

ВІДЗИВ

офіційного опонента д.мед.н., проф. С.В. Клименка,

завідувача відділу медичної генетики ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України про дисертацію Стасишин О.В.

“Молекулярно-генетичні механізми патогенезу і шляхи оптимізації діагностики, лікування та профілактики появи інгібітору у хворих на гемофілію”, поданої на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.01.31 – гематологія та трансфузіологія

Гемофілія - це вроджене орфанне захворювання, яке передається як рецесивна ознака, зчеплена з X-хромосою, зумовлена дефіцитом або молекулярними аномаліями фактора з'єднання крові VIII (IX) та характеризується кровотечами різної локалізації. Основним методом профілактики та лікування геморагічних проявів є замісна трансфузійна терапія плазмовими або рекомбінантними препаратами факторів VIII (IX). Доступність концентрованих вірусінактивованих препаратів, запровадження ефективних методів профілактики позитивно вплинуло на якість та тривалість життя хворих. Проте, незважаючи на досягнуті успіхи, у значній кількості пацієнтів, за різних даних від 10 до 30 %, з'являються імунні інгібітори, які інактивують введений фактор VIII (IX) і призводять до резистентності. На сьогоднішній день поява інгібітору залишається одним з найтяжчих та найскладніших до подолання ускладнень у хворих на гемофілію, яке призводить не тільки до значного погіршення якості життя пацієнтів, але й несе великий економічний тягар. Значні зусилля дослідників, прикладені до вивчення факторів ризику інгібітору, увінчалися значним успіхом. Зокрема, на сьогоднішній день, очевидною є роль генетичних, або пов'язаних з пацієнтом факторів; інші фактори, пов'язані з лікуванням та іншими подіями, які впливають на імунну систему пацієнта, вивчаються і їх роль ще не до кінця встановлена.

В Україні досліджень факторів ризику появи інгібіторів у хворих на гемофілію раніше не проводилося, тому методи профілактики засновані на знанні чинників ризику немає.

Лікування хворих на гемофілію залишається складною проблемою, важливим фактором для вибору тактики лікування є титр інгібітору, його характер та тип реакції імунної системи, тому клінічна практика потребує досконалої лабораторної діагностики інгібітору. Найбільші труднощі виникають при зупинці кровотеч у хворих на гемофілію з інгібітором, тому що стандартна замісна терапія концентратами факторів VIII (IX) неефективна, гемостатичний ефект препаратів з «обхідним» механізмом дії, за різними повідомленнями, становить від 43% до 100%. Відмінності механізмів гемостатичної дії aPCC та rFVIIa сприяють різній відповіді хворих на ці препарати, і їхня лікувальна ефективність потребує подальшого вивчення. В Україні описано застосування тільки окремих методів лікування у поодиноких хворих.

Все вищенаведене зумовлює актуальність та своєчасність дисертаційної роботи О.В. Стасишин, яку присвячено удосконаленню діагностики, лікування та попередження виникнення імунних інгібіторів факторів з'єднання VIII(IX) у хворих на гемофілію шляхом визначення молекулярно-генетичних маркерів та факторів ризику появи інгібітору, зумовлених клінічним перебігом хвороби та лікуванням, удосконалення діагностичних методів та індивідуалізації програм лікування і профілактики у цих хворих.

Прагматичне значення цієї роботи полягає в підвищенні ефективності надання медичної допомоги хворим на гемофілію, ускладнену інгібітором.

Необхідно підкреслити, що докторська дисертація О.В.Стасишин логічно впливає з 5 науково-дослідних робіт ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України» за активною участю дисертанта.

Дисертація викладена на 374 сторінках друкованого тексту, з них – 268 сторінок основного тексту, що відповідає вимогам ДАК України, які надаються до обсягу докторської дисертацій.

Структура дисертації О.В.Стасишин відповідає вимогам ДАК України і містить такі розділи: вступ, аналітичний огляд літератури, матеріали і методи дослідження, 6 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел літератури, додатків. Дисертацію написано грамотною державною мовою. Наприкінці кожного розділу є лаконічне резюме, що узагальнює основні результати та логічно пов'язує структурні елементи роботи до єдиного цілого. Дисертацію проілюстровано 75 таблицями та 23 рисунками, які суттєво спрощують сприйняття матеріалу. Список використаних джерел містить 370 бібліографічних посилань. Зауважень до оформлення дисертації не має.

У вступі аргументовано актуальність проведеного дослідження, чітко визначено мету та завдання дослідження.

Мета дослідження сформульована адекватно та відповідає основному змісту проведених досліджень. Завдання дисертації, яких шість, поставлені коректно та відповідають меті роботи.

В аналітичному огляді літератури наведено весь існуючий спектр поглядів щодо епідеміології, характеристики імунної відповіді, клінічного перебігу хвороби, імунологічну та коагулологічну характеристику інгібітору, обговорено результати лікування гемофілії з інгібітором. Автор повно характеризує проведені дотепер дослідження прогностичних факторів та підходів до лікування даної патології як в історичному аспекті, так і на теперішній час.

У розділі «Матеріали і методи дослідження» ємко викладено обґрунтування та детальна характеристика використаних методологічних підходів дисертаційної роботи. Об'єкт і предмет дослідження означені вірно. Контингенти обстежених осіб відібрані і включені до основної та контрольної груп вдало і адекватно до мети та завдань дисертації з розумінням того, що визначення оптимального комплексу факторів ризику та розробка алгоритму обстеження та лікування хворих на гемофілію з інгібітором потребує проведення досліджень на значному клінічному матеріалі. Залучення дисертантом до дослідження 652 хворих на ГА та ГВ є достатнім для отримання обґрунтованих

висновків.

Слід підкреслити, що більшість досліджень, які є сучасними, високо інформативними, але й трудомісткими, виконано автором особисто. Дисертаційна робота – це завжди результат багаторічної і важкої праці, особливо, якщо наукові дослідження сполучаються з клінічною практикою. Якщо ж фахівець, яким є лікар-хірург О.В. Стасинин, ще й володіє знаннями та навичками в суміжних дисциплінах, таких як гематологія, імунологія, генетика, коагулологія, молекулярна біологія, статистичний аналіз, це викликає глибоку повагу.

У розділах власних досліджень з вичерпною повнотою викладені основні результати дисертації, їх всебічний аналіз та систематизація, авторська інтерпретація та обговорення у контексті сучасної гематологічної, молекулярно-генетичної та коагулологічної літератури.

В першому розділі власних досліджень (розділ 3) проаналізовано дослідження генетичних факторів схильності до утворення інгібітору у хворих на гемофілію, а саме, результати молекулярно-генетичних досліджень поодиноких поліморфізмів генів імунної відповіді *IL-10*, *TNFA*, *CTLA-4* та дослідження генів МНС II класу. Автор аналізує частоту алелів та генотипів високої, нормальної та низької експресії однонуклеотидних поліморфізмів SNP –1082 G – A гена *IL-10*, SNP –308 G – A гена *TNF- α* та двох: SNP –318 C>T промотера і SNP +49 A>G скзону I гена *CTLA-4* у хворих на гемофілію залежно від тяжкості захворювання та наявності інгібітору. Молекулярно-генетичні дослідження дозволили виявити однонуклеотидні поліморфізми (SNP) генів факторів регуляції імунної відповіді *IL-10*, *TNF α* , *CTLA-4*, які супроводжують схильність до утворення інгібітору. Автор переконливо доводить, наявність асоціативного зв'язку між виникненням інгібітору і алельними варіантами (гаплотипами) генів локусів *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* у хворих на гемофілію А. Виявлено алелі –агресори, *DRB1*1501-1502*, *DRB1*0701-0702*, які підвищують ризик появи інгібітору, та алель-протектор *DQB1*0302*, який знижує цей ризик.

У розділі 4 представлено результати дослідження зовнішніх факторів утворення інгібіторів у хворих на гемофілію, а саме вплив типу препарату, зміни препаратів та виду лікування (профілактичне, «за вимогою») у попередньо лікованих пацієнтів з гемофілією А та В. Автором відзначено, що модифіковані рекомбінантні препарати FVIII(IX) мають здовжений період піврозпаду, що дозволяє зменшити частоту їх введення, і отже, зменшити імуногенний вплив, хоча це може бути й предметом подальших досліджень, оскільки потребує даних тривалого спостереження.

Розділ 5 присвячений прогнозуванню появи інгібітору у хворих на гемофілію. На основі аналізу 15 факторів, які, потенційно можуть впливати на підвищену схильність до розвитку інгібітору методом множинних логіт-регресій визначено статистично значущі предиктори появи інгібітору у хворих на гемофілію та створено зручну, клінічно адаптовану номограму, яка дозволяє з високою точністю прогнозувати виникнення інгібітору у хворих на гемофілію. Хоча виділені фактори ризику дещо відрізняються від літературних, переважають чинники, пов'язані з лікуванням та впливом інших зовнішніх факторів, автор приходить до висновку, що шляхом оптимізації підходів до лікування, можливо мінімізувати появу інгібітору. Доцільно було б продовжувати дослідження в цьому напрямку, збільшуючи вибірку хворих та включати в аналіз додаткові фактори, зокрема генетичні.

В розділі 6 представлено результати коагулологічного дослідження. Хоча дані про частоту інгібітору, яка становить 16,7 %, з достатньо великої групи обстежених на гемофілію пацієнтів не характеризують поширеності гемофілії з інгібітором в Україні, все ж вони відповідають показникам у розвинених країнах. Автором всебічно досліджено коагулологічні характеристики інгібіторних антитіл, а саме, характер інгібітору (постійний, транзиторний), тип кінетичної реакції (проста, складна), тип імунної відповіді на введення препаратів (слабка, сильна), що дозволило доповнити знання про природу інгібітору. Вивчення фармакокінетичних показників дозволило виділити інформативних тест відновлення (ТВ) не тільки для оцінки ефективності замісної терапії фактором

зсідання VIII(IX), але й для виявлення інгібіторної активності, застосування якого могло б мати не тільки клінічний, але й економічний ефект.

Розділ 7 присвячений лікуванню кровотеч у хворих з інгібітором, зокрема, представлені результати дослідження різних препаратів «шунтової» дії, які активують обхідні шляхи зсідання крові. Автором розширено та доповнено знання про гемостатичний механізм дії шунтових препаратів на основі вивчення індексу скорочення АЧТЧ в змодельованому тесті *ex vivo/ in vitro* та оцінки клінічної відповіді монотерапії цими препаратами. Встановлений високий ступінь кореляції між цими показниками, дозволяє застосовувати цей доступний тест з метою поліпшення терапевтичної та економічної ефективності лікування. На основі аналізу та узагальнення власного багаторічного досвіду виділено три групи ризику геморагічних проявів у хворих на гемофілію з інгібітором низького титру та слабкої реакції і обґрунтовано тактику лікування кровотеч та забезпечення гемостазу під час хірургічних втручань.

У 8 розділі представлено матеріал стосовно набутої гемофілії, тяжкого рідкісного захворювання, зумовленого появою аутоімунного інгібітору, що розширює та доповнює теоретичні знання та підходи до лікування імунних інгібіторів.

Заключний розділ роботи автор присвятила обговоренню отриманих результатів і обґрунтуванню алгоритму лікування тяжких кровотеч при вродженій гемофілії з інгібітором та набутій гемофілії, що пропонується.

Загалом, дані, що отримані у докторській дисертації О.В. Сташин, є науково обґрунтованими та доказовими. Наукові положення дисертаційної роботи аргументовані та базуються на достатньому клінічному матеріалі, використанні методів дослідження, які адекватні поставленим завданням, а також сучасному статистичному аналізу отриманих результатів. Їх наукова новизна та практична значущість не викликають сумнівів, причому отримані результати є у переважній більшості новаторськими. Отримано пріоритетні результати про роль генетичних чинників у появі інгібіторів у хворих на гемофілію. Вперше на основі множинних логіт-регресій узагальнено фактори

ризикую появи інгібітору у хворих на гемофілію, що дозволило ідентифікувати пацієнтів з високим ризиком розвитку інгібітору. Доповнено знання про неоднорідну природу інгібіторних антитіл у хворих на гемофілію на основі дослідження кінетики корекції подовженого АЧТЧ нормальною плазмою у зростаючій пропорції до і після інкубації протягом 1 год. Доведено доцільність прогнозування гемостатичної відповіді препаратів «шунтової» дії на підставі змодельованого *ex vivo/in vitro* досліджу на основі тесту АЧТЧ. Вперше обґрунтовано тактику лікування кровотеч і забезпечення гемостазу під час операційних втручань у хворих на гемофілію з виділенням груп ризику геморагічного прояву.

Крім теоретичного значення одержані результати містять суттєві прикладні аспекти. Розроблено нову методику розрахунку ризику появи інгібітору у хворих на гемофілію та створено для практичного застосування номограму, з допомогою якої можна спрогнозувати його появу. На підставі встановлених предикторів обґрунтовано засади профілактики інгібіторів у хворих на гемофілію шляхом зміни підходів до лікування, рекомендовано проводити визначення титру інгібітору за кінетикою корекції подовженого АЧТЧ нормальною плазмою, який впливає на вибір лікувальних препаратів та терапевтичну відповідь.

Для розрахунку індивідуальної дози препаратів при замісній терапії та ранньої діагностики інгібітору у хворих на гемофілію рекомендовано використовувати тест відновлення рівня FVIII(IX) з розрахунком індексу відновлення (IV).

Заслуговує на позитивну оцінку власне викладення здобувачем наукової новизни та практичної значущості одержаних даних, які окреслено лаконічно і без повторень переліку результатів і висновків роботи.

Висновки дисертаційної роботи цілком обґрунтовані, відповідають меті і завданням роботи та впливають з результатів дослідження, що проведено. Перший висновок є "квінтесенцією" усієї дисертації. В ньому охарактеризовано наукову проблему, як вона вирішена і для чого в кінцевому розумінні робота

призначена. Кожен висновок сформульовано чітко і однозначно. Їх формулювання віддзеркалює суть і новизну зробленого.

Результати та висновки дисертації слід використовувати в клінічній діяльності дитячих та дорослих гематологів, хірургів, ортопедів та лаборантів, включити у навчальні цикли по цим спеціальностям як для студентів, так і для лікарів-інтернів, курсантів, клінічних ординаторів та аспірантів.

Автореферат написаний у повній відповідності зі змістом дисертації, відповідає вимогам ДАК України.

Про повноту висвітлення результатів роботи свідчить достатній список публікацій автора, який включає 2 розділи у монографіях (з них 1 розділ у зарубіжній монографії), 38 статей (з них 22 у фахових журналах і збірниках, рекомендованих ДАК України, 10 статей у зарубіжних журналах), 1 посібник, 1 патент на корисну модель та 27 тез доповідей, з них – 15 закордоном. Всього за темою дисертації опубліковано 69 наукових праць. З них відповідають вимогам ДАК України 34 публікації, що повністю достатньо для докторської дисертації. Результати дисертації О.В.Стасишин представлені на багатьох міжнародних та національних наукових конференціях з гематології та трансфузіології.

Наприкінці рецензії хочу поставити автору декілька запитань, на які, сподіваюсь, він дасть відповідь під час дискусії:

1. Чи доцільно, а якщо так, то в якому віці і в якому об'ємі проводити генетичне дослідження у хворих на гемофілію.
2. За Вашими даними, у частини хворих поряд з інгібітором до факторів зсідання крові виявлено активність антифосфоліпідних антитіл, зокрема вивчаючого антикоагулянту. Яке це має клінічне та прогностичне значення?
3. Згідно Ваших даних, ні один з шунтових препаратів (aPCC, rFVIIa) не нормалізує зсідання крові. Які можна запропонувати нові підходи до лікування хворих на гемофілію з інгібітором?

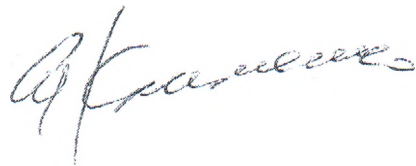
4. Чи проводилося проспективне, або ретроспективне, на незалежній когорті хворих, тестування номограми, яка розроблена Вами для прогнозування виникнення інгібітору у хворих на гемофілію?

Висловлені зауваження, окремі стилістичні та малозначні друкарські помилки в тексті дисертації ніяким чином не впливають на вельми позитивну оцінку роботи.

ВИСНОВОК

Таким чином, робота є самостійно виконаним, завершеним науковим дослідженням, а його результати відповідають необхідним вимогам до науково обґрунтованих нових фактів у медичних науках, які у сукупності вирішують важливу наукову проблему в гематології. Дисертація заслуговує на позитивну оцінку. Вважаю, що дисертаційна робота "Молекулярно-генетичні механізми патогенезу і шляхи оптимізації діагностики, лікування та профілактики появи інгібітору у хворих на гемофілію", відповідає вимогам п.13 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 07.03.2007 № 423, а її автор Стасишин О.В. заслуговує присудження їй наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.01.31 – гематологія та трансфізіологія

Завідувач відділу медичної генетики
ДУ «Національний науковий центр
радіаційної медицини НАМН України»,
д.мед.н., професор



С.В. Клименко

