτυρα.

Το εναπομείναν διάλυμα υποστρώματος το πωματίζουμε και το φυλάσσουμε σε όρθια θέση στο αρχικό φιαλίδιο με το αρχικό πώμα (σφραγισμένο με περιτύλιγμα Parafilm) στους -20°C στο σκοτάδι. Το επανενυδατωμένο απόθεμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για έως και 6 μήνες μετά την ενυδάτωση.

12. Τοποθετούμε την πλάκα σε φθορόμετρο με Διέγερση = 340 - 350 nm και Εκπομπή = 440 - 450 nm σε θερμοκρασία δωματίου. Διαβάζουμε και καταγράφουμε τα αποτελέσματα ως χρόνο μηδέν.

Η ανάγνωση πραγματοποιείται εντός 5 λεπτών από την προσθήκη του υποστρώματος.

13. Ρυθμίζουμε το χρονόμετρο για 25 λεπτά και ξεκινάμε.

14. Αφαιρούμε την πλάκα από το φθορόμετρο και στην συνέχεια αποθηκεύουμε την πλάκα σε θερμοκρασία δωματίου και την προστατεύουμε από το φως για 25 - 35 λεπτά.

Δεν καλύπτουμε την πλάκα με χαρτί ή χαρτόνι γιατί οι ίνες στην πλάκα μπορούν να προκαλέσουν τυχαίο φθορισμό., για αυτό τον λόγο σκεπάζουμε με αλουμινόχαρτο.

15. Μεταξύ 25 - 35 λεπτών, τοποθετούμε την πλάκα σε φθορόμετρο με Διέγερση = 340 - 350 nm και Εκπομπή = 440 - 450 nm σε θερμοκρασία δωματίου. Διαβάζουμε και καταγράφουμε τα αποτελέσματα.

Αποτελέσματα

Αφαιρούμε τις τιμές φθορισμού χρόνου μηδέν από τις τιμές φθορισμού 25 - 35 λεπτών για όλα τα αποτελέσματα. Κατασκευάζουμε μια καμπύλη βαθμονόμησης σχεδιάζοντας τη μέση τιμή φθορισμού (n=2) για κάθε πρότυπο βαθμονόμησης σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση δραστηριότητας ADAMTS-13. Κάθε φορά που εκτελείται ο προσδιορισμός θα πρέπει να δημιουργείται μια καμπύλη βαθμονόμησης. Προσδιορίζουμε την ποσότητα της δραστηριότητας ADAMTS-13 στο δείγμα πλάσματος χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό φύλλο του Microsoft Excel. Το υπολογιστικό φύλλο βοηθά με διορθώσεις φόντου, γραφήματα και επίλυση της εξίσωσης για τη λήψη υπολογισμένων αποτελεσμάτων (% Κανονική δραστηριότητα ADAMTS-13) για τους ελέγχους και τα δείγματα πλάσματος.

Δείγματα πλάσματος με υπολογισμένες δραστηριότητες ADAMTS-13 μεγαλύτερες από 100% θα πρέπει να αναφέρονται ως >100% Κανονική δραστηριότητα ADAMTS-13 (*H21-A5 Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition, 2008; Huisman et al., 2020; Kokame et al., 2004, 2005*)

Πίνακες

Πίνακας 1. Περιγραφική στατιστική δημογραφικών δεδομένων

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών	M.O ± T.A. ^a	Διάμεσος
<i>Ηλικία</i>	33	70.82±14.16	68
Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών (%)		
Φύλο	33		
Ανδρες	17 (51.5%)		
Γυναίκες	16 (48.5%)		
Έκβαση νόσου	30		
Βαρύτερα Περιστατικά	16 (53.3%)		
Βελτίωση	13 (43.3%)		
Επιδείνωση	1 (3.4%)		
Υποκείμενα Νοσήματα	33		
Κολπική μαρμαρυγή	10		
Οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια	19		

Υπόταση	10
Υπέρταση	9
Οξεία νεφρική ανεπάρκεια	14
Πνευμονία	15

^a Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση

Πίνακας 2. Συσχέτιση του προφίλ δραστηριότητας της μεταλλοπρωτεάσης ADAMTS 13 με τον έλεγχο του πηκτικού μηχανισμού

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών	Προφίλ δραστηριότητας ADAMTS13		Τιμή p*
		<30%	≥30%	
Χρόνος				
Προθρομβίνης				
Φυσιολογικός	3	3 (100%)	0 (0%)	0.23
Παθολογικός	29	17 (58.6%)	12 (41.4%)	
INR				
Φυσιολογικό	23	15 (65.2%)	8 (34.8%)	0.33
Παθολογικό	10	16 (50.0%)	5 (50.0%)	
APTT				
Φυσιολογικός	16	11 (68.8%)	5 (31.3%)	0.28
Παθολογικός	17	9 (52.9%)	8 (47.1%)	

* Υπολογίστηκε με τη δοκιμασία chi square test

Σχόλια: Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο προφίλ δραστηριότητας της ADAMTS 13 με τα αποτελέσματα των εξετάσεων που πραγματοποιούνται για τον έλεγχο της λειτουργίας του πηκτικού μηχανισμού. Αναλυτικότερα, διενέργεια του στατιστικού ελέγχου χ^2 έδειξε ότι η πλειονότητα των ασθενών με μειωμένα επίπεδα της ADAMTS 13 είχαν παθολογικές τιμές στον χρόνο προθρομβίνης και στο INR και φυσιολογικές τιμές στον APTT. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0.05$).

Πίνακας 3. Συσχέτιση του προφίλ έκφρασης των VWF με τον έλεγχο του πηκτικού μηχανισμού

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών	Προφίλ έκφρασης VWF		Τιμή p*
		50<VWF<200	50>VWF>200	
Χρόνος				
Προθρομβίνης				
Φυσιολογικός	3	0 (0%)	3 (100%)	0.82
Παθολογικός	29	2 (6.9%)	27 (93.1%)	
INR				
Φυσιολογικό	23	2 (8.7%)	21 (91.3%)	0.48
Παθολογικό	10	0 (0%)	10 (100.0%)	
APTT				
Φυσιολογικός	16	2 (12.5%)	14 (87.5%)	0.23
Παθολογικός	17	0 (47.1%)	17 (100.0%)	

* Υπολογίστηκε με τη δοκιμασία chi square test

Σχόλια: Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο προφίλ έκφρασης των VWF με τα αποτελέσματα των εξετάσεων που πραγματοποιούνται για τον έλεγχο της λειτουργίας του πηκτικού μηχανισμού. Αναλυτικότερα, η διενέργεια του στατιστικού ελέγχου χ^2 έδειξε ότι η πλειονότητα των ασθενών με μη φυσιολογικές τιμές των επίπεδα VWF είχαν παθολογικές τιμές στον χρόνο προθρομβίνης και στο APTT και φυσιολογικές τιμές INR. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0.05$).

Πίνακας 4. Συσχέτιση του προφίλ δραστηριότητας της μεταλλοπρωτεάσης ADAMTS 13 με τη γενική εξέταση αίματος

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών	Προφίλ δραστηριότητας		Τιμή p*
		ADAMTS13 <30%	ADAMTS13 ≥30%	
Αριθμός ερυθρών				
αιμοσφαιρίων				
Φυσιολογικός	6	3 (50.0%)	3 (50.0%)	0.53
Παθολογικός	24	14 (58.3%)	10 (41.7%)	
Αριθμός				
αιμοπεταλίων				
Φυσιολογικός	12	7 (58.3%)	5 (41.7%)	0.59
Παθολογικός	18	10 (55.6%)	8 (44.4%)	
Αριθμός				
ουδετερόφιλων				
Φυσιολογικός	10	7 (70.0%)	3 (30.0%)	0.26
Παθολογικός	20	10 (50.0%)	10 (50.0%)	
Αριθμός				
λεμφοκυττάρων				
Φυσιολογικός	3	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0.60
Παθολογικός	27	15 (55.6%)	12 (44.4%)	
Αριθμός				
μονοκύτταρων				
Φυσιολογικός	16	10 (62.5%)	6 (37.5%)	0.37
Παθολογικός	14	7 (50.0%)	7 (50.0%)	
Μέσος όγκος				
αιμοπεταλίων				
(MPV)				
Φυσιολογικός	22	13 (59.1%)	9 (40.9%)	0.48
Παθολογικός	8	4 (50.0%)	4 (50.0%)	

* Υπολογίστηκε με τη δοκιμασία chi square test

Σχόλια: Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο προφίλ δραστηριότητας της ADAMTS 13 με τα αποτελέσματα της γενικής εξέτασης αίματος. Αναλυτικότερα, η διενέργεια του στατιστικού ελέγχου χ^2 έδειξε ότι η πλειονότητα των ασθενών με μειωμένη δραστηριότητα της ADAMTS 13 είχαν παθολογικές τιμές αναφορικά με τον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των αιμοπεταλίων, των λεμφοκυττάρων και των ουδετερόφιλων αλλά φυσιολογικές τιμές σε ό,τι αφορά τον αριθμό των μονοκύτταρων και τον μέσο όγκο αιμοπεταλίων. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0.05$).

Πίνακας 5. Συσχέτιση του προφίλ έκφρασης των VWF με τη γενική εξέταση αίματος

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών	Προφίλ έκφρασης VWF		Τιμή p*
		50<VWF<200	50>VWF>200	
Αριθμός ερυθρών				
αιμοσφαιρίων				
Φυσιολογικός	6	1 (16.7%)	5 (83.3%)	0.2
Παθολογικός	24	0 (41.7%)	24 (100%)	
Αριθμός				
αιμοπεταλίων				
Φυσιολογικός	12	1 (8.3%)	11 (91.7%)	0.4
Παθολογικός	18	0 (0 %)	18 (100 %)	
Αριθμός				
ουδετερόφιλων				
Φυσιολογικός	10	1 (10.0%)	9 (90.0%)	0.33
Παθολογικός	20	0 (0%)	20 (100.0%)	
Αριθμός				
λεμφοκυττάρων				
Φυσιολογικός	3	1 (33.3%)	2 (66.7%)	0.10
Παθολογικός	27	0 (0%)	27 (100.0%)	
Αριθμός				
μονοκύτταρων				
Φυσιολογικός	16	1 (6.3 %)	15 (93.8%)	0.53
Παθολογικός	14	0 (0%)	14 (100.0%)	
Μέσος όγκος				
αιμοπεταλίων				
(MPV)				
Φυσιολογικός	22	1 (4.5%)	21 (95.5%)	0.73
Παθολογικός	8	0 (0%)	8 (100.0%)	

* Υπολογίστηκε με τη δοκιμασία chi square test

Σχόλια: Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο προφίλ έκφρασης των VWF με τα αποτελέσματα της γενικής εξέτασης αίματος. Αναλυτικότερα, η διενέργεια του στατιστικού ελέγχου χ^2 έδειξε ότι η πλειονότητα των ασθενών με μη φυσιολογικές τιμές των VWF είχαν παθολογικές τιμές αναφορικά με τον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των αιμοπεταλίων, των λεμφοκυττάρων και των ουδετερόφιλων αλλά φυσιολογικές τιμές σε ότι αφορά τον αριθμό των μονοκύτταρων και τον μέσο όγκο αιμοπεταλίων. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0.05$).

Πίνακας 6. Συσχέτιση του προφίλ δραστηριότητας της μεταλλοπρωτεάσης ADAMTS 13 με ανοσολογικές/βιοχημικές εξετάσεις

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών	Προφίλ δραστηριότητας		Τιμή p*
		ADAMTS13 <30%	ADAMTS13 ≥30%	
CRP				
Φυσιολογική	2	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0.70
Παθολογική	25	14 (56.0%)	11 (44.0%)	
Ουρία				
Φυσιολογική	5	3 (60.0 %)	2 (40.0 %)	0.57
Παθολογική	23	12 (52.2 %)	11 (47.8%)	
Τριγλυκερίδια				
Φυσιολογικά	4	3 (75.0%)	1 (25.0%)	0.75
Παθολογικά	4	3 (75.0%)	1 (25.0%)	
Κρεατινίνη				
Φυσιολογική	16	8 (50.0%)	8 (50.0%)	0.48
Παθολογική	12	7 (58.3%)	5 (41.7%)	
SGOT				
Φυσιολογική	21	11 (52.4 %)	10 (47.6 %)	0.47
Παθολογική	8	5 (62.5 %)	3 (37.5 %)	
LDH				
Φυσιολογική	12	7 (58.3 %)	5 (41.7%)	0.61
Παθολογική	16	9 (56.3 %)	7 (43.8%)	
Χολερυθρίνη				
Φυσιολογική	23	11 (47.8%)	12 (52.2%)	0.21
Παθολογική	5	4 (80.0%)	1 (20.0%)	
Άμηση				
Χολερυθρίνη				
Φυσιολογική	16	8 (50.0%)	8 (50.0%)	0.48
Παθολογική	12	7 (58.3%)	5 (41.7%)	
Λευκοματίνη				
Φυσιολογική	4	3 (75%)	1 (25%)	0.46
Παθολογική	11	6 (54.5%)	5 (45.5%)	

* Υπολογίστηκε με τη δοκιμασία chi square test

Σχόλια: Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο προφίλ δραστηριότητας της ADAMTS 13 με τα αποτελέσματα ανοσολογικών και βιοχημικών εξετάσεων. Αναλυτικότερα, η διενέργεια του στατιστικού ελέγχου χ^2 έδειξε ότι η

πλειονότητα των ασθενών με μειωμένη δραστηριότητα της ADAMTS 13 είχαν παθολογικές τιμές αναφορικά με CRP, ουρία, LDH και λευκωματίνη αλλά φυσιολογικές τιμές σε ότι αφορά τη χολερυθρίνη, την κρεατινίνη και τη SGOT. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0.05$).

Πίνακας 7. Συσχέτιση του προφίλ έκφρασης των VWF με ανοσολογικές/βιοχημικές εξετάσεις

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών	Προφίλ έκφρασης VWF		Τιμή p*
		50<VWF<200	50>VWF>200	
CRP				
Φυσιολογική	2	0 (0%)	2 (100.0%)	0.93
Παθολογική	25	1 (4.0%)	24 (96.0%)	
Ουρία				
Φυσιολογική	5	1 (20.0 %)	4 (80.0 %)	0.18
Παθολογική	23	0 (0%)	23 (100.0 %)	
Κρεατινίνη				
Φυσιολογική	16	0 (0%)	16 (100.0%)	0.43
Παθολογική	12	1 (8.3%)	11 (91.7%)	
SGOT				
Φυσιολογική	21	0 (0%)	21 (100.0 %)	0.27
Παθολογική	8	1 (12.5 %)	7 (87.5 %)	
LDH				
Φυσιολογική	12	0 (0%)	12 (100 %)	0.57
Παθολογική	16	1 (6.3%)	15 (93.8 %)	
Χολερυθρίνη				
Φυσιολογική	23	0 (0%)	23 (100.0%)	0.18
Παθολογική	5	1 (20.0%)	4 (80.0%)	
Άμεση Χολερυθρίνη				
Φυσιολογική	16	0 (0%)	16 (100.0%)	0.48
Παθολογική	12	1 (8.3%)	11 (91.7%)	
Λευκωματίνη				
Φυσιολογική	4	0 (0%)	4 (100.0%)	0.73
Παθολογική	11	1 (9.1 %)	10 (90.9%)	

* Υπολογίστηκε με τη δοκιμασία chi square test

Σχόλια: Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο προφίλ έκφρασης των VWF με τα αποτελέσματα ανοσολογικών και βιοχημικών εξετάσεων. Αναλυτικότερα, η διενέργεια του στατιστικού ελέγχου χ^2 έδειξε ότι η πλειονότητα των ασθενών με αυξημένα επίπεδα της VWF είχαν παθολογικές τιμές αναφορικά με CRP, ουρία, LDH και

λευκωματίνη αλλά φυσιολογικές τιμές σε ότι αφορά τη χολερυθρίνη, την κρεατινίνη και τη SGOT. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0.05$).

Πίνακας 8. Συσχέτιση του προφίλ έκφρασης των VWF με έκβαση της νόσου

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών	Προφίλ έκφρασης VWF		Τιμή p*
		50<VWF<200	50>VWF>200	
Έκβαση νόσου				
Βαρύτερα				
Περιστατικά	16	0 (50.0%)	16 (100.0%)	0.5
Βελτίωση	13	1 (7.70%)	12 (92.3%)	
Επιδείνωση	1	0 (0%)	1 (100 %)	

* Υπολογίστηκε με τη δοκιμασία chi square test

Σχόλια: Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο προφίλ έκφρασης των VWF με την έκβαση της νόσου. Αναλυτικότερα, η διενέργεια του στατιστικού ελέγχου χ^2 έδειξε ότι η πλειονότητα των ασθενών με αυξημένα επίπεδα της VWF παρουσίασε βελτιωμένη κλινική εικόνα, ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0.05$).

Πίνακας 9. Συσχέτιση του προφίλ δραστηριότητας της ADAMTS 13 με την έκβαση της νόσου

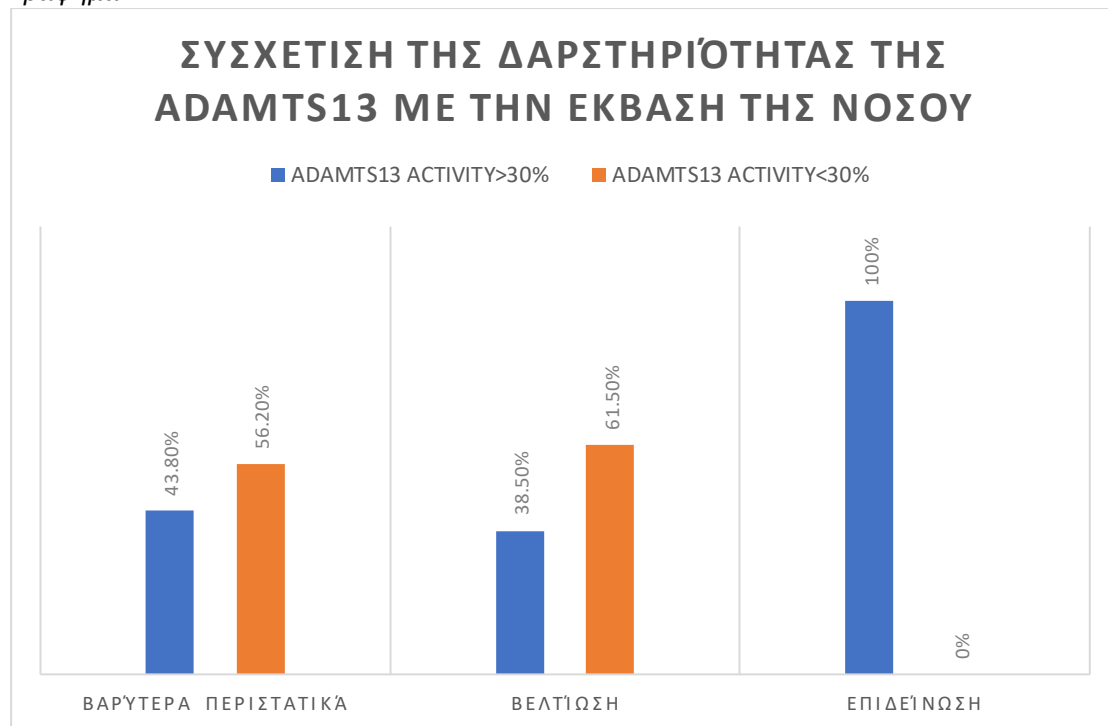
Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών	Προφίλ έκφρασης ADAMTS13		Τιμή p*
		<30%	≥30%	
Έκβαση νόσου				
Βαρύτερα				
Περιστατικά	16	9 (56.2%)	7 (43.8%)	0.4
Βελτίωση	13	8 (61.5%)	5 (38.5%)	
Επιδείνωση	1	0 (0 %)	1 (100.0%)	

* Υπολογίστηκε με τη δοκιμασία chi square test

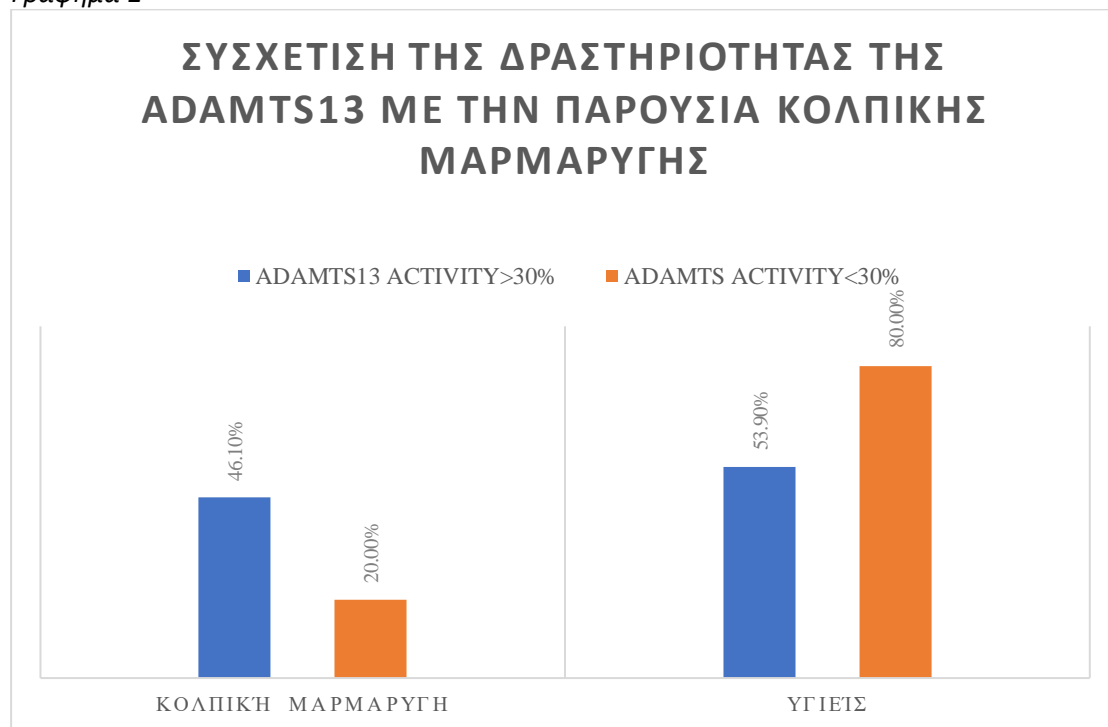
Σχόλια: Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο προφίλ δραστηριότητας της ADAMTS 13 με την έκβαση της νόσου. Αναλυτικότερα, η διενέργεια του στατιστικού ελέγχου χ^2 έδειξε ότι η πλειονότητα των ασθενών με μειωμένη δραστηριότητα της ADAMTS 13 απεβίωσε, ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0.05$).

Διαγράμματα

Γράφημα 1



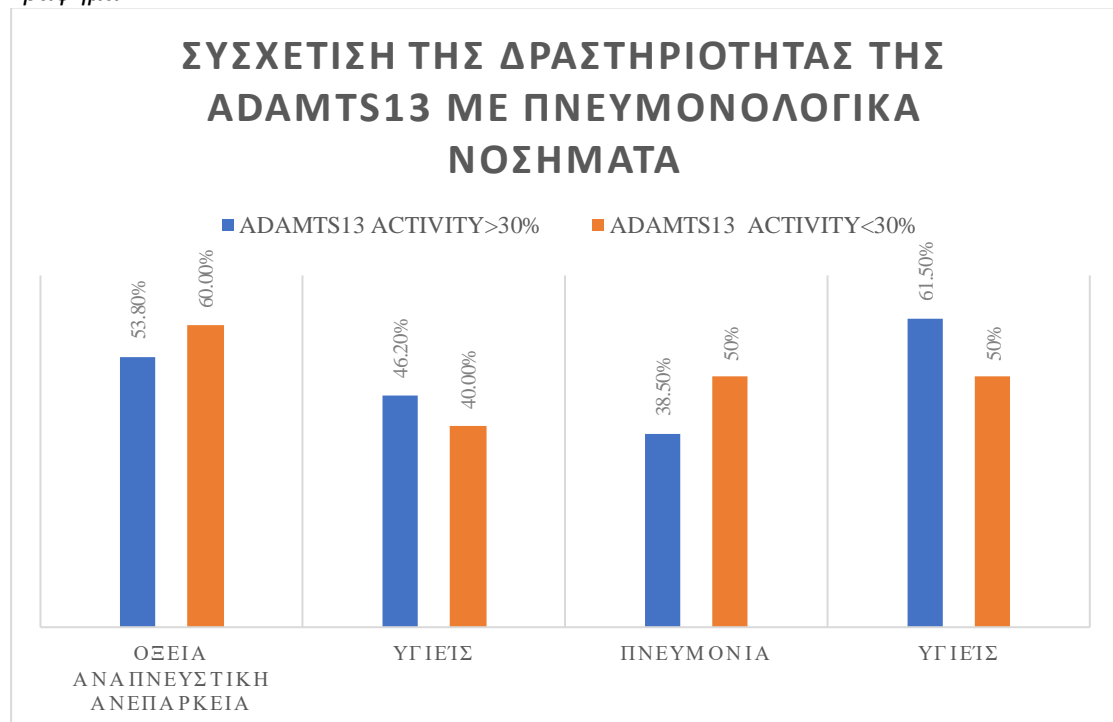
Γράφημα 2



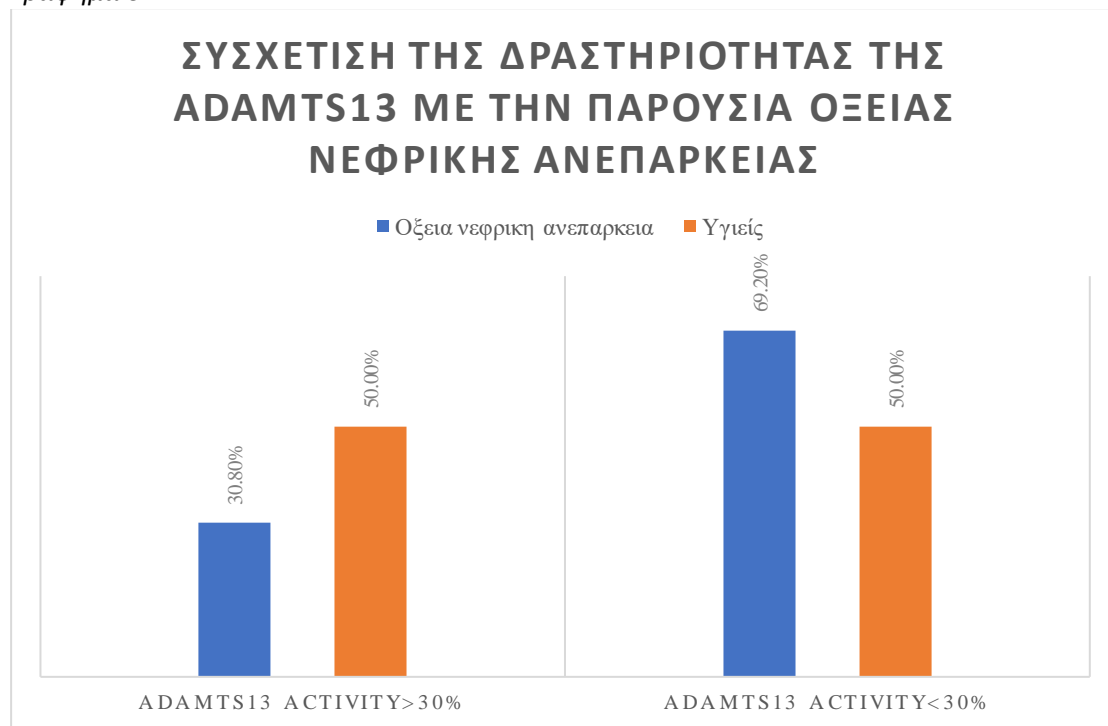
Γράφημα 3



Γράφημα 4



Γράφημα 5



Συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψη τόσο το θεωρητικό υπόβαθρο, όσο και τις προηγούμενες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για τα επίπεδα ADAMTS13 και τον παράγοντα VWF, φαίνεται ότι τα αποτελέσματα της έρευνας στους ασθενείς με COVID-19 παρουσιάζουν όμοιες σχέσεις με αυτές που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες αναφορές. Παρατηρήθηκε λοιπόν, ότι η μειωμένη δραστηριότητα ADAMTS13 σχετίζεται με παθολογικές τιμές του χρόνου προθρομβίνης και του INR. Παθολογικές ήταν επίσης οι τιμές των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των αιμοπεταλίων, των λεμφοκυττάρων και των ουδετερόφιλων. Όσο αφορά τις ανοσολογικές και βιοχημικές εξετάσεις των ασθενών, η μειωμένη δραστηριότητα ADAMTS13 είχε ως αποτέλεσμα παθολογικές τιμές CRP, ουρίας, LDH, και λευκωματίνης. Σχετικά με την έκβαση της νόσου COVID-19, παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με βαρύτερα περιστατικά είχαν όλοι μειωμένη δραστηριότητα ADAMTS13. Τα διαγράμματα παρουσιάζουν την σχέση μεταξύ της δραστηριότητας της ADAMTS13 και άλλων

υποκείμενων νοσημάτων. Ειδικότερα παρατηρήθηκε ότι η μειωμένη δραστηριότητα της μεταλλοπρωτεάσης συνδέεται με υπόταση, οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια, πνευμονία και οξεία νεφρική ανεπάρκεια. Δεδομένου ότι στη μελέτη αυτή δεν υπήρξε σημαντική στατιστική διαφορά ($p>0.05$), απαιτείται περισσότερη έρευνα για τον προσδιορισμό της προγνωστικής αξίας του άξονα VWF/ADAMTS13 σε ασθενείς με COVID-19.

Βιβλιογραφία

1. Abassi, Z., Assady, S., Khoury, E. E., & Heyman, S. N. (2020). Letter to the editor: Angiotensin-converting enzyme 2: An ally or a Trojan horse? Implications to SARS-CoV-2-related cardiovascular complications. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *318*(5), H1080–H1083. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00215.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH40052030800001.JPEG>
2. Acanfora, D., Acanfora, C., Ciccone, M. M., Scicchitano, P., Bortone, A. S., Ugucioni, M., & Casucci, G. (2021). The Cross-Talk between Thrombosis and Inflammatory Storm in Acute and Long-COVID-19: Therapeutic Targets and Clinical Cases. *Viruses*, *13*(10). <https://doi.org/10.3390/V13101904>
3. Akiyama, M., Takeda, S., Kokame, K., Takagi, J., & Miyata, T. (2009). Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(46), 19274–19279. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0909755106>
4. AMOROSI, E. L. M. D. ;, & ULTMANN, J. E. M. D. (1966). THROMBOTIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA: REPORT OF 16 CASES AND... : Medicine. *Medicine*, *45*(2), 139–160. https://journals.lww.com/md-journal/Citation/1966/03000/THROMBOTIC_THROMBOCYTOPENIC_PURPURA__REPORT_OF_16.3.aspx
5. AMOROSI, E., Medicine, J. U.-, & 1966, undefined. (n.d.). Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of the literature. *Journals.Lww.Com*. Retrieved August 28, 2022, from https://journals.lww.com/md-journal/Citation/1966/03000/THROMBOTIC_THROMBOCYTOPENIC_PURPURA__REPORT_OF_16.3.aspx
6. Asada, Y., Sumiyoshi, A., Hayashi, T., Suzumiya, J., & Kaketani, K. (1985). Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thrombosis Research*, *38*(5), 469–479. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(85\)90180-X](https://doi.org/10.1016/0049-3848(85)90180-X)
7. Ashraf, U. M., Abokor, A. A., Edwards, J. M., Waigi, E. W., Royfman, R. S., Hasan, S. A. M., Smedlund, K. B., Hardy, A. M. G., Chakravarti, R., & Koch, L. G. (2021). Sars-cov-2, ace2 expression, and systemic organ invasion. *Physiological Genomics*, *53*(2), 51–60. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00087.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/AJ-PGEN200022F002.JPEG>
8. Barbot, J., Costa, E., Guerra, M., Barreirinho, M. S., Isvarlal, P., Robles, R., Gerritsen, H. E., Lämmle, B., & Furlan, M. (2001). Ten years of prophylactic treatment with

- fresh-frozen plasma in a child with chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura as a result of a congenital deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease. *British Journal of Haematology*, 113(3), 649–651.
<https://doi.org/10.1046/J.1365-2141.2001.02808.X>
9. Barrett, T. J., Bilaloglu, S., Cornwell, M., Burgess, H. M., Virginio, V. W., Drenkova, K., Ibrahim, H., Yuriditsky, E., Aphinyanaphongs, Y., Lifshitz, M., Xia Liang, F., Alejo, J., Smith, G., Pittaluga, S., Rapkiewicz, A. v., Wang, J., Iancu-Rubin, C., Mohr, I., Ruggles, K., ... Berger, J. S. (2021). Platelets contribute to disease severity in COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 19(12), 3139–3153.
<https://doi.org/10.1111/JTH.15534>
 10. Bazzan, M., Montaruli, B., Sciascia, S., Cosseddu, D., Norbiato, C., & Roccatello, D. (2020). Low ADAMTS 13 plasma levels are predictors of mortality in COVID-19 patients. *Internal and Emergency Medicine*, 15(5), 861.
<https://doi.org/10.1007/S11739-020-02394-0>
 11. Bester, J., & Pretorius, E. (2016). Effects of IL-1β, IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets and clot viscoelasticity OPEN. <https://doi.org/10.1038/srep32188>
 12. Bettoni, G., Palla, R., Valsecchi, C., Consonni, D., Lotta, L. A., Trisolini, S. M., Mancini, I., Musallam, K. M., Rosendaal, F. R., & Peyvandi, F. (2012). ADAMTS-13 activity and autoantibodies classes and subclasses as prognostic predictors in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 10(8), 1556–1565. <https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2012.04808.X>
 13. Black, R. A., & White, J. M. (1998). ADAMs: focus on the protease domain. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(5), 654–659. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80042-2](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80042-2)
 14. Blasi, A., von Meijenfeldt, F. A., Adelmeijer, J., Calvo, A., Ibañez, C., Perdomo, J., Reverter, J. C., & Lisman, T. (2020). In vitro hypercoagulability and ongoing in vivo activation of coagulation and fibrinolysis in COVID-19 patients on anticoagulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 18(10), 2646–2653.
<https://doi.org/10.1111/JTH.15043>
 15. Bork, P., & Beckmann, G. (1993). The CUB Domain: A Widespread Module in Developmentally Regulated Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 231(2), 539–545.
<https://doi.org/10.1006/JMBI.1993.1305>
 16. C Sit, T. H., Brackman, C. J., Ming Ip, S., S Tam, K. W., T Law, P. Y., W To, E. M., T Yu, V. Y., Sims, L. D., C Tsang, D. N., W Chu, D. K., P M Perera, R. A., M Poon, L. L., & Peiris, M. (2020). Infection of dogs with SARS-CoV-2. | *Nature* |, 586.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2334-5>
 17. Cal, S., Obaya, A. J., Llamazares, M., Garabaya, C., Quesada, V., & López-Otín, C. (2002). Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene*, 283(1–2), 49–62. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00861-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00861-7)
 18. Casina, V. C., Hu, W., Mao, J. H., Lu, R. N., Hanby, H. A., Pickens, B., Kan, Z. Y., Lim, W. K., Mayne, L., Ostertag, E. M., Kacir, S., Siegel, D. L., Englander, S. W., & Zheng, X. L. (2015). High-resolution epitope mapping by HX MS reveals the pathogenic mechanism and a possible therapy for autoimmune TTP syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(31), 9620–9625. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1512561112>
 19. Chan, J. F. W., Kok, K. H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K. W., Yuan, S., & Yuen, K. Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 221–236. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>

20. Chandrashekar, A., Liu, J., Martinot, A. J., McMahan, K., Mercado, N. B., Peter, L., Tostanoski, L. H., Yu, J., Maliga, Z., Nekorchuk, M., Busman-Sahay, K., Terry, M., Wrijil, L. M., Ducat, S., Martinez, D. R., Atyeo, C., Fischinger, S., Burke, J. S., Sleim, M. D., ... Barouch, D. H. (n.d.). *SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques*.
21. Chauhan, A. K., Motto, D. G., Lamb, C. B., Bergmeier, W., Dockal, M., Plaimauer, B., Scheiflinger, F., Ginsburg, D., & Wagner, D. D. (2006). Systemic antithrombotic effects of ADAMTS13. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(3), 767. <https://doi.org/10.1084/JEM.20051732>
22. Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., & Ning, Q. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(5), 2620–2629. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>
23. Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., & Zhang, L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
24. Chen, W., & Pan, J. Y. (2021). Anatomical and Pathological Observation and Analysis of SARS and COVID-19: Microthrombosis Is the Main Cause of Death. *Biological Procedures Online*, 23(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12575-021-00142-Y/METRICS>
25. Cicala, C., & Cirino, G. (1998). Linkage between inflammation and coagulation: An update on the molecular basis of the crosstalk. *Life Sciences*, 62(20), 1817–1824. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(97\)01167-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(97)01167-3)
26. Colige, A., Sieron, A. L., Li, S. W., Schwarze, U., Petty, E., Wertelecki, W., Wilcox, W., Krakow, D., Cohn, D. H., Reardon, W., Byers, P. H., Lapière, C. M., Prockop, D. J., & Nusgens, B. v. (1999). Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *American Journal of Human Genetics*, 65(2), 308–317. <https://doi.org/10.1086/302504>
27. *Coronavirus disease (COVID-19)*. (n.d.). Retrieved August 28, 2022, from https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019?adgroupsurvey={adgroupsurvey}&gclid=CjwKCAjwpKyYBhB7EiwAU2Hn2QaUE1cy3xtaPoJZLHbvi55DhyC-XS5WJs5NJ8jqEo_bFVYLbaOBBoChbiQAvD_BwE
28. Cugno, M., Meroni, P. L., Gualtierotti, R., Griffini, S., Grovetti, E., Torri, A., Panigada, M., Aliberti, S., Blasi, F., Tedesco, F., & Peyvandi, F. (2020). Complement activation in patients with COVID-19: A novel therapeutic target. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 146(1), 215–217. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2020.05.006>
29. de Stoppelaar, S. F., van 't Veer, C., & van der Poll, T. (2014). The role of platelets in sepsis. *Thrombosis and Haemostasis*, 112(4), 666–677. <https://doi.org/10.1160/TH14-02-0126/ID/JR0126-5>
30. Delrue, M., Siguret, V., Neuwirth, M., Joly, B., Beranger, N., Sène, D., Chousterman, B. G., Voicu, S., Bonnin, P., Mégarbane, B., & Stéphanian, A. (2021). von Willebrand factor/ADAMTS13 axis and venous thromboembolism in moderate-to-severe COVID-19 patients. *British Journal of Haematology*, 192(6), 1097–1100. <https://doi.org/10.1111/BJH.17216>
31. Egan, J. A., Hay, S. N., & Brecher, M. E. (2004). Frequency and significance of schistocytes in TTP/HUS patients at the discontinuation of plasma exchange therapy. *Journal of Clinical Apheresis*, 19(4), 165–167. <https://doi.org/10.1002/JCA.20017>

32. Escher, R., Breakey, N., & Lämmle, B. (2020a). Severe COVID-19 infection associated with endothelial activation. *Thrombosis Research*, *190*, 62. <https://doi.org/10.1016/J.THROMRES.2020.04.014>
33. Escher, R., Breakey, N., & Lämmle, B. (2020b). ADAMTS13 activity, von Willebrand factor, factor VIII and D-dimers in COVID-19 inpatients. *Thrombosis Research*, *192*, 174–175. <https://doi.org/10.1016/J.THROMRES.2020.05.032>
34. Esmon, C. T., Xu, J., & Lupu, F. (2011). Innate immunity and coagulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, *9 Suppl 1*(Suppl 1), 182–188. <https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2011.04323.X>
35. Favaloro, E. J., Henry, B. M., & Lippi, G. (2021). Increased VWF and Decreased ADAMTS-13 in COVID-19: Creating a Milieu for (Micro)Thrombosis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, *47*(4), 400–418. <https://doi.org/10.1055/S-0041-1727282>
36. Ferrari, S., Scheiflinger, F., Rieger, M., Mudde, G., Wolf, M., Coppo, P., Girma, J. P., Azoulay, E., Brun-Buisson, C., Fakhouri, F., Mira, J. P., Oksenhendler, E., Poullin, P., Rondeau, E., Schleinitz, N., Schlemmer, B., Teboul, J. L., Vanhille, P., Vernant, J. P., ... Veyradier, A. (2007). 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*, *109*(7), 2815–2822. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-02-006064>
37. Fujikawa, K., Suzuki, H., McMullen, B., & Chung, D. (2001). *Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family*. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/98/6/1662/1676489/h8180101662.pdf>
38. Furlan, M., & Lämmle, B. (2001). Aetiology and pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome: the role of von Willebrand factor-cleaving protease. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, *14*(2), 437–454. <https://doi.org/10.1053/BEHA.2001.0142>
39. Furlan, M., Rubles, R., Solenthaler, M., Wassmer, M., Sandoz, P., & Lämmle, B. (1997). Deficient Activity of von Willebrand Factor–Cleaving Protease in Chronic Relapsing Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Blood*, *89*(9), 3097–3103. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V89.9.3097>
40. George, J. N. (2000). How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura–hemolytic uremic syndrome. *Blood*, *96*(4), 1223–1229. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V96.4.1223>
41. George, J. N., & Al-Nouri, Z. L. (2012). Diagnostic and therapeutic challenges in the thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndromes. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, *2012*, 604–609. <https://doi.org/10.1182/ASHEDUCATION-2012.1.604>
42. George, J. N., Nester, C. M., & McIntosh, J. J. (2015). Syndromes of thrombotic microangiopathy associated with pregnancy. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, *2015*(1), 644–648. <https://doi.org/10.1182/ASHEDUCATION-2015.1.644>
43. Gerritsen, H. E., Robles, R., Lämmle, B., & Furlan, M. (2001). Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor–cleaving protease. *Blood*, *98*(6), 1654–1661. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V98.6.1654>
44. Goshua, G., Pine, A. B., Meizlish, M. L., Chang, C. H., Zhang, H., Bahel, P., Baluha, A., Bar, N., Bona, R. D., Burns, A. J., dela Cruz, C. S., Dumont, A., Halene, S., Hwa, J., Koff, J., Menninger, H., Neparidze, N., Price, C., Siner, J. M., ... Lee, A. I. (2020). Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-

- centre, cross-sectional study. *The Lancet. Haematology*, 7(8), e575–e582.
[https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(20\)30216-7](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30216-7)
45. Guven, G., Ince, C., Topeli, A., & Caliskan, K. (2021). Cardio-Pulmonary-Renal Consequences of Severe COVID-19. *Cardiorenal Medicine*, 11(3), 133–139.
<https://doi.org/10.1159/000516740>
 46. *H21-A5 Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition*. (2008). www.clsi.org.
 47. Hanff, T. C., Mohareb, A. M., Giri, J., Cohen, J. B., & Chirinos, J. A. (2020). Thrombosis in COVID-19. *American Journal of Hematology*, 95(12), 1578–1589.
<https://doi.org/10.1002/AJH.25982>
 48. Hansson, G. K., Robertson, A. K. L., & Söderberg-Nauclér, C. (2006). INFLAMMATION AND ATHEROSCLEROSIS.
<https://doi.org/10.1146/Annurev.Pathol.1.110304.100100>, 1, 297–329.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PATHOL.1.110304.100100>
 49. Helms, J., Tacquard, C., Severac, F., Leonard-Lorant, I., Ohana, M., Delabranche, X., Merdji, H., Clere-Jehl, R., Schenck, M., Fagot Gandet, F., Fafi-Kremer, S., Castelain, V., Schneider, F., Grunebaum, L., Anglés-Cano, E., Sattler, L., Mertes, P. M., & Meziani, F. (2020). High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Medicine*, 46(6), 1089.
<https://doi.org/10.1007/S00134-020-06062-X>
 50. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271–280.e8.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.052>
 51. Htet, Z., & Karim, M. (2020). Thrombotic Microangiopathy with Renal Injury: An Approach for the General Physician: <https://doi.org/10.4997/Jrcpe.2020.107>, 50(1), 25–31. <https://doi.org/10.4997/JRCPE.2020.107>
 52. Hu, D., Zhu, C., Ai, L., He, T., Wang, Y., Ye, F., Yang, L., Ding, C., Zhu, X., Lv, R., Zhu, J., Hassan, B., Feng, Y., Tan, W., & Wang, C. (2018). Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41426-018-0155-5>
 53. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 497–506.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
 54. Huang, J., Roth, R., Heuser, J. E., & Sadler, J. E. (2009). Integrin $\alpha\beta3$ on human endothelial cells binds von Willebrand factor strings under fluid shear stress. *Blood*, 113(7), 1589–1597. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-05-158584>
 55. Huisman, A., Beun, R., Sikma, M., Westerink, J., & Kusadasi, N. (2020). Involvement of ADAMTS13 and von Willebrand factor in thromboembolic events in patients infected with SARS-CoV-2. *International Journal of Laboratory Hematology*, 42(5), e211. <https://doi.org/10.1111/IJLH.13244>
 56. I SCHULMAN, M PIERCE, A LUKENS, & Z CURRIMBHOY. (1960). Studies on thrombopoiesis. I. A factor in normal human plasma required for platelet production; chronic thrombocytopenia due to its deficiency. *Blood*, 16, 943–957.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14443744/>
 57. Imanirad, I., Rajasekhar, A., & Zumberg, M. (2012). A case series of atypical presentations of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Journal of Clinical*

- Apheresis*, 27(4), 221–226. <https://doi.org/10.1002/JCA.21216>
58. *Involvement of ADAMTS13 and von Willebrand factor in thromboembolic events in patients infected with SARS-CoV-2.* (2020). <https://doi.org/10.1111/ijlh.13244>
 59. Jacobs, J. L., Bain, W., Naqvi, A., Staines, B., Castanha, P. M. S., Yang, H., Boltz, V. F., Barratt-Boyes, S., Marques, E. T. A., Mitchell, S. L., Methé, B., Olonisakin, T. F., Haidar, G., Burke, T. W., Petzold, E., Denny, T., Woods, C. W., McVerry, B. J., Lee, J. S., ... Mellors, J. W. (2022). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viremia Is Associated With Coronavirus Disease 2019 Severity and Predicts Clinical Outcomes. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 74(9), 1525–1533. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAB686>
 60. Jimenez-Guardeño, J. M., Nieto-Torres, J. L., DeDiego, M. L., Regla-Nava, J. A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodríguez, C., & Enjuanes, L. (2014). The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein is a determinant of viral pathogenesis. *PLoS Pathogens*, 10(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004320>
 61. Jin, S. Y., Skipwith, C. G., & Zheng, X. L. (2010). Amino acid residues Arg659, Arg660, and Tyr661 in the spacer domain of ADAMTS13 are critical for cleavage of von Willebrand factor. *Blood*, 115(11), 2300–2310. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-07-235101>
 62. Kanth Manne, B., Denorme, F., Middleton, E. A., Portier, I., Rowley, J. W., Stubben, C., Petrey, A. C., Tolley, N. D., Guo, L., Cody, M., Weyrich, A. S., Yost, C. C., Rondina, M. T., & Campbell, R. A. (2020). Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood*, 136(11), 1317–1329. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2020007214>
 63. Klaus, C., Plaimauer, B., Studt, J. D., Dorner, F., Lämmle, B., Mannucci, P. M., & Scheiflinger, F. (2004). Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 103(12), 4514–4519. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-12-4165>
 64. Klok, F. A., Kruij, M. J. H. A., van der Meer, N. J. M., Arbous, M. S., Gommers, D. A. M. P. J., Kant, K. M., Kaptein, F. H. J., van Paassen, J., Stals, M. A. M., Huisman, M. v., & Endeman, H. (2020). Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thrombosis Research*, 191, 145–147. <https://doi.org/10.1016/J.THROMRES.2020.04.013>
 65. Kokame, K., Matsumoto, M., Fujimura, Y., & Miyata, T. (2004). VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood*, 103(2), 607–612. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-08-2861>
 66. Kokame, K., Matsumoto, M., Soejima, K., Yagi, H., Ishizashi, H., Funato, M., Tamai, H., Konno, M., Kamide, K., Kawano, Y., Miyata, T., & Fujimura, Y. (2002). Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), 11902–11907. <https://doi.org/10.1073/PNAS.172277399>
 67. Kokame, K., Nobe, Y., Kokubo, Y., Okayama, A., & Miyata, T. (2005). FRETS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *British Journal of Haematology*, 129(1), 93–100. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.2005.05420.X>
 68. Ladikou, E. E., Sivaloganathan, H., Milne, K. M., Arter, W. E., Ramasamy, R., Saad, R., Stoneham, S. M., Philips, B., Eziefula, A. C., & Chevassut, T. (2020). Von Willebrand factor (vWF): marker of endothelial damage and thrombotic risk in COVID-19? *Clinical Medicine*, 20(5), e178. <https://doi.org/10.7861/CLINMED.2020-0346>
 69. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L.,

- & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, *581*(7807), 215–220.
<https://doi.org/10.1038/S41586-020-2180-5>
70. Lau, S. K. P., Luk, H. K. H., Wong, A. C. P., Li, K. S. M., Zhu, L., He, Z., Fung, J., Chan, T. T. Y., Fung, K. S. C., & Woo, P. C. Y. (2020). Possible Bat Origin of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerging Infectious Diseases*, *26*(7), 1542–1547. <https://doi.org/10.3201/EID2607.200092>
 71. Lazzari, M. A., Sanchez-Luceros, A., Woods, A. I., Alberto, M. F., & Meschengieser, S. S. (2013). Von Willebrand factor (VWF) as a risk factor for bleeding and thrombosis. <https://doi.org/10.1179/102453312X13336169156618>, *17*(SUPPL. 1).
<https://doi.org/10.1179/102453312X13336169156618>
 72. Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology*, *5*(4), 562–569. <https://doi.org/10.1038/S41564-020-0688-Y>
 73. Levi, M., Thachil, J., Iba, T., & Levy, J. H. (2020). Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *The Lancet. Haematology*, *7*(6), e438–e440. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(20\)30145-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30145-9)
 74. Levy, G. G., Nichols, W. C., Lian, E. C., Foroud, T., McClintick, J. N., McGee, B. M., Yang, A. Y., Siemieniak, D. R., Stark, K. R., Gruppo, R., Sarode, R., Shurin, S. B., Chandrasekaran, V., Stabler, S. P., Sabio, H., Bouhassira, E. E., Upshaw, J. D., Ginsburg, D., & Tsai, H. M. (2001). Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* *2001* *413*:6855, *413*(6855), 488–494. <https://doi.org/10.1038/35097008>
 75. Li, Y., Schneider, A. M., Mehta, A., Sade-Feldman, M., Kays, K. R., Gentili, M., Charland, N. C., Gonye, A. L. K., Gushterova, I., Khanna, H. K., LaSalle, T. J., Lavin-Parsons, K. M., Lilley, B. M., Lodenstein, C. L., Manakongtreecheep, K., Margolin, J. D., McKaig, B. N., Parry, B. A., Rojas-Lopez, M., ... Li, J. Z. (2021). SARS-CoV-2 viremia is associated with distinct proteomic pathways and predicts COVID-19 outcomes. *The Journal of Clinical Investigation*, *131*(13), 148635–148635. <https://doi.org/10.1172/JCI148635>
 76. Libby, P., & Lüscher, T. (2020). COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *European Heart Journal*, *41*(32), 3038–3044. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHAA623>
 77. Lillicrap, D. (2013). von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. *Hematology*, *2013*(1), 254–260. <https://doi.org/10.1182/ASHEDUCATION-2013.1.254>
 78. Lip, G. Y. H., & Blann, A. (1997). von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? *Cardiovascular Research*, *34*(2), 255–265. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(97\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(97)00039-4)
 79. Liu, P., Chen, W., & Chen, J. P. (2019). Viral Metagenomics Revealed Sendai Virus and Coronavirus Infection of Malayan Pangolins (*Manis javanica*). *Viruses* *2019*, Vol. *11*, Page 979, *11*(11), 979. <https://doi.org/10.3390/V11110979>
 80. Liu, Y., Mao, B., Liang, S., Yang, J. W., Lu, H. W., Chai, Y. H., Wang, L., Zhang, L., Li, Q. H., Zhao, L., He, Y., Gu, X. L., Ji, X. bin, Li, L., Jie, Z. J., Li, Q., Li, X. Y., Lu, H. Z., Zhang, W. H., ... Xu, J. F. (2020). Association between age and clinical characteristics and outcomes of COVID-19. *The European Respiratory Journal*, *55*(5). <https://doi.org/10.1183/13993003.01112-2020>
 81. Liverani, E., Mondrinos, M. J., Sun, S., Kunapuli, S. P., & Kilpatrick, L. E. (2018). Role of Protein Kinase C-delta in regulating platelet activation and platelet-leukocyte interaction during sepsis. *PLOS ONE*, *13*(4), e0195379. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0195379>

82. Long Zheng, X., Wu, H. M., Shang, D., Falls, E., Skipwith, C. G., Cataland, S. R., Bennett, C. L., & Kwaan, H. C. (2010). Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, *95*(9), 1555–1562. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2009.019299>
83. Lopez-Castaneda, S., García-Larragoiti, N., Cano-Mendez, A., Blancas-Ayala, K., Damian-Vázquez, G., Perez-Medina, A. I., Chora-Hernández, L. D., Areal-Martínez, C., & Viveros-Sandoval, M. E. (2021). Inflammatory and Prothrombotic Biomarkers Associated With the Severity of COVID-19 Infection. *Clin Appl Thromb Hemost*, *27*, 1076029621999099–1076029621999099. <https://doi.org/10.1177/1076029621999099>
84. Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)*, *395*(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
85. Luken, B. M., Turenhout, E. A. M., Hulstein, J. J. J., van Mourik, J. A., Fijnheer, R., & Voorberg, J. (2005). The spacer domain of ADAMTS13 contains a major binding site for antibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thrombosis and Haemostasis*, *93*(2), 267–274. <https://doi.org/10.1160/TH04-05-0301>
86. Magro, C., Mulvey, J. J., Berlin, D., Nuovo, G., Salvatore, S., Harp, J., Baxter-Stoltzfus, A., & Laurence, J. (2020). Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: A report of five cases. *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *220*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.TRSL.2020.04.007>
87. Maino, A., Siegerink, B., Lotta, L. A., Crawley, J. T. B., le Cessie, S., Leebeek, F. W. G., Lane, D. A., Lowe, G. D. O., Peyvandi, F., & Rosendaal, F. R. (2015). Plasma ADAMTS-13 levels and the risk of myocardial infarction: an individual patient data meta-analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, *13*(8), 1396–1404. <https://doi.org/10.1111/JTH.13032>
88. Mancini, I., Baronciani, L., Artoni, A., Colpani, P., Biganzoli, M., Cozzi, G., Novembrino, C., Boscolo Anzoletti, M., de Zan, V., Pagliari, M. T., Gualtierotti, R., Aliberti, S., Panigada, M., Grasselli, G., Blasi, F., & Peyvandi, F. (2021). The ADAMTS13-von Willebrand factor axis in COVID-19 patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, *19*(2), 513–521. <https://doi.org/10.1111/JTH.15191>
89. Mariotte, E., Azoulay, E., Galicier, L., Rondeau, E., Zouiti, F., Boisseau, P., Poullin, P., de Maistre, E., Provôt, F., Delmas, Y., Perez, P., Benhamou, Y., Stepanian, A., Coppo, P., & Veyradier, A. (2016). 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. *The Lancet Haematology*, *3*(5), e237–e245. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(16\)30018-7](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(16)30018-7)
90. Martinelli, N., Montagnana, M., Pizzolo, F., Friso, S., Salvagno, G. L., Forni, G. L., Gianesin, B., Morandi, M., Lunardi, C., Lippi, G., Polati, E., Olivieri, O., & de Franceschi, L. (2020). A relative ADAMTS13 deficiency supports the presence of a secondary microangiopathy in COVID 19. *Thrombosis Research*, *193*, 170–172. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.07.034>
91. Martines, R. B., Ritter, J. M., Matkovic, E., Gary, J., Bollweg, B. C., Bullock, H., Goldsmith, C. S., Silva-Flannery, L., Seixas, J. N., Reagan-Steiner, S., Uyeki, T., Denison, A., Bhatnagar, J., Shieh, W. J., Zaki, S. R., Cole, R., Lewis, A., Fair, P., & Estetter, L. (2020). Pathology and Pathogenesis of SARS-CoV-2 Associated with Fatal

- Coronavirus Disease, United States - Volume 26, Number 9—September 2020 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerging Infectious Diseases*, 26(9), 2005–2015. <https://doi.org/10.3201/EID2609.202095>
92. Matsumoto, M., Kokame, K., Soejima, K., Miura, M., Hayashi, S., Fujii, Y., Iwai, A., Ito, E., Tsuji, Y., Takeda-Shitaka, M., Iwadate, M., Umeyama, H., Yagi, H., Ishizashi, H., Banno, F., Nakagaki, T., Miyata, T., & Fujimura, Y. (2004). Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood*, 103(4), 1305–1310. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-06-1796>
 93. McCracken, I. R., Saginc, G., He, L., Huseynov, A., Daniels, A., Fletcher, S., Peghaire, C., Kalna, V., Andaloussi-Mäe, M., Muhl, L., Craig, N. M., Griffiths, S. J., Haas, J. G., Tait-Burkard, C., Lendahl, U., Birdsey, G. M., Betsholtz, C., Nosedá, M., Baker, A. H., & Randi, A. M. (2021). Lack of Evidence of ACE2 Expression and Replicative Infection by SARS-CoV-2 in Human Endothelial Cells. *Circulation*, 865–868. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052824>
 94. McFadyen, J. D., Stevens, H., & Peter, K. (2020). The Emerging Threat of (Micro)Thrombosis in COVID-19 and Its Therapeutic Implications. *Circulation Research*, 127(4), 571–587. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317447>
 95. Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., & Manson, J. J. (2020). COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet*, 395(10229), 1033–1034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
 96. Mei, Z. W., van Wijk, X. M. R., Pham, H. P., & Marin, M. J. (2021). Role of von Willebrand Factor in COVID-19 Associated Coagulopathy. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 6(5), 1305–1315. <https://doi.org/10.1093/JALM/JFAB042>
 97. Middeldorp, S., Coppens, M., van Haaps, T. F., Foppen, M., Vlaar, A. P., Müller, M. C. A., Bouman, C. C. S., Beenen, L. F. M., Kootte, R. S., Heijmans, J., Smits, L. P., Bonta, P. I., & van Es, N. (2020). Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 18(8), 1995–2002. <https://doi.org/10.1111/JTH.14888>
 98. Millet, J. K., & Whittaker, G. R. (2015). Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research*, 202, 120–134. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2014.11.021>
 99. Moake, J. L. (2002). Thrombotic microangiopathies. *The New England Journal of Medicine*, 347(8), 589–600. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA020528>
 100. Moake, J. L. (2003). Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: The Systemic Clumping “Plague.” <https://doi.org/10.1146/Annurev.Med.53.082901.103948>, 53, 75–88. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MED.53.082901.103948>
 101. Moake, J. L., Rudy, C. K., Troll, J. H., Weinstein, M. J., Colannino, N. M., Azocar, J., Seder, R. H., Hong, S. L., & Deykin, D. (2010). Unusually Large Plasma Factor VIII: von Willebrand Factor Multimers in Chronic Relapsing Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198212023072306>, 307(23), 1432–1435. <https://doi.org/10.1056/NEJM198212023072306>
 102. Moschkowitz, E. (1952). An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries; an undescribed disease. *The American Journal of Medicine*, 13(5), 567–569. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(52\)90022-3](https://doi.org/10.1016/0002-9343(52)90022-3)
 103. Moschkowitz E. (1952). An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries An undescribed disease. *The American Journal of Medicine*, 13(5), 567–569. <http://www.sciepub.com/reference/74961>
 104. Mussbacher, M., Salzmann, M., Brostjan, C., Hoesel, B., Schoergenhofer, C., Datler, H., Hohensinner, P., Basilio, J., Petzelbauer, P., Assinger, A., & Schmid, J. A.

- (2019). Cell Type-Specific Roles of NF- κ B Linking Inflammation and Thrombosis. *Frontiers in Immunology*, 10(FEB). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00085>
105. National Center for Biotechnology Information. (n.d.). Retrieved August 28, 2022, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
106. Navas-Martín, S., & Weiss, S. R. (2004). Coronavirus replication and pathogenesis: Implications for the recent outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS), and the challenge for vaccine development. *Journal of Neurovirology*, 10(2), 75. <https://doi.org/10.1080/13550280490280292>
107. Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., Guo, L., Guo, R., Chen, T., Hu, J., Xiang, Z., Mu, Z., Chen, X., Chen, J., Hu, K., Jin, Q., Wang, J., & Qian, Z. (2020). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-15562-9>
108. Page, E. E., Kremer Hovinga, J. A., Terrell, D. R., Vesely, S. K., & George, J. N. (2017). Thrombotic thrombocytopenic purpura: diagnostic criteria, clinical features, and long-term outcomes from 1995 through 2015. *Blood Advances*, 1(10), 590–600. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2017005124>
109. Panigada, M., Bottino, N., Tagliabue, P., Grasselli, G., Novembrino, C., Chantarangkul, V., Pesenti, A., Peyvandi, F., & Tripodi, A. (2020). Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: A report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 18(7), 1738–1742. <https://doi.org/10.1111/JTH.14850>
110. Paraskevis, D., Kostaki, E. G., Magiorkinis, G., Panayiotakopoulos, G., Sourvinos, G., & Tsiodras, S. (2020). Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 79. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2020.104212>
111. Peyvandi, F., Garagiola, I., & Baronciani, L. (2011). Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfusion*, 9(Suppl 2), s3. <https://doi.org/10.2450/2011.002S>
112. Philippe, A., Chocron, R., Gendron, N., Bory, O., Beauvais, A., Peron, N., Khider, L., Guerin, C. L., Goudot, G., Lévassieur, F., Peronino, C., Duchemin, J., Bricchet, J., Sourdeau, E., Desvard, F., Bertil, S., Pene, F., Cheurfa, C., Szwebel, T. A., ... Smadja, D. M. (2021). Circulating Von Willebrand factor and high molecular weight multimers as markers of endothelial injury predict COVID-19 in-hospital mortality. *Angiogenesis*, 24(3), 505–517. <https://doi.org/10.1007/S10456-020-09762-6>
113. Plaimauer, B., Zimmermann, K., Völkel, D., Antoine, G., Kerschbaumer, R., Jenab, P., Furlan, M., Gerritsen, H., Lämmle, B., Schwarz, H. P., & Scheifflinger, F. (2002). Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood*, 100(10), 3626–3632. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2002-05-1397>
114. Poissy, J., Goutay, J., Caplan, M., Parmentier, E., Duburcq, T., Lassalle, F., Jeanpierre, E., Rauch, A., Labreuche, J., & Susen, S. (2020). Pulmonary Embolism in Patients With COVID-19. *Circulation*, 142(2), 184–186. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047430>
115. Pos, W., Crawley, J. T. B., Fijnheer, R., Voorberg, J., Lane, D. A., & Luken, B. M. (2010). An autoantibody epitope comprising residues R660, Y661, and Y665 in the ADAMTS13 spacer domain identifies a binding site for the A2 domain of VWF. *Blood*, 115(8), 1640–1649. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-06-229203>
116. Pos, W., Sorvillo, N., Fijnheer, R., Feys, H. B., Kaijen, P. H. P., Vidarsson, G., &

- Voorberg, J. (2011). Residues Arg568 and Phe592 contribute to an antigenic surface for anti-ADAMTS13 antibodies in the spacer domain. *Haematologica*, *96*(11), 1670–1677. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2010.036327>
117. Rauch, A., Labreuche, J., Lassalle, F., Goutay, J., Caplan, M., Charbonnier, L., Rohn, A., Jeanpierre, E., Dupont, A., Duhamel, A., Faure, K., Lambert, M., Kipnis, E., Garrigue, D., Lenting, P. J., Poissy, J., & Susen, S. (2020). Coagulation biomarkers are independent predictors of increased oxygen requirements in COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, *18*(11), 2942–2953. <https://doi.org/10.1111/JTH.15067>
118. Rieger, M., Mannucci, P. M., Kremer Hovinga, J. A., Herzog, A., Gerstenbauer, G., Konetschny, C., Zimmermann, K., Scharrer, I., Peyvandi, F., Galbusera, M., Remuzzi, G., Böhm, M., Plaimauer, B., Lämmle, B., & Scheiflinger, F. (2005). ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and other immunomediated diseases. *Blood*, *106*(4), 1262–1267. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-11-4490>
119. Rock, G. A., Shumak, K. H., Buskard, N. A., Blanchette, V. S., Kelton, J. G., Nair, R. C., Spasoff, R. A., & Group*, the C. A. S. (2010). Comparison of Plasma Exchange with Plasma Infusion in the Treatment of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. <http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJM199108083250604>, *115*(SUPPL.3), 81. <https://doi.org/10.1056/NEJM199108083250604>
120. Rodríguez Rodríguez, M., Castro Quismondo, N., Zafra Torres, D., Gil Alos, D., Ayala, R., & Martínez-Lopez, J. (2021). Increased von Willebrand factor antigen and low ADAMTS13 activity are related to poor prognosis in covid-19 patients. *International Journal of Laboratory Hematology*, *43*(4), O152–O155. <https://doi.org/10.1111/IJLH.13476>
121. Rostami, M., & Mansouritorghabeh, H. (2020). D-dimer level in COVID-19 infection: a systematic review. *Expert Review of Hematology*, *13*(11), 1265–1275. <https://doi.org/10.1080/17474086.2020.1831383>
122. Ruggeri, Z. M. (2003). Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, *1*(7), 1335–1342. <https://doi.org/10.1046/J.1538-7836.2003.00260.X>
123. Sadler, J. E. (2017). Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, *130*(10), 1181–1188. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-04-636431>
124. Saitoh, H., Murakami, H., & Mori, C. (1990). Upshaw-Schulman Syndrome in Two Siblings. *Pediatrics International*, *32*(4), 373–376. <https://doi.org/10.1111/J.1442-200X.1990.TB00846.X>
125. Sasahara, Y., Kumaki, S., Ohashi, Y., Minegishi, M., Kano, H., Bessho, F., & Tsuchiya, S. (2001). Deficient Activity of von Willebrand Factor-Cleaving Protease in Patients With Upshaw-Schulman Syndrome. *International Journal of Hematology* *2001 74:1*, *74*(1), 109–114. <https://doi.org/10.1007/BF02982559>
126. Schaller, M., Vogel, M., Kentouche, K., Lämmle, B., & Kremer Hovinga, J. A. (2014). The splenic autoimmune response to ADAMTS13 in thrombotic thrombocytopenic purpura contains recurrent antigen-binding CDR3 motifs. *Blood*, *124*(23), 3469–3479. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-04-561142>
127. Scheiflinger, F., Knöbl, P., Trattner, B., Plaimauer, B., Mohr, G., Dockal, M., Dorner, F., & Rieger, M. (2003). Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor–cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, *102*(9), 3241–3243. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-05-1616>
128. Scully, M., Cataland, S., Coppo, P., de la Rubia, J., Friedman, K. D., Kremer

- Hovinga, J., Lämmle, B., Matsumoto, M., Pavenski, K., Sadler, E., Sarode, R., Wu, H., Gale, D., Fujimura, Y., McDonald, V., Peyvandi, F., Scharrer, I., Veyradier, A., & Westwood, J. P. (2017). Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, *15*(2), 312–322. <https://doi.org/10.1111/JTH.13571>
129. Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(21). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2003138117>
130. Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* *2020* *581:7807*, *581*(7807), 221–224. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
131. Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., ... Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science (New York, N.Y.)*, *368*(6494), 1016–1020. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABB7015>
132. Shinohara, T., Miyamura, S., Suzuki, E., & Kobayashi, K. (1982). Congenital microangiopathic hemolytic anemia: Report of a Japanese girl. *European Journal of Pediatrics* *1982* *138:2*, *138*(2), 191–193. <https://doi.org/10.1007/BF00441153>
133. Shumak, K. H., Rock, G. A., & Nair, R. C. (1995). Late relapses in patients successfully treated for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Annals of Internal Medicine*, *122*(8), 569–572. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-122-8-199504150-00002>
134. SINGER, K., BORNSTEIN, F. P., & WILE, S. A. (1947). THROMBOTIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA HEMORRHAGIC DIATHESIS WITH GENERALIZED PLATELET THROMBOSES. *Blood*, *2*(6), 542–554. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V2.6.542.542>
135. Sisniega, D. C., & Reynolds, A. S. (2021). Severe Neurologic Complications of SARS-CoV-2. *Current Treatment Options in Neurology*, *23*(5), 1–14. <https://doi.org/10.1007/S11940-021-00669-1/FIGURES/2>
136. Skariyachan, S., Challapilli, S. B., Packirisamy, S., Kumargowda, S. T., & Sridhar, V. S. (2019). Recent Aspects on the Pathogenesis Mechanism, Animal Models and Novel Therapeutic Interventions for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infections. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00569>
137. Soejima, K., Mimura, N., Hirashima, M., Maeda, H., Hamamoto, T., Nakagaki, T., & Nozaki, C. (2001). A Novel Human Metalloprotease Synthesized in the Liver and Secreted into the Blood: Possibly, the von Willebrand Factor—Cleaving Protease? *The Journal of Biochemistry*, *130*(4), 475–480. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A003009>
138. Sonneveld, M. A. H., de Maat, M. P. M., Portegies, M. L. P., Kavousi, M., Hofman, A., Turecek, P. L., Rottensteiner, H., Scheiflinger, F., Koudstaal, P. J., Ikram, M. A., & Leebeek, F. W. G. (2015). Low ADAMTS13 activity is associated with an increased risk of ischemic stroke. *Blood*, *126*(25), 2739–2746. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2015-05-643338>
139. South, A. M., Diz, D. I., & Chappell, M. C. (2020). COVID-19, ACE2, and the cardiovascular consequences. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *318*(5), H1084–H1090. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00217.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH40052030810002.JPEG>

140. Springer, T. A. (2014). von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood*, 124(9), 1412–1425. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-05-378638>
141. Stark, K., & Massberg, S. (2021). Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *Nature Reviews. Cardiology*, 18(9), 666–682. <https://doi.org/10.1038/S41569-021-00552-1>
142. Sweeney BS, J. M., Barouqa, M., Krause BS, G. J., Gonzalez-Lugo, J. D., Rahman, S., & Reyes Gil, M. (2020). Evidence for secondary thrombotic microangiopathy in COVID-19. *MedRxiv*, 2020.10.20.20215608. <https://doi.org/10.1101/2020.10.20.20215608>
143. Tian, J., Yuan, X., Xiao, J., Zhong, Q., Yang, C., Liu, B., Cai, Y., Lu, Z., Wang, J., Wang, Y., Liu, S., Cheng, B., Wang, J., Zhang, M., Wang, L., Niu, S., Yao, Z., Deng, X., Zhou, F., ... Wang, Z. (2020). Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 disease severity in patients with cancer in Wuhan, China: a multicentre, retrospective, cohort study. *The Lancet. Oncology*, 21(7), 893–903. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30309-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30309-0)
144. Tiscia, G. L., Favuzzi, G., Lorenzo, A. de, Cappucci, F., Fischetti, L., Mauro, L. di, Miscio, G., Mirijello, A., Chinni, E., Grandone, E., & * on behalf of C. C.-19 G. (2020). Reduction of ADAMTS13 Levels Predicts Mortality in SARS-CoV-2 Patients. *TH Open: Companion Journal to Thrombosis and Haemostasis*, 4(3), e203. <https://doi.org/10.1055/S-0040-1716379>
145. Tsai, H.-M., & Lian, E. C.-Y. (1998). ANTIBODIES TO VON WILLEBRAND FACTOR–CLEAVING PROTEASE IN ACUTE THROMBOTIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA. *The New England Journal of Medicine*, 339(22), 1585. <https://doi.org/10.1056/NEJM199811263392203>
146. Uchida, T., Wada, H., Mizutani, M., Iwashita, M., Ishihara, H., Shibano, T., Suzuki, M., Matsubara, Y., Soejima, K., Matsumoto, M., Fujimura, Y., Ikeda, Y., & Murata, M. (2004). Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 104(7), 2081–2083. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-02-0715>
147. Uemura, M., Tatsumi, K., Matsumoto, M., Fujimoto, M., Matsuyama, T., Ishikawa, M., Iwamoto, T. A., Mori, T., Wanaka, A., Fukui, H., & Fujimura, Y. (2005). Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood*, 106(3), 922–924. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-01-0152>
148. Upshaw, J. D. Jr. (2010). Congenital Deficiency of a Factor in Normal Plasma That Reverses Microangiopathic Hemolysis and Thrombocytopenia. <http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJM197806152982407>, 298(24), 1350–1352. <https://doi.org/10.1056/NEJM197806152982407>
149. van den Brand, J. M., Smits, S. L., & Haagmans, B. L. (2015). Pathogenesis of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Pathology J Pathol*, 235, 175–184. <https://doi.org/10.1002/path.4458>
150. von Meijenfeldt, F. A., Havervall, S., Adelmeijer, J., Lundström, A., Rudberg, A. S., Magnusson, M., Mackman, N., Thalin, C., & Lisman, T. (2020a). Prothrombotic changes in patients with COVID-19 are associated with disease severity and mortality. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 5(1), 132–141. <https://doi.org/10.1002/RTH2.12462>
151. von Meijenfeldt, F. A., Havervall, S., Adelmeijer, J., Lundström, A., Rudberg, A. S., Magnusson, M., Mackman, N., Thalin, C., & Lisman, T. (2020b). Prothrombotic changes in patients with COVID-19 are associated with disease severity and mortality. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 5(1), 132–141. <https://doi.org/10.1002/RTH2.12462>
152. Wallace, D. C., Lovric, A., Clubb, J. S., & Carseldine, D. B. (1975). Thrombotic

- thrombocytopenic purpura in four siblings. *The American Journal of Medicine*, 58(5), 724–734. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(75\)90510-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(75)90510-0)
153. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281–292.e6. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.058>
154. Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S., & Li, F. (2020). Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *Journal of Virology*, 94(7). <https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20>
155. Ward, S. E., Curley, G. F., Lavin, M., Fogarty, H., Karampini, E., McEvoy, N. L., Clarke, J., Boylan, M., Alalqam, R., Worrall, A. P., Kelly, C., de Barra, E., Glavey, S., Ni Cheallaigh, C., Bergin, C., Martin-Loeches, I., Townsend, L., Mallon, P. W., O'Sullivan, J. M., ... Kenny, D. (2021). Von Willebrand factor propeptide in severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): evidence of acute and sustained endothelial cell activation. *British Journal of Haematology*, 192(4), 714–719. <https://doi.org/10.1111/BJH.17273>
156. Weiss, S. R., & Leibowitz, J. L. (2011). Coronavirus pathogenesis. *Advances in Virus Research*, 81, 85–164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2>
157. Woywodt, A., Blann, A. D., Kirsch, T., Erdbruegger, U., Banzet, N., Haubitz, M., & Dignat-George, F. (2006). Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 4(3), 671–677. <https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2006.01794.X>
158. Wu, C., Chen, X., Cai, Y., Xia, J., Zhou, X., Xu, S., Huang, H., Zhang, L., Zhou, X., Du, C., Zhang, Y., Song, J., Wang, S., Chao, Y., Yang, Z., Xu, J., Zhou, X., Chen, D., Xiong, W., ... Song, Y. (2020). Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Internal Medicine*, 180(7), 934–943. <https://doi.org/10.1001/JAMAINTERNMED.2020.0994>
159. Wu, Z., & McGoogan, J. M. (2020). Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*, 323(13), 1239–1242. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.2648>
160. Xiao, K., Zhai, J., Feng, Y., Zhou, N., Zhang, X., Zou, J. J., Li, N., Guo, Y., Li, X., Shen, X., Zhang, Z., Shu, F., Huang, W., Li, Y., Zhang, Z., Chen, R. A., Wu, Y. J., Peng, S. M., Huang, M., ... Shen, Y. (2020). Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature*, 583(7815), 286–289. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2313-X>
161. Xiaohong, Y., Tingyuan, L., Zhicheng, H., Yifang, P., Huawen, L., Shicang, Y., Huaming, M., Lihua, W., Huarong, Z., Wenjuan, F., Tao, L., Feng, L., Qiaonan, G., Cong, C., Hualiang, X., Haitao, G., Shuang, L., Dongfang, X., Yu, S., ... Xiuwu, B. (2020). A pathological report of three COVID-19 cases by minimal invasive autopsies. *Chinese Journal of Pathology*, 49(5), 411–417. <https://doi.org/10.3760/CMA.J.CN112151-20200312-00193>
162. Yago, T., Lou, J., Wu, T., Yang, J., Miner, J. J., Coburn, L., López, J. A., Cruz, M. A., Dong, J.-F., McIntire, L. v., McEver, R. P., & Zhu, C. (2008). Platelet glycoprotein Iba forms catch bonds with human WT vWF but not with type 2B von Willebrand disease vWF. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(9), 3195–3207. <https://doi.org/10.1172/JCI35754>
163. Yau, J. W., Teoh, H., & Verma, S. (2015). Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovascular Disorders*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12872->

015-0124-Z

164. Yeaman, M. R. (2010). Bacterial–platelet interactions: virulence meets host defense. *Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fmb.09.112*, 5(3), 471–506. <https://doi.org/10.2217/FMB.09.112>
165. Yue, H., Bai, X., Wang, J., Yu, Q., Liu, W., Pu, J., Wang, X., Hu, J., Xu, D., Li, X., Kang, N., Li, L., Lu, W., Feng, T., Ding, L., Li, X., & Qi, X. (2020). Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in Gansu province, China. *Annals of Palliative Medicine*, 9(4), 1404412–1401412. <https://doi.org/10.21037/APM-20-887>
166. Zeng, Z., Xu, L., Xie, X. Y., Yan, H. L., Xie, B. J., Xu, W. Z., Liu, X. A., Kang, G. J., Jiang, W. L., & Yuan, J. P. (2020). Pulmonary pathology of early-phase COVID-19 pneumonia in a patient with a benign lung lesion. *Histopathology*, 77(5), 823–831. <https://doi.org/10.1111/HIS.14138>
167. Zhang, Y., Cao, W., Jiang, W., Xiao, M., Li, Y., Tang, N., Liu, Z., Yan, X., Zhao, Y., Li, T., & Zhu, T. (2020). Profile of natural anticoagulant, coagulant factor and anti-phospholipid antibody in critically ill COVID-19 patients. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 50(3), 580–586. <https://doi.org/10.1007/S11239-020-02182-9>
168. Zhao, X., Chen, D., Szabla, R., Zheng, M., Li, G., Du, P., Zheng, S., Li, X., Song, C., Li, R., Guo, J.-T., Junop, M., Zeng, H., & Lin, H. (2020). *Broad and Differential Animal Angiotensin-Converting Enzyme 2 Receptor Usage by SARS-CoV-2*. <https://doi.org/10.1128/JVI>
169. Zheng, X., Chung, D., Takayama, T. K., Majerus, E. M., Sadler, J. E., & Fujikawa, K. (2001). Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 41059–41063. <https://doi.org/10.1074/JBC.C100515200>
170. Zheng, X. L., Kaufman, R. M., Goodnough, L. T., & Sadler, J. E. (2004). Effect of plasma exchange on plasma ADAMTS13 metalloprotease activity, inhibitor level, and clinical outcome in patients with idiopathic and nonidiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 103(11), 4043. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-11-4035>
171. Zheng, X., Nishio, K., Majerus, E. M., & Sadler, J. E. (2003). Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 30136–30141. <https://doi.org/10.1074/JBC.M305331200>
172. Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Xiang, J., Wang, Y., Song, B., Gu, X., Guan, L., Wei, Y., Li, H., Wu, X., Xu, J., Tu, S., Zhang, Y., Chen, H., & Cao, B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet (London, England)*, 395(10229), 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
173. Zhou, H., Chen, X., Hu, T., Li, J., Song, H., Liu, Y., Wang, P., Liu, D., Yang, J., Holmes, E. C., Hughes, A. C., Bi, Y., & Shi, W. (2020). A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Current Biology : CB*, 30(11), 2196-2203.e3. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2020.05.023>
174. Zhou, P., Yang, X. lou, Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. di, Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., ... Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020 579:7798, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
175. Zhou, W., Inada, M., Lee, T. P., Benten, D., Lyubsky, S., Bouhassira, E. E., Gupta, S., & Tsai, H. M. (2005). ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells.

- Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 85(6), 780–788. <https://doi.org/10.1038/LABINVEST.3700275>
176. Zhou, Y. F., Eng, E. T., Zhu, J., Lu, C., Walz, T., & Springer, T. A. (2012). Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood*, 120(2), 449–458. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2012-01-405134>
177. Zini, G., d’Onofrio, G., Briggs, C., Erber, W., Jou, J. M., Lee, S. H., Mcfadden, S., Vives-Corrans, J. L., Yutaka, N., & Lesesve, J. F. (2012). ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes. *International Journal of Laboratory Hematology*, 34(2), 107–116. <https://doi.org/10.1111/J.1751-553X.2011.01380.X>
178. Zipfel, P. F., Heinen, S., & Skerka, C. (2010). Thrombotic microangiopathies: New insights and new challenges. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 19(4), 372–378. <https://doi.org/10.1097/MNH.0B013E32833AFF4A>
179. С Бабкина, А., М Голубев, А., В Острова, И., В Волков, А., Н Кузовлев, А., Babkina, A. S., Golubev, A. M., Ostrova, I. v, Volkov, A. v, & Kuzovlev, A. N. (2021). Brain Morphological Changes in COVID-19. *General Reanimatology*, 17(3), 4–15. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2021-3-1-0>