



## ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора Дубея Леоніда Ярославовича на дисертаційну роботу Стаєшини Олександри Василівни на тему «Молекулярно-генетичні механізми патогенезу і шляхи оптимізації діагностики, лікування та профілактики появи інгібітору у хворих на гемофілію», представленій на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.01.31 – гематологія і трансфузіологія

### I. Актуальність дисертації, її зв'язок з державними та галузевими програмами

Дисертація присвячена актуальній проблемі сучасної гематології – з'ясуванню патогенезу, вдосконаленню діагностики, лікування та профілактики появи інгібітору до факторів зсідання VIII (IX) у хворих на гемофілію. Виникнення інгібітору дотепер залишається одним з найтяжчих та найскладніших до подолання ускладнень гемофілії, причини якого маловивчені, і яке призводить до значного погіршення якості життя хворих і вимагає значних додаткових матеріальних затрат. Патогенетичні механізми, які спричиняють виникнення інгібітору ще недостатньо відомі. В літературі немає одностайної думки про причини його розвитку, а саме: чи в його основі лежать внутрішні, пов'язані з пацієнтом, або генетичні фактори, чи він є наслідком впливу зовнішніх, пов'язаних з лікуванням, факторів. Однак є цілком зрозумілим, що поява інгібіторних антитіл у крові пацієнта – це особлива реакція імунної системи, яка є однією із найбільш реактогенних та не до кінця зрозумілих. Саме тому вивчення як молекулярних змін в імунній системі, оснований на «моделі небезпеки», так і виявлення чинників, які неспецифічно стимулюють імунну систему є вкрай важливим для пацієнтів з гемофілією, що має велике, або навіть краще сказати вирішальне значення, у розвитку ускладнень, потенційно загрозливих життю та застосування правильної і своєчасної лікувальної тактики.

У практиці провідних світових центрів гемофілії для досягнення

гемостазу у хворих на гемофілію з інгібітором застосовують і випробовують різні засоби і методи лікування. ефективність кожного з яких за різними повідомленнями становить від 43% до 100% випадків. А відмінності механізмів гемостатичної дії різних засобів сприяють різній відповіді хворих на таке лікування і їхня терапевтична ефективність потребує подальшого вивчення. Тому відповідь на лікування цілком залежить як від факторів, специфічних для кожної кровотечі і кожного пацієнта окремо (локалізація або тяжкість кровотечі, вік пацієнта, наявність суглобів-мішеней, титр антитіл і т.д.), так і від генетичного фону.

Незважаючи на певний прогрес у з'ясуванні причин розвитку інгібіторних антитіл до дефіцитного фактора і визначення лікувальної тактики, ця проблема є актуальною для сучасної медицини. Зазначене вище вказує на актуальність та своєчасність задачі, яка вирішувалась здобувачем.

Дане дисертаційне дослідження є складовою частиною планових науково-дослідних робіт ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»: «Дати коагулологічну, імунологічну та клінічну характеристику вовчакового антикоагулянту та виявити його роль в розвитку резистентності до замісної терапії у хворих на гемофілію» (№ Державної реєстрації 0103U000295; шифр 02.03 АМНУ); «Розробити схеми лікування геморагій у хворих на гемофілію з інгібітором» (№ Державної реєстрації 0106U002100; шифр 02.06 АМНУ), «Вивчити фактори ризику появи імунних інгібіторів у хворих на гемофілію» (№ Державної реєстрації 0109U000463; шифр 01.09 АМНУ), «Провести аналіз кореляційних взаємозв'язків лабораторних та клінічних показників з метою прогнозування ефективності гемостатичної терапії у хворих на гемофілію з інгібітором» (№ Державної реєстрації 0112U001373; шифр 01.12 НАМН), «Вивчити типи патологічних інгібіторів зсідання крові та їх патогенетичне значення у хворих на гемофілію, імунну коагулопатію та з антифосфоліпідним синдромом» (№ Державної реєстрації 0115U000127; шифр 01.15 НАМН), у яких дисертант була відповідальним виконавцем.

## II. Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій забезпечена:

- використанням сучасних методів дослідження, адекватних поставленим завданням;
- використанням системного підходу до обстеження і лікування пацієнтів;
- вірогідністю отриманих кількісних даних, які математичного опрацьовані із застосуванням адекватних методик статистичного аналізу результатів, методично і науково правильно інтерпретовані.

У роботі представлені дані про апробацію дисертації на міжнародних конгресах, науково-практичних конференціях, впровадження в практику установ охорони здоров'я.

Усе це підтверджує вірогідність положень, висновків і практичних рекомендацій, що випливають з дослідження.

**Наукова новизна** даного дисертаційного дослідження полягає в тому, що вперше на основі клінічних і коагулологічних досліджень визначено частоту розвитку інгібіторів до дефіцитного фактора зсідання серед хворих на гемофілію в Україні, яка становить 16,7% при гемофілії А і 3,9% при гемофілії В, представлено детальний аналіз залежності їхнього виникнення від тяжкості гемофілії та подано характеристику типів інгібіторів (постійний, транзиторний, сильної і слабкої імунної відповіді) згідно рекомендацій WFH та ISTH.

Отримано пріоритетні результати про роль генетичних чинників у появі інгібіторів у хворих на гемофілію. Вперше в Україні розкрито зв'язок між поодинокими поліморфізмами (SNP) генів таких імунорегуляторних факторів, як IL-10, TNF $\alpha$ , CTLA-4, та наявністю інгібітору у цих хворих. Встановлено, що у хворих з постійним інгібітором рідше виявляється комбінований генотип AG -1082 IL-10/AG -308 TNF $\alpha$ , та вища частота А-алеля та АА-генотипу SNP

+49 A>G екзону 1 гена CTLA-4 порівняно з хворими без інгібітору. В результаті аналізу розподілу генотипів поліморфних локусів промотера -318 C>T та екзону 1 49 A>G гена CTLA-4 показано, що у хворих на гемофілію А частіше трапляється поєднаний генотип TT/AA, а за наявності постійного інгібітору достовірно рідше генотипи CC/AG порівняно з хворими з транзиторним інгібітором.

Вперше в Україні з'ясовано відмінності у розподілі частот алельних варіантів генів локусів HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 у хворих на гемофілію А з постійним та транзиторним інгібітором порівняно з хворими без інгібітору. Встановлено, що алелі DRB1\*1501-1502, DRB1\*0701-0702 та DQB1\*0602 можна розглядати як алелі-агресори, які підвищують ризик появи інгібітору, а алель DQB1\*0302, навпаки, як алель-протектор, який знижує цей ризик. У більшості (70,0%) пацієнтів з постійним інгібітором уперше виявлено 1 або 2 алелі-агресори на відміну від пацієнтів з транзиторним інгібітором, у яких тільки у 21,4% випадків наявний 1 алель-агресор. У 53,9% обстежених пацієнтів без інгібітору виявлено алель-протектор як ізольовано (30,8%), так і в поєднанні з алелями-агресорами, що доповнює наукові знання про роль поліморфної системи МНС II класу у патогенезі появи інгібітору при гемофілії.

Вперше на основі множинних логіт-регресії узагальнено фактори ризику появи інгібітору у хворих на гемофілію, що дозволило ідентифікувати пацієнтів з високим ризиком розвитку інгібітору, створити модель (номограму) для передбачення його появи і запропонувати шляхи профілактики. Встановлено, що найбільший вплив на ймовірність розвитку інгібітору створюють чинники, пов'язані з лікуванням, а саме: інтенсивність замісної трансфузійної терапії (кількість ЕД/І епізод), зміна типу та виду препаратів під час лікування одного епізоду. Ступінь очищення препаратів, вік і розмір хірургічного втручання – негативні та значущі предиктори, тоді як гнійні ускладнення і обтяжений «інгібіторний» анамнез зумовлюють збільшення ймовірності розвитку інгібітору на 21% і 12%, відповідно.

Доповнено знання про неоднорідну природу інгібіторних антитіл у

хворих на гемофілію на основі опрацьованого нами методу – дослідження кінетики корекції подовженого АЧТЧ нормальною плазмою у зростаючій пропорції до і після інкубації протягом 1 год. Відзначено два типи патологічних інгібіторів: I тип – нейтралізуючий інгібітор FVIII(IX) з пролонгованою (прогресивною) дією і простою кінетикою нейтралізації нормальною плазмою; II тип – набутий інгібітор негайної дії зі складною кінетикою нейтралізації, аналогічний до ВА у хворих на АФС, що вказує на неоднорідність імунної відповіді на введений FVIII(IX) і вимагає різних підходів до лікування. Вперше в Україні стверджено, що не-нейтралізуючі інгібіторні антигіла до FVIII(IX) можуть слугувати критерієм безпеки нових рекомбінантних препаратів факторів з'єднання крові.

Вперше у хворих на гемофілію з інгібітором та без інгібітору на підставі змодельованого *ex vivo/in vitro* дослідіу на основі тесту АЧТЧ з'ясовано вплив на з'єднання крові препаратів «шунтової» дії: рекомбінантного активованого фактора VII (rFVIIa), активованого протромбінового комплексу (антиінгібіторного комплексу – aPCC) та неактивованого протромбінового комплексу (PCC). Встановлено високий ступінь кореляції між індексом скорочення АЧТЧ *ex vivo/in vitro* та клінічною відповіддю (зупинкою кровотечі) після введення препарату «шунтової» дії, який становить для rFVIIa  $r=+0,971$  і для aPCC  $r=+0,950$ .

Вперше в Україні здійснено клінічну оцінку гемостатичної ефективності монотерапії препаратами «шунтової» дії rFVIIa і aPCC у хворих на гемофілію з інгібітором під час кровотеч і гемартрозів протягом тривалого періоду на підставі стандартизованих критеріїв. Стверджено високу ефективність цих препаратів у більшості випадків з незначною перевагою препарату rFVIIa перед aPCC. Доповнено наукові дані про механізм дії шунтових препаратів на основі дослідження динаміки титру інгібітору у хворих на гемофілію А і В упродовж 1 року монотерапії препаратами aPCC та rFVIIa. Встановлено відмінності дії цих препаратів. Титр інгібітору під час лікування aPCC виявляє виражену тенденцію до підвищення, а при застосуванні препарату rFVIIa до кінця

спостереження він знижується, у 50% хворих змінюється тип реакції із сильної на слабку. Однак у жодного пацієнта після 12 міс. монотерапії aPCC або rFVIIa інгібітор не зникає.

Вперше обгрунтовано тактику лікування кровотеч і забезпечення гемостазу під час операційних втручань у хворих на гемофілію з низьким титром інгібітору та слабкою реакцією з виділенням груп високого, проміжного і низького ризику залежно від групи ризику геморагічного прояву за локалізацією та інтенсивністю і/або об'єму хірургічного втручання. Розроблено схеми лікування тяжких кровотеч у хворих на гемофілію, ускладнену інгібітором та у хворих з набутою гемофілією.

Розроблені автором теоретичні положення є підставою для **практичного застосування результатів** дослідження.

Науково-практична цінність дисертації визначається тим, що отримані дисертантом результати дозволили розробити нову методичку розрахунку ризику появи інгібітору у хворих на гемофілію. На основі аналізу впливу генетичних факторів та факторів, пов'язаних з лікуванням, створено для практичного застосування номограму, з допомогою якої можна спрогнозувати появу інгібітору з високою чутливістю (94,6%) та специфічністю (93,4%), а її точність становить 94,1%. Встановлено предиктори появи інгібітору у хворих на гемофілію, а саме: інтенсивність лікування (кількість ЕД введення препарату на 1 епізод кровотечі), зміна препарату під час лікування, ступінь очищення препарату, вік хворого, наявність гнійних ускладнень, об'єм і характер хірургічних втручань, інгібіторний анамнез, які необхідно враховувати при призначенні лікування. На підставі цих предикторів обгрунтовано засади профілактики інгібіторів у хворих на гемофілію шляхом зміни підходів до лікування, а саме: зменшувати інтенсивність лікування одного епізоду, використовувати однотипні високоочищені препарати, особливо у дітей та осіб молодого віку, уникати необгрунтованих хірургічних операцій та гнійних ускладнень.

У хворих на гемофілію, ускладнену інгібітором, доцільно проводити

визначення типу інгібітору за кінетикою корекції подовженого АЧТЧ нормальною плазмою: I тип – нейтралізуючий інгібітор FVIII(IX) з пролонгованою (прогресивною) дією і простою кінетикою нейтралізації нормальною плазмою; II тип – набутий інгібітор негайної дії зі складною кінетикою нейтралізації, аналогічний до ВА у хворих на АФС (патент на корисну модель №16967 «Спосіб діагностики вовчакового антикоагулянту у хворих на гемофілію»). Тип інгібітору впливає на вибір лікувальних препаратів та терапевтичну відповідь ВА, наявний у 29,6% хворих на гемофілію з патологічними інгібіторами з'єднання I або клінічними ознаками резистентності до замісної терапії, вказує на ускладнений перебіг хвороби.

Для розрахунку індивідуальної дози препаратів при замісній терапії хворих на гемофілію рекомендовано використовувати тест відновлення рівня FVIII(IX) з розрахунком індексу відновлення ( $I_{\text{В}}$ ), що також дозволяє провести ранню діагностику резистентності до замісної терапії внаслідок появи інгібіторів до FVIII(IX).

Запропоновано використовувати тест корекції продовженого АЧТЧ *ex vivo/in vitro* з використанням плазми хворого і досліджуваного препарату в терапевтичній дозі для визначення гемостатичної дії препаратів «шунтової» дії у хворих на гемофілію з інгібітором. Цей тест – інформативний та доступний метод моніторингу гемостатичного ефекту препаратів «обхідної» дії, оскільки встановлено високий ступінь кореляції між індексом скорочення АЧТЧ *ex vivo/in vitro* та клінічною відповіддю (зупинкою кровотечі) після введення препарату «шунтової» дії. Його слід застосовувати для прогнозування індивідуальної гемостатичної відповіді на введення цих препаратів у хворого з кровотечею.

Для практичного використання розроблено тактику лікування кровотеч та забезпечення виконання хірургічних та ортопедичних операцій у хворих з інгібітором у низькому титрі та зі слабкою реакцією з врахуванням групи ризику: високого, проміжного і низького – залежно від групи ризику

геморагічного прояву за локалізацією та інтенсивністю і/або об'ємухірургічного втручання.

### **III. Оцінка змісту дисертації.**

Дисертаційна робота побудована за традиційною схемою, достатньо ілюстрована, матеріал викладений чітко і послідовно. Дисертаційна робота викладена на 374-ох сторінках друкованого тексту українською мовою. Робота складається із вступу, огляду літератури, розділу з описом матеріалів та методів дослідження, 6-ти розділів власних досліджень, аналізу одержаних результатів, висновків та практичних рекомендацій, містить 75 таблиці та 23 рисунки. Список використаних джерел складається з 370 бібліографічного опису кирилицею та латиною.

Вступ є структурованим згідно чинних вимог, конкретно сформульовані актуальність проблеми, мета і завдання дослідження, об'єкт та предмет наукового пошуку, представлені методи дослідження, викладені наукова новизна та практичне значення одержаних результатів та інші підрозділи вступу. Зауваження до вступу відсутні.

Розділ огляду літератури складається з 12 підрозділів, має назву, яка перегукується з метою роботи. Завдання цього розділу обґрунтування актуальності теми, мети та завдань дослідження. Дисертантом визначені невирішені питання та обґрунтована необхідність проведення дисертаційного дослідження.

У другому розділі дається повна характеристика обстежених осіб і принцип розподілу пацієнтів на досліджувані групи. Представлений дизайн дослідження, генеалогічний аналіз, молекулярно-генетичні, клінічні (анамнез, скарги, об'єктивне обстеження), інструментальні (рентгенологічні, сонографічні, КТ, МРТ), загальні клініко-лабораторні, гематологічні, коагулологічні (визначення активності факторів з'єднання VIII(IX) та нейтралізуючого інгібітору до них, вовчакового антикоагулянту), фармакокінетичні методи дослідження. Окремо досліджувалася гемостатична активність препаратів «щуптової» дії в тесті, змодельованому на основі АЧТЧ



ex vivo/in vitro. В роботі застосовані сучасні методи статистичної обробки результатів досліджень, які дозволяють вірогідно оцінити отримані дані.

У розділі 3 представлений аналіз генетичних факторів схильності до утворення інгібітору у хворих на гемофілію. Охарактеризовані поодинокі поліморфізми генів імунної відповіді (IL-10, TNF $\alpha$ , CTLA-4), поодинокі поліморфні варіанти IL-10 (SNP –1082 G – A), TNF $\alpha$  (308 G – A), представлено розподіл та частоту окремих генотипів (SNP –1082 G - A IL-10 та SNP –308 G - A TNF $\alpha$ ) у пацієнтів, хворих на гемофілію, залежно від наявності інгібітору. Також проведені молекулярно–генетичні дослідження поодиноких поліморфізмів гена CTLA-4 і представлено розподіл та частоту комбінації досліджуваних генотипів у пацієнтів, хворих на гемофілію, залежно від наявності інгібітору.

Оригінальними виявилися дослідження генів МНС II класу у хворих на гемофілію. Автор провела аналіз розподілу алельних варіантів генів HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 у хворих на гемофілію А, розподілила алелі HLA II класу у хворих на гемофілію А залежно від тяжкості гемофілії та наявності інгібітору.

У розділі 4 представлено аналіз зовнішніх факторів утворення інгібіторів у хворих на гемофілію. Дисертанткою надана оцінка ефективності та безпеки препаратів фактора з'єднання VIII у хворих на гемофілію А без інгібітору, характеристика хворих на гемофілію А (результати лікування як рекомбінантним одноланцюговим з усіченим В-доменом препаратом фактора VIII лонктоког альфа, так і пролонгованим рекомбінантним з усіченим В-доменом препаратом фактора VIII туроктоког альфа негільований та пролонгованим рекомбінантним повноланцюговим препаратом фактора VIII з усіченим В-доменом руріктоког альфа негільований).

Також проведено оцінку ефективності та безпеки препаратів фактора з'єднання IX у хворих на гемофілію В без інгібітору (представлено результати лікування хворих на гемофілію В).

У розділі 5 автором висвітлено прогнозування появи інгібітору у хворих

на гемофілію, а саме фактори ризику. Дослідником проведено розрахунок окремих ефектів впливу кожного фактора на ймовірність появи інгібітору за допомогою однофакторних логіт-моделей, аналіз впливу предикторів на виникнення інгібітору методом множинних логіт-регресій.

У розділі 6 дисертант описує результати коагулологічних досліджень у хворих на гемофілію А і В (характер інгібітору, його активність, тип кінетичної реакції; вовчаковий антикоагулянт; тест відновлення активності фактора VIII (IX) в організмі після введення препаратів фактора), що дає повноцінно зрозуміти фармакокінетику фактора VIII (IX).

Розділ 7 демонструє результати дослідження гемостатичної активності препаратів «шунтової» дії у хворих на гемофілію А в тесті, змодельованому на основі АЧТЧ *ex vivo/in vitro*. Автором показана клінічна оцінка гемостатичної ефективності препаратів «шунтової» дії і їх впливу на рівень інгібітору під час лікування у хворих на гемофілію з інгібітором, розроблена терапевтична тактика лікування кровотеч у хворих на гемофілію, ускладнену інгібітором у низькому титрі (<5 БО/мл) та із слабкою реакцією.

Надзвичайно цікавими виявилися дані, представлені у 8 розділі, щодо набутої коагулопатії. Автором визначається тип кінетичної реакції інгібіторних антитіл при набутій гемофільї А і В, наведено клінічний перебіг та лікування цієї патології з урахуванням власних спостережень.

У розділі аналізу та узагальнення результатів дослідження підведені підсумки проведеного дослідження. Групуючись на отриманих результатах дослідження, автор порівнює їх із відомими на сьогодні даними вітчизняних та зарубіжних науковців з відповідної проблематики, наводить принципові фрагменти аналізу власних досліджень, звертає увагу на значення отриманих важливих наукових результатів.

Застосований метод статистичного аналізу отриманих результатів сумнівів не викликає. Всі розділи дисертації написані правильною літературною мовою.

Висновки є обґрунтованими, цілком впливають до змісту дисертації, поставленої мети та завдань. Наведені практичні рекомендації щодо

використання результатів дослідження у практичній діяльності цілком конкретні і можуть впроваджуватись у відповідних лікувальних закладах.

Список джерел літератури оформлений відповідно до чинних вимог, відображає стан наявної інформації з даного питання за останні роки.

Автореферат даної дисертації є цілком відповідним до її змісту.

Зауважень принципового характеру по суті викладеної роботи немає.

Побажання: доцільно розширити впровадження результатів роботи у начавльно-педагогічний процес медичних університетів (студенти, інтерни, слухачі).

При рецензуванні роботи виникли такі запитання:

1. Згідно класифікації гемофілії А та В виділяють три форми тяжкості хвороби залежно від рівня фактора з'єднання крові VIII(IX). Також відомо, що інгібітор при помірній гемофілії знижує активність власного фактора з'єднання крові. Як ви встановлювали ступінь тяжкості гемофілії при наявності інгібітору?
2. Як можна пояснити, що у хворих з набутою гемофілією рівень фактора з'єднання і титр інгібітору не корелюють з тяжкістю геморагічного прояву?

## ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Стасишин Олександри Василівни» на тему «Молекулярно-генетичні механізми патогенезу і шляхи оптимізації діагностики, лікування та профілактики появи інгібітору у хворих на гемофілію» є завершеною, самостійною роботою, відрізняється своєю актуальністю. Авторкою отримані нові, науково обґрунтовані результати, що загалом вирішують конкретну науково-прикладну проблему, яка має суттєве значення для розділу гематологія – підвищити ефективність надання медичної допомоги хворим на гемофілію, ускладнену інгібітором, шляхом визначення молекулярно-генетичних маркерів та факторів ризику появи інгібітору.

За актуальністю тем, обсягом дослідного матеріалу, організацією

дослідження, науковою новизною та значущістю висновків і практичних рекомендацій робота є відповідною до вимог п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 № 567, щодо докторських дисертацій, а Стасишин Олександра Василівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора медичних наук зі спеціальності 14.01.31 – гематологія і трансфузіологія.

Професор кафедри педіатрії і неонатології  
факультету післядипломної освіти  
Львівського національного медичного університету  
імені Данила Галицького,  
доктор медичних наук, професор

Леонід Дубей

