

УДК 616.151.514-097

**В.В. Красівська, О.В. Стасишин**

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини Національної академії медичних наук України», Львів

# Вплив на гемостаз *ex vivo/in vitro* шунтових препаратів у хворих на гемофілію з інгібітором

## АНОТАЦІЯ

У 23 хворих на гемофілію з інгібітором (14 осіб) та без інгібіторних антитіл до фактора з'єднання VIII (9 осіб) *ex vivo/in vitro* вивчено вплив препаратів обхідної дії (рекомбінантного активованого фактора VII (rFVIIa) та активованого протромбінового комплексу (aPCC) порівняно з неактивованим протромбіновим комплексом – PCC) у тесті активованого часткового тромбoplastинового часу (АЧТЧ). Встановлено, що АЧТЧ є інформативним та доступним методом для моніторингу гемостатичного ефекту шунтових препаратів у хворих на гемофілію з інгібітором *ex vivo/in vitro*. Виявлено, що rFVIIa більшою мірою вкорочує АЧТЧ, ніж aPCC, хоча при додаванні до плазми хворих на гемофілію *ex vivo/in vitro* в рекомендованих середньотерапевтичних дозах обидва препарати не нормалізують досліджуваний показник.

## Ключові слова:

гемофілія, інгібітор, шунтові препарати, рекомбінантний активований фактор VII, активований протромбіновий комплекс.

Гемофілія А – вроджене, зчеплене зі статтю геморагічне захворювання, зумовлене мутацією в Х-хромосомі, що супроводжується дефіцитом фактора з'єднання крові VIII (FVIII). Більшості пацієнтів з метою нормалізації гемостазу протягом усього життя проводять замісну терапію препаратами FVIII в профілактичному режимі або за потреби. Але, на жаль, майже у 30% хворих з тяжкою формою гемофілії А (FVIII <1%) у відповідь на введення концентратів FVIII виникають нейтралізуючі алоантитіла (інгібітори). На відміну від пацієнтів зі слабою імунною відповіддю і низьким титром інгібітора (<5 БО/мл), в яких у разі підвищення дози FVIII досягається гемостаз, у пацієнтів із сильною відповіддю і високим титром інгібітора (>5 БО/мл) введення цих препаратів є неефективним. З метою зупинки кровотечі у них застосовують препарати із «шунтовим», або «обхідним», механізмом дії, які спричиняють формування тромбіну незалежно від FVIII [2, 3, 6, 8, 9, 16, 17].

На сучасному етапі лише два терапевтичні продукти довели свою ефективність у зупинці кровотеч у хворих на гемофілію з інгібітором: препарат активованого протромбінового комплексу (aPCC) та рекомбінантний активований фактор VII (rFVIIa) [3, 6, 9, 17]. Але, на жаль, жоден з них нездатний повністю нормалізувати гемостаз до рівня в осіб без гемофілії. Також кожен із шунтових препаратів не демонструє однаковий лікувальний ефект у всіх пацієнтів [2, 3, 6, 8, 17]. При використанні в рекомендо-

ваних дозах (50–100 од/кг) aPCC є ефективним в усуненні 80–100% кровотеч [2, 3, 6], в той час як при застосуванні rFVIIa в стандартній дозі (90 мкг/кг) ефект був досягнутий приблизно в 60–100% пацієнтів [3, 6]. Хоча основними гемостатичними препаратами у хворих з інгібітором є два препарати (aPCC, rFVIIa), ми порівняли їхню дію *ex vivo/in vitro* з препаратом неактивованого протромбінового комплексу (PCC), який має історичне значення – PCC застосовували до появи aPCC і до недавнього часу він був рекомендований в міжнародних керівництвах. За даними багатьох досліджень його ефективність при лікуванні гемартрозів становила близько 50% [1, 18].

Терапевтична відповідь хворих на гемофілію А з інгібітором на введення препаратів обхідної дії може бути зумовлена цілою низкою чинників, зокрема: концентрацією протромбіну в крові, рівнем FVIII в циркуляції, вимірним *ex vivo* кількістю тромбоцитів (поверхня яких містить необхідні для активації та взаємодії факторів з'єднання фосфоліпіди), тяжкістю кровотечі, її локалізацією, віком пацієнта та наявністю у нього суглоба-мішені [1, 3, 7]. Однак вплив кожного з цих чинників до кінця не вивчено, що потребує подальших досліджень.

У хворих на гемофілію без інгібіторних антитіл рівень FVIII (FIX), визначений після введення концентрату дефіцитного фактора, достатньо чітко корелює з очікуваною клінічною відповіддю. У пацієнтів з інгібітором

однією з причин недостатньо вивчених механізмів забезпечення гемостатичної відповіді аРСС та rFVIIa *in vivo* є відсутність надійних лабораторних методів контролю за ефективністю шунтових препаратів, їхнім впливом на гемостаз *in vivo* та *in vitro* [12, 16]. У літературі описано декілька методів, які можуть бути використані для моніторингу терапії препаратами обхідної дії, серед них тромбоеластографія, тест генерації тромбіну, АЧТЧ з аналізом форми хвилі згустку, рутинні тести визначення АЧТЧ, протромбінового часу тощо [1, 3–5, 8, 12–14, 16]. Відомо, що основні порушення в системі згортання крові при гемофілії А, як неускладненій, так і ускладненій появою інгібітора, відбуваються по внутрішньому шляху зсідання крові. Оскільки АЧТЧ оцінює ендогенний процес утворення згустку шляху (виключно коагуляційний гемостаз), він є високоспецифічним власне для хворих на гемофілію. Тому, на нашу думку, цей тест є достатньо інформативним для вивчення *ex vivo/in vitro* впливу на систему зсідання препаратів шунтової дії у таких пацієнтів.

З метою оцінки гемостатичного ефекту *ex vivo/in vitro* концентратів препаратів рекомбінантного активованого фактора VII та активованого протромбінового комплексу порівняно з неактивованим протромбіновим комплексом досліджували АЧТЧ плазми крові хворих на гемофілію А з інгібітором фактора VIII та без інгібіторних антитіл.

### Матеріали і методи дослідження

У дослідженні брали участь 23 хворих на гемофілію А віком від 4 до 62 років, які перебували у базових клінічних та лабораторних відділеннях ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України». Серед них було 14 хворих з інгібіторними антитілами до дефіцитного фактора зсідання (титр від 0,78 до 150 БО/мл) та 9 хворих на гемофілію А, не ускладнену інгібітором. Контрольну групу для визначення нормальних коагулологічних показників склали 20 здорових осіб (10 чоловіків і 10 жінок середнього віку), які не приймали жодних ліків.

Усім хворим проводили загальноклінічне обстеження, лабораторні та коагулологічні дослідження. Для визначення гемостазу плазму отримували шляхом венопункції. У пластиковій пробірці кров стабілізували 3,2% розчином натрію цитрату у співвідношенні: 1 частина стабілізатора до 9 частин крові. Подальшу підготовку проводили шляхом послідовного центрифугування в двох режимах (7 хв при 110g та 20 хв при 2000g) до отримання збідненої на тромбоцити плазми. Зразки заморожували за температури  $-80^{\circ}\text{C}$  та розморожували за температури  $37^{\circ}\text{C}$  одразу перед дослідженням [11].

Коагулологічні дослідження виконували на напівавтоматичному коагулометрі Helena-S4 (Helena Bioscience Europe, Великобританія). Для загальної оцінки стану системи гемостазу виконували скринінгові дослідження, які включали визначення: протромбінового часу (ПЧ) (рідкий тромбoplastин, Helena Bioscience Europe, Великобританія); активованого часткового тромбoplastинового часу (АЧТЧ) (Actin, Siemens, Німеччина); тромбінового часу (ТЧ) (однокомпонентний реагент 3 НН/мл,

Helena Bioscience Europe, Великобританія); концентрації фібриногену гравіметричним методом. Діагностику форми коагулопатії здійснювали за допомогою тесту якісних замінних проб на основі АЧТЧ [11]. Оцінку активності дефіцитного фактора зсідання крові проводили за уніфікованою одностадійною методикою визначення ФVIII (реактиви Siemens, Німеччина) і виражали у відсотках від їхнього вмісту в нормальній плазмі крові. Обстеження на наявність інгібіторних антитіл до дефіцитного фактора зсідання VIII виконували за допомогою скринінгового якісного та, у разі позитивного результату, кількісного тесту за методикою Kasper (1975) (реактиви Siemens, Німеччина). Результат виражали в Бетесда од/мл (БО/мл) [11]. Дослідження проводили у пацієнтів без активних крововиливів.

У хворих на гемофілію з інгібітором та без інгібітора *ex vivo/in vitro* вивчали вплив на зсідання препаратів шунтової дії неактивованого протромбінового комплексу (РСС), активованого протромбінового комплексу (антиінгібіторного комплексу – аРСС) та рекомбінантного активованого фактора VII (rFVIIa). Змодельоване *ex vivo/in vitro* дослідження проводили на основі тесту АЧТЧ, який виконували за загальноприйнятною методикою.

Концентрати препаратів розводили згідно з інструкцією до застосування. Отриманий маточний розчин зберігали у замороженому стані за температури  $-80^{\circ}\text{C}$  до використання. Безпосередньо перед дослідженням отримували робочий розчин шляхом розведення у дистильованій воді маточного розчину концентрату аРСС та РСС. При визначенні АЧТЧ кінцева концентрація аРСС та РСС становила 0,25 од/мл, її розраховували відповідно до інструкції за вмістом фактора IX. Після необхідного розведення маточного розчину rFVIIa імідазольним буфером його кінцева концентрація складала 2,5 мкг/мл. Оскільки лікувальні дози РСС та аРСС становлять 50–100 од/кг, під час проведення дослідження АЧТЧ *ex vivo/in vitro* кінцеві концентрації препаратів активованого та неактивованого протромбінового комплексу відповідали дозі 75 од/кг у плазмі крові пацієнта. Кінцева концентрація rFVIIa у дослідженні співвідносилася з терапевтичною дозою концентрату rFVIIa 90 мкг/кг [12].

Техніка проведення тесту полягала у змішуванні 50 мкл дослідної плазми з 25 мкл робочого розчину концентрату шунтового препарату та 75 мкл АЧТЧ-реагента. Після інкубації протягом 3 хв до суміші додавали 75 мкл розчину кальцію хлориду (0,025 моль/л) і відмічали час утворення згустку [11]. Для коректного співставлення результатів за початкове значення вважали АЧТЧ хворого після додавання до його плазми 25 мкл імідазольного буфера. Контрольним був АЧТЧ, визначений у нормальній плазмі після її змішування з 25 мкл буфера. Надалі досліджували показники часу зсідання після додавання до плазми кожного концентрату окремо та порівнювали з початковими показниками АЧТЧ. Вплив на гемостаз оцінювали як відсоток вкорочення або подовження порівняно з початковим часом зсідання. Зростання позначали знаком «–». АЧТЧ плазми крові хворих на гемофілію без

інгібіторних антитіл, до якої додавали препарати обхідної дії, вважали за позитивний контроль. Також порівнювали показники між групами хворих та контрольною групою.

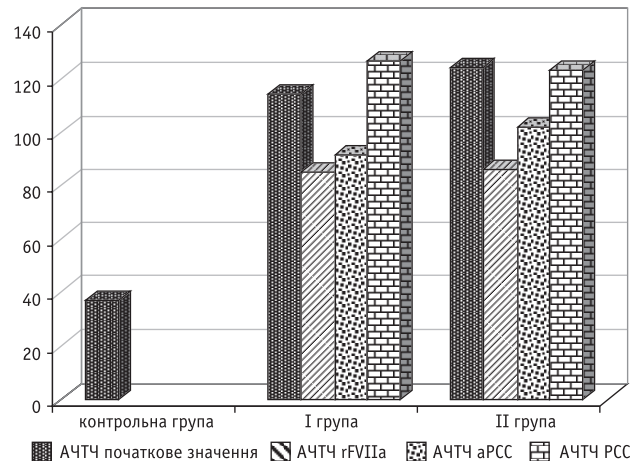
Препарат РСС, використаний у дослідженні, містив у середньому 0,45 МО гепарину на 1 МО фактора ІХ (FIX). При кінцевій концентрації FIX 0,25 МО/мл вміст становив <0,12 МО/мл відповідно [1]. Для перевірки істотного впливу залишків гепарину на результати випробувань визначали АЧТЧ у плазмі крові осіб контрольної групи при додаванні до неї 25 мкл робочого розчину РСС. Отримані результати порівнювали з часом зсідання тієї самої контрольної плазми після її змішування з 25 мкл буфера. Достовірної різниці між показниками не виявлено, що свідчить про відсутність істотного впливу залишків гепарину на час зсідання: 37,0 (35,6–43,4) [36,0–38,6] проти 37,0 (33,4–40,7) [35,0–38,3] с; ( $p=0,123$ ).

Статистичну обробку матеріалу виконували за допомогою пакетів прикладних програм STATISTICA for Windows 5,0 (Statsoft, USA). Показники подано як «медіана (мінімум-максимум) [нижній-верхній квартилі]». Порівняння окремих груп проводили за допомогою параметричного критерію різниці (тесту Стьюдента), вірогідність отриманих результатів оцінювали на рівні достовірності не менше 95% ( $p<0,05$ ).

### Результати дослідження та їх обговорення

За результатами обстеження на інгібітори всіх хворих розділили на дві групи. До І групи було включено хворих на гемофілію А з виявленими інгібіторними антитілами до FVIII (титр 8,8 (0,8–150,0) [4,9–26,5] БО/мл), до ІІ – хворих без інгібіторів. У І групі активність FVIII становила 0,6 (0,1–5,2) [0,1–1,3]%, у ІІ – рівень дефіцитного фактора був дещо нижчим і дорівнював 0,2 (0,1–2,1) [0,1–0,3]%. У контрольній групі цей показник становив 109,9 (87,0–140,0) [99,0–117,5]%

Результати дослідження представлено в таблиці та на рисунку. У хворих на гемофілію з інгібітором та без інгібіто-



**Рисунок.** Показники АЧТЧ *ex vivo/in vitro* у хворих на гемофілію з інгібітором (І група) та без інгібітора (ІІ група) після додавання до плазми препаратів шунтової дії: rFVIIa, aPCC та РСС

ра АЧТЧ був значно подовженим і медіана становила 114,0 (74,0–135,0) [100,0–125,0] с та 124,0 (97,5–181,0) [104,0–142,0] с відповідно. Різниця з відповідними показником у контрольній групі була достовірною (в обох випадках  $p<0,05$ ), між групами достовірної різниці щодо початкового АЧТЧ не виявлено ( $p=0,116$ ). Індекс АЧТЧ (ІАЧТЧ), який розраховується як співвідношення часу зсідання крові хворого до часу зсідання в осіб контрольної групи (37,0 (33,4–40,7) [35,0–38,3] с), становив 3,2 (2,0–3,7) [2,9–3,6] у І групі та був недостовірно дещо більшим у ІІ – 3,3 (2,8–4,5) [2,8–3,6];  $p=1,430$ .

Як і кожен з лабораторних методів, тест АЧТЧ має свої недоліки та переваги. Елагова кислота або кремнію діоксид, або суспензія каоліну, які містяться у реагенті, не є такими фізіологічними активаторами контактної фази у внутрішньому шляху утворення протромбінази, як тканинний фактор [5]. Але це не повинно впливати на результат, оскільки кожен пацієнт слугував контролем сам

Таблиця

**Показники АЧТЧ *ex vivo/in vitro* у хворих на гемофілію з інгібітором та без інгібітора після додавання до плазми rFVIIa, aPCC та РСС**

Показник	Група	
	I (n=14)	II (n=9)
АЧТЧ	114,0 (74,0–135,0) [100,0–125,0] <sup>#</sup>	124,0 (97,5–181,0) [104,0–142,0] <sup>#</sup>
I <sub>АЧТЧ</sub>	3,1 (2,0–3,7) [2,9–3,6]	3,3 (2,8–4,5) [2,8–3,6]
АЧТЧ <sub>rFVIIa</sub>	82,0 (67,5–95,0) [72,0–87,0] <sup>#,*</sup>	86,0 (73,9–115,0) [80,0–97,0] <sup>#,*</sup>
Вкорочення, %	29,5 (2,7–35,6) [26,0–32,5]	23,2 (15,4–52,0) [17,3–37,9]
АЧТЧ <sub>aPCC</sub>	91,5 (68,0–125,0) [80,0–116,0] <sup>#,*</sup>	102,0 (78,0–146,3) [95,0–114,0] <sup>#</sup>
Вкорочення, %	15,3 (7,2–29,2) [8,1–23,2]	16,8 (5,8–22,5) [15,9–19,2]
АЧТЧ <sub>РСС</sub>	126,8 (85,0–160,0) [103,0–142,0] <sup>#</sup>	123,1 (100,0–185,1) [109,0–154,0] <sup>#</sup>
Вкорочення, %	–9,9 ((–29,1)–12,0) [(–16,4)–(–4,1)]	–2,3 ((–16,9)–3,9) [(–4,8)–(–0,8)]

**Примітки:** 1. Дані наведено як «медіана (мінімум-максимум) [нижній-верхній квартилі]»; 2. Індекс (I) розраховується як співвідношення часу зсідання у плазмі крові пацієнтів дослідної групи до відповідного часу зсідання в осіб контрольної; 3. # – різниця з показником контрольної групи значуща ( $p<0,05$ ); 4. \* – різниця з показником початкового АЧТЧ значуща.

для себе (отримане значення порівнювали з власним початковим АЧТЧ) [8]. З іншого боку, контактний активатор АЧТЧ-реагента має декілька переваг над тканинним активатором: по-перше, сама методика є стандартизованою та уніфікованою, між різними партіями реагентів немає значної розбіжності активності, що забезпечує невисоку варіабельність отриманих результатів; по-друге, реагенти є доступними, флакони поставляються у готовій формі, не потребують додаткової обробки та розведення. У плазмі крові хворих на гемофілію з інгібітором FVIII не функціонує у внутрішньому шляху генерації тромбіну, тому реакції активації FX, що обумовлені гFVIIa, залежать від доданих до вимірювальної суміші фосфоліпідів [1, 16]. Також достатня та наперед однакова кількість фосфоліпідів у АЧТЧ-реагенті (кефалін, еритрофосфатид, рослинні або синтетичні фосфоліпіди) дозволяє знехтувати кількістю тромбоцитів у кожного окремого пацієнта [1, 7, 16]. На нашу думку, результати такого загальновідомого рутинного та зручного методу, як АЧТЧ, можуть забезпечити швидкий та недорогий аналіз відповіді на шунтовий препарат, допоможуть провести моніторинг гемостазу *in vivo*, *ex vivo/in vitro* у хворих на гемофілію з інгібітором, що дасть можливість прогнозувати клінічну відповідь на лікування та сприятиме раціональнішому використанню препаратів.

Найбільший вплив на зсідання *ex vivo/in vitro* було відзначено після додавання до плазми крові хворих на гемофілію гFVIIa. У досліджених I групи значуще вкорочення початкового АЧТЧ відбулося до 82,0 (67,5–95,0) [72,0–87,0] с порівняно з 114,0 (74,0–135,0) [100,0–125,0] ( $p_{\text{гFVIIa I гр.}} = 0,001$ ), що становить 29,5 (2,7–35,6) [26,0–32,5]%. Більший гемостатичний ефект проявлявся у вкороченні початкового часу зсідання на 16,8 (5,8–22,5) [15,9–19,2]% та достовірному зменшенні початкового АЧТЧ до 86,0 (73,9–115,0) [80,0–97,0] с з 124,0 (97,5–181,0) [104,0–142,0] с;  $p_{\text{гFVIIa II гр.}} = 0,002$ . Різниця значень АЧТЧ між I і II групами після додавання гFVIIa залишалась недостовірною;  $p_{\text{гFVIIa I-II гр.}} = 0,093$ . Хоча у хворих обох груп після додавання до плазми гFVIIa відбулось найбільше вкорочення АЧТЧ, час зсідання не досяг нормального значення, про що свідчить значуща різниця з відповідним показником в осіб контрольної групи ( $p < 0,05$ ).

Введення до системи *ex vivo/in vitro* аРСС дещо зсуває гемостаз хворих на гемофілію у бік покращання коагуляції. Ми спостерігали зменшення початкового АЧТЧ: 91,5 (68,0–125,0) [80,0–116,0] с проти 114,0 (74,0–135,0) [100,0–125,0] с у I групі та 102,0 (78,0–146,3) [95,0–114,0] с проти 124,0 (97,5–181,0) [104,0–142,0] с) – у II, про що свідчить відсоток вкорочення – 15,3 (7,2–29,2) [8,1–23,2]% та 16,8 (5,8–22,5) [15,9–19,2]%. У хворих на гемофілію з інгібітором різниця між показниками була значуща:  $p_{\text{аРСС у I групі}} = 0,017$ , у хворих без інгібіторів відмінності між показниками не виявлено ( $p_{\text{аРСС II гр.}} = 0,092$ ). Також не встановлено відмінностей відповідних показників між I та II групами ( $p_{\text{аРСС I-II гр.}} = 0,163$ ).

Як видно з таблиці, після додавання до плазми хворих РСС у обох групах відзначено подовження часу зсідання до

126,8 (85,0–160,0) [103,0–142,0] с проти 114,0 (74,0–135,0) [100,0–125,0] с у I групі та до 123,1 (100,0–185,1) [109,0–154,0] с проти 124,0 (97,5–181,0) [104,0–142,0] с – у II. Значущої різниці з початковим часом зсідання у кожній групі та між АПТЧ<sub>РСС</sub> хворих з інгібітором та без інгібітора не виявлено ( $p_{\text{РСС I гр.}} = 0,190$ ;  $p_{\text{РСС II гр.}} = 0,790$ ;  $p_{\text{РСС I-II гр.}} = 0,462$  відповідно). За підрахунком відсотка збільшення початкового часу зсідання після додавання РСС у хворих обох груп ми виявили зростання АЧТЧ на –9,9 ((–29,1)–12,0) [(–16,4)–(–4,1)]% у I групі та дещо менше –2,3 ((–16,9)–3,9) [(–4,8)–(–0,8)]% у хворих II (див. таблицю).

У першу чергу відповідь хворого на гемофілію з інгібітором на препарат шунтової дії зумовлена самим механізмом, за яким протромбіновий комплекс (аРСС, РСС) та гFVIIa спричиняють утворення тромбіну як кінцевого продукту зсідання. Оскільки препарати протромбінового комплексу містять такі компоненти, як протромбін (FII), FVII/FVIIa, FIX/FIXa та FX/FXa, вони ініціюють обидва шляхи коагуляції – внутрішній та зовнішній. Значною мірою відповідальними за гемостатичний ефект аРСС є активований FX і протромбін. На поверхні тромбоцита комбінація FXa з активованим фактором V (FVa) перетворює протромбін у тромбін і весь цей комплекс називають протромбіназою. Також FXa сам по собі (за відсутності інших кофакторів) може каталізувати генерацію тромбіну. При цьому гFVIIa впливає на гемостаз і спричиняє утворення тромбіну виключно через зовнішній шлях зсідання. У комплексі із тканинним фактором (TF) (у високій концентрації незалежно від TF) гFVIIa активує FX та в подальшому на поверхні тромбоцитів відбувається FXa-тромбіновий вибух [3, 5, 9, 15]. Цей процес не залежить від наявності факторів внутрішнього шляху коагуляції, що і забезпечує обхідний (шунтовий) механізм дії препарату. Очевидно, власне така вибухова та негайна дія гFVIIa забезпечує найкращий ефект препарату при зупинці гострих кровотеч.

Ми виявили, що у хворих на гемофілію без інгібіторів гемостатичний потенціал аРСС був дещо вищий (хоча й недостовірно), ніж у хворих з інгібітором. Це можна пояснити замісною дією залишкових кількостей FVIII, який міститься у препараті, що може призводити до незначного вкорочення АЧТЧ. У хворих з інгібітором наявність залишкових кількостей цього чинника може стимулювати активність інгібітора (посилити нейтралізуючу дію антитіл), що підтверджується даними літератури. У хворих цієї групи при застосуванні аРСС описано зростання титру інгібітора на початку лікування [10].

Гемостатична відповідь на аРСС та гFVIIa є порівняльною, хоча ступінь терапевтичної ефективності цих препаратів у хворих на гемофілію з інгібіторними антитілами дещо відрізняється [3, 8]. Сучасна клінічна практика передбачає, що у хворих на гемофілію з інгібітором у високому титрі аРСС та гFVIIa еквівалентні за своєю лікувальною ефективністю. У пацієнтів з гемофілією А без інгібітора гемостатичний ефект цих препаратів завжди нижчий (повністю не нормалізує АЧТЧ), ніж такий препаратів FVIII у рекомендованих дозах [2].

Описано також рідкісні несприятливі тромботичні події при використанні обох препаратів обхідної дії [1, 7].

Чинники, від яких залежить різна відповідь пацієнтів на терапію шунтовими препаратами, до кінця невідомі, але вони можуть бути подібними до тих, що впливають на тяжкість перебігу гемофілії. Зокрема, одночасне спадкування тромбогенних чинників ризику, таких як мутації FV Leiden і протромбіну G20210A, дефіцит протеїну C та S, антитромбіну III, можуть полегшувати фенотип гемофілії [3]. В тестах АЧТЧ, проведених *ex vivo/in vitro* в нашому дослідженні, на результати могли впливати лише біологічні чинники, які містяться в плазмі. Ми не могли врахувати такі показники, як локалізація, тривалість та тяжкість кровотечі, наявність суглоба-мішені тощо. Оскільки визначення показника відбувалось тільки в момент додавання препарату, в подальшому було б доцільно визначати АЧТЧ залежно від часу інкубації та титру інгібітора з можливим виявленням корелятивних зв'язків між дослідженнями різних лабораторних показників *in vivo* та *in vitro* з метою вивчення і прогнозування індивідуальної відповіді хворого на гемофілію з інгібітором на препарат.

#### ВИСНОВКИ

1. АЧТЧ є інформативним та доступним методом для моніторингу гемостатичного ефекту шунтових препаратів у хворих на гемофілію з інгібітором *ex vivo/in vitro*.

2. Шунтові препарати реалізують свій гемостатичний потенціал як у хворих на гемофілію з інгібітором, так і у пацієнтів без інгібіторних антитіл до дефіцитного фактора з'єднання VIII.

3. Активованій рекомбінантний фактор VII (rFVIIa) більшою мірою вкорочує АЧТЧ, ніж активований протромбіновий комплекс (aPCC), хоча при додаванні до плазми хворих на гемофілію з інгібітором *ex vivo/in vitro* в рекомендованих середньотерапевтичних дозах обидва препарати не нормалізують досліджуваний показник.

4. У подальшому доцільно спрямувати зусилля на вивчення впливу препаратів шунтової дії у хворих на гемофілію А з інгібітором *in vivo* з виявленням можливих корелятивних зв'язків із дослідженнями поза організмом; на розширення спектра терапевтичних препаратів для зупинки кровотеч у таких хворих; на дослідження ефективності різних комбінацій препаратів та на удосконалення методів лабораторного контролю за їхньою дією.

#### Список літератури

1. A novel Approach to Treating FVIII Inhibitors: In Vitro Results for Combination Therapy with Human Prothrombin Complex Concentrate and Plasma-Derived FVIII/VWF Complex / J.R. Roemisch, K. Pock, I. Laher-Kheirallah et al. // *Webmed Central Haematology*. – 2011. – Vol. 2, № 11. – WMC002444.
2. Anti-Inhibitor Coagulant Complex Prophylaxis in Hemophilia with Inhibitors / C. Leissinger, A. Gringeri, B. Antmen et al. // *The New England Journal of Medicine*. – 2011. – Vol. 365. – P. 1684–1692.
3. Bernthrop E. Differential response to bypassing agents complicates treatment in patients with haemophilia and inhibitors / E. Bernthrop // *Haemophilia*. – 2009. – Vol. 15. – P. 3–10.
4. Combined administration of FVIII and rFVIIa improves haemostasis in haemophilia A patients with high-responding inhibitors – a thrombin generation-guided pilot study / T. Livnat, U. Martinowitz, S. Azar-Avivi et al. // *Haemophilia*. – 2013. – Vol. 19. – P. 1–8.
5. Comparison of kaolin and tissue factor activated thromboelastography in haemophilia / G. Young, R. Zhang, R. Miller et al. // *Haemophilia*. – 2010. – Vol. 16. – P. 518–524.
6. Diagnosis and treatment of factor VIII and IX inhibitors in congenital haemophilia: (4th edition) / Collins P.W., Chalmers E., Hart D.P. et al. // *British Journal of Haematology*. – 2013. – Vol. 160. – P. 153–170.
7. Effects of factor VIII inhibitor bypassing activity (FEIBA), recombinant factor VIIa or both on thrombin generation in normal and haemophilia A plasma / T. Livnat, U. Martinowitz, A. Zivelin et al. // *Haemophilia*. – 2008. – Vol. 14. – P. 782–786.
8. Individualization of bypassing agent treatment for haemophilic patients with inhibitors utilizing thromboelastography / G. Young, R. Blain, P. Nakagawa et al. // *Haemophilia*. – 2006. – Vol. 12. – P. 598–604.
9. Ingerslev J. Parallel use of by-passing agents in haemophilia with inhibitors: a critical review / J. Ingerslev, B. Sorensen // *British Journal of Haematology*. – 2011. – Vol. 155. – P. 256–262.
10. Hilgartner M.W. Long-term FEIBA prophylaxis does not prevent progression of existing joint disease / M.W. Hilgartner, A. Makierna, D.M. DiMichele // *Haemophilia*. – 2003. – Vol. 9. – P. 261–268.
11. Kitchen S. Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders. A laboratory manual / S. Kitchen, A. McCraw, M. Echenagucia [2<sup>nd</sup> ed.]. – Canada, Montreal: World Federation of Hemophilia (WFH). – 2010. – 144 p.
12. Klintman J. Combination of FVIII by-passing agent potentiates *in vitro* thrombin production in haemophilia A inhibitor plasma / J. Klintman, J. Astermark, E. Bernthrop // *British Journal of Haematology*. – 2010. – Vol. 151. – P. 381–386.
13. Klintman J. Thrombin generation *in vitro* in the presence of by-passing agents in siblings with severe haemophilia A / J. Klintman, E. Bernthrop, J. Astermark // *Haemophilia*. – 2010. – Vol. 16, Issue 1. – P. e210–e215.
14. Monitoring the bioavailability of FEIBA with a thrombin generation assay / K. Váradi, C. Negrier, E. Bernthrop et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – Vol. 1, Issue 11. – P. 2374–2380.
15. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of recombinant canine FVIIa in a study dosing one haemophilia A and one haemostatically normal dog / T. Knudsen, A.T. Kristensen, T.C. Nichols et al. // *Haemophilia*. – 2011. – Vol. 17. – P. 962–970.
16. Results of clot waveform analysis and thrombin generation test for a plasma-derived factor VIIa and X mixture (MC710) in haemophilia with inhibitors-phase I trial: 2nd report / A. Shirahata, K. Fukutake,

- J. Mimaya et al. // Haemophilia. – 2013. – Vol. 19. – P. 330–337.
17. Sequential combined bypassing therapy is safe and effective in the treatment of unresponsive bleeding in adults and children with haemophilia and inhibitors / Gringeri A, Ficsher K., Karafoulidou A. et al. // Haemophilia. – 2011. – Vol. 17. – P. 630–635.
18. The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors: a guideline from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organisation / Hay C.R.M., Brown S., Collins P.W. et al. // British Journal of Haematology. – 2006. – Vol. 133. – P. 591–605.

#### **Влияние на гемостаз *ex vivo/in vitro* шунтирующих препаратов у больных гемофилией с ингибитором**

В.В. Красивская, А.В. Сташишин

**РЕЗЮМЕ.** У 23 больных гемофилией с ингибитором (14 человек) и без ингибиторных антител к фактору свертывания VIII (9 человек) *ex vivo/in vitro* изучено влияние препаратов обходного действия (рекомбинантного активированного фактора VII (rFVIIa) и активированного протромбинового комплекса (aPCC) в сравнении с неактивированным протромбиновым комплексом – PCC) в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Установлено, что АЧТВ является информативным и доступным методом для мониторинга гемостатического эффекта шунтирующих препаратов у больных гемофилией с ингибитором *ex vivo/in vitro*. Выявлено, что rFVIIa в большей мере укорачивает АЧТВ, чем aPCC, хотя при добавлении к плазме больных гемофилией *ex vivo/in vitro* в рекомендованных среднетерапевтических дозах оба препарата не нормализуют исследуемый показатель.

**Ключевые слова:** гемофилия, ингибитор, шунтирующие препараты, рекомбинантный активированный фактор VII, активированный протромбиновый комплекс.

#### **Influence of the bypassing agents on *ex vivo/in vitro* haemostasis in patients with haemophilia complicated by inhibitor**

V.V. Krasivska, O.V. Stasyshyn

**SUMMARY.** The group of 23 patients with haemophilia, both complicated by inhibitor (n=14) and those without inhibitor antibodies to coagulation factor VIII (n=9) were investigated *ex vivo/in vitro* for the influence of bypassing agents (recombinant activated factor VII (rFVIIa) and activated prothrombin complex (aPC) compared to non-activated prothrombin complex PC) using activated partial thromboplastin time (APTT) test. As a result, APTT was confirmed to be an informative and easily accessible method for *ex vivo/in vitro* monitoring of haemostatic effect of the bypassing agents in patients with haemophilia complicated by inhibitor. rFVIIa induced more significant shortening of APTT than aPCC, however, addition *ex vivo/in vitro* of both of these agents in recommended average therapeutic doses to blood plasma of patients with haemophilia did not lead to complete normalization of this parameter.

**Key words:** haemophilia, inhibitor, bypassing agents, recombinant activated factor VII, activated prothrombin complex concentrate.

**Адреса для листування:**

Валерія Валеріївна Красівська

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»

Львів, вул. Генерала Чупринки, 45