

Raport z 7th *Inhibitor Workshop for Opinion Leaders in Haemophilia* Antalya, Turcja, 24–26 czerwca 2009 roku

Siódmy z kolei *Inhibitor Workshop for Opinion Leaders in Haemophilia* dla specjalistów z krajów Europy Centralnej i Wschodniej odbył się w dniach 24–26 czerwca 2009 roku w Antalyi w Turcji. Podobnie jak poprzednie spotkania, konferencja była poświęcona klinicznemu aspektowi leczenia pacjentów z hemofilią i krążącym antykoagulantem oraz klinicznym problemom, które wiążą się z tym leczeniem. Sponsorem tego spotkania była firma Baxter.

W tym roku gospodarzem była Turcja, która już w 1974 roku organizowała 11. Kongres *World Federation of Haemophilia* (kolejny raz odpowiadała za organizację 28. Kongresu WFH w 2008 roku).

Historię leczenia chorych na hemofilię w Turcji przedstawił podczas wykładu inauguracyjnego prof. Bülent Zülfikar z Kliniki Hematologii i Onkologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego Cerrahpassa w Stambule.

Diagnostyka i leczenie chorych na hemofilię i inne wrodzone skazy krwotoczne mają w tym kraju długą historię i zaczynają się przed 1970 rokiem. Początkowo leczenie tych chorych opierało się na przetaczaniu osocza. Koncentraty izolowanych czynników krzepnięcia wprowadzono w Turcji do leczenia chorych na hemofilię w latach 90. ubiegłego stulecia, gwałtownie poprawiając jakość ich życia. Powstały stowarzyszenia, takie jak *Turkish Society of Hemophilia*, *Aegean Society of Hemophilia*, *Black Sea Society of Hemophilia*, wspomagające tę grupę chorych poprzez czynną edukację, organizowanie obozów, różnych spotkań i uroczy-

stości promujących nowoczesną wiedzę, stwarzających platformę współpracy. Dzisiaj chorzy na hemofilię, ich rodziny i lekarze leczący tę grupę chorych są zrzeszeni w jedenastu różnych stowarzyszeniach posiadających swoje siedziby w szesnastu miastach Turcji.

Dzięki nowoczesnemu podejściu do leczenia zużycie koncentratów czynników krzepnięcia wzrosło z 0,2 jednostek na głowę mieszkańca w 1997 roku do 1,2 jednostek na głowę mieszkańca w 2008 roku.

W 2001 roku Ministerstwo Zdrowia rozpoczęło prace nad centralnym rejestrem wszystkich chorych na hemofilię; liczba zarejestrowanych wzrosła z 1048 w 1996 roku do 4283 w 2008 roku.

Program naukowy stanowiły cztery sesje:

1. Doświadczenia wyniesione z niepowodzeń leczenia;
2. Aktualne badania naukowe;
3. Chirurgia;
4. Doniesienia z różnych krajów — prezentacja przypadków.

Przedstawiamy czytelnikom obszerny raport z tego spotkania, mając nadzieję, że poruszona tematyka zachęci Państwa do poszerzania wiedzy dotyczącej leczenia chorych na hemofilię z krążącym antykoagulantem.

Pragnę podkreślić, że znajdziecie tu Państwo nie tylko streszczenia wykładów wybitnych specjalistów z całego świata, ale także kilka bardzo aktualnych prac poglądowych, przygotowanych na podstawie tych wykładów.

Magdalena Łętowska
Redaktor Naczelny

Michał Jamrozik

Przeciwciała nienutralizujące przeciwno czynnikowi VIII

na podstawie wykładu *Non-neutralizing antibodies in hemophilia* — Jan Astermark (Malmö, Szwecja)

Pojawienie się inhibitora przeciwno czynnikowi VIII jest poważnym i stosunkowo częstym powikłaniem lecze-

nia hemofilii A. Inhibitory są przeciwciałami należącymi głównie do immunoglobulin klasy G (IgG), które blokują działanie czynnika VIII. W praktyce klinicznej przeciwciała te są oznaczane metodą Bethesda (podawane w jednostkach Bethesda). Metoda ta w modyfikacji Nijmegen pozwala na wykrywanie przeciwciał, które oddziałują z funkcjonalnymi domenami czynnika VIII. Jednakże nie wykrywają przeciwciał reagujących z epitopami niefunkcjonalnych

domen (domeny B). Przeciwciała nieneutralizujące mogą być obecne w osoczu razem z neutralizującymi.

Czynnik VIII jest glikoproteiną składającą się z domen A1-A2-B-A3-C1-C2. Po aktywacji przez trombinę domena B jest usuwana bez wpływu na prokoagulacyjną aktywność czynnika VIII, przez co czynnik VIII staje się bardziej wrażliwy na inaktywację przez aktywne białko C.

W odróżnieniu od inhibitorów przeciwciała nieneutralizujące są wykrywane testami ELISA przy użyciu pełnej cząsteczki czynnika VIII jako antygeny. Osocze z przeciwciałami „ujemnymi” w teście Bethesda i „dodatnimi” w teście ELISA, skierowanymi do niefunkcjonalnej domeny czynnika VIII, powinno reagować dodatnio w stosunku do pełnej cząsteczki czynnika VIII, a ujemnie w stosunku do rekombinowanego czynnika VIII pozbawionego domeny B.

U niektórych chorych na hemofilię A obserwuje się niskie odzyskanie czynnika VIII i/lub nietypową krzywą farmakokinetyczną przy braku przeciwciał neutralizujących w teście Bethesda, co może sugerować w takim przypadku dodatni wynik ELISA.

Wśród chorych na hemofilię bez inhibitora odsetek dodatnich wyników w teście ELISA waha się między 14,1% (MIBS, *The Malmö International Brother Study*) a 36% [2]. Odsetek ten jest wyższy u pacjentów z ciężką postacią hemofilii. Przeciwciała nieneutralizujące przeciwko czynnikowi VIII wykrywa się u 15% dawców krwi.

W badaniu MIBS wzięło udział 155 chorych na hemofilię. W teście ELISA zastosowano mikropłytki pokryte mieszaniną pełnych cząsteczek rekombinowanego czynnika VIII. W badanej grupie u 43% pacjentów stwierdzono obecność inhibitora w trakcie oznaczeń lub w wywiadzie, u 18,7% wynik testu Bethesda był dodatni. Dodatkowo u 11 chorych stwierdzono dodatni wynik w teście ELISA przy ujemnym wyniku badania na obecność inhibitora. W podgrupie chorych z ciężką postacią hemofilii przeciwciała nieneutralizujące były wykrywane częściej (17,2%). W badaniu MIBS zwrócono uwagę na związek między występowaniem przeciwciał nieneutralizujących a obecnością mutacji oraz występowaniem polimorfizmu genów kodujących interleukinę IL-10, TNF-alfa i CTLA-4. Powstawanie inhibitorów wiąże się więc nie tylko z konkretnym defektem genetycznym, ale i z czynnikami immunologicznymi.

Nie wiadomo jednak, czy obecność przeciwciał nieneutralizujących może być dodatkowym czynnikiem ryzyka wystąpienia inhibitora, jak również, czy może mieć wpływ na większy odsetek niepowodzeń programów immunotolerancji (ITI) u chorych na hemofilię.

Mechanizm ich pojawiania się oraz znaczenie kliniczne pozostają, jak do tej pory, niejasne. Biorąc pod uwagę szeroką rozpiętość między laboratoriami współczynników zmienności i stosowane różne wartości *cut-off*, wykrycie przeciwciał nieneutralizujących może w rzeczywistości odpowiadać obecności przeciwciał hamujących aktywność czynnika krzepnięcia o mianie poniżej wartości *cut-off*,

przeciwciałom neutralizowanym przez przeciwciała anty-idiotypowe i/lub przeciwciałom skierowanym przeciwko epitopom niefunkcjonalnym, czyli „prawdziwym przeciwciałom niehamującym aktywności czynnika VIII/IX”. Nie wiadomo także, czy u osób, u których wykrywa się przeciwciała nieneutralizujące, ryzyko wystąpienia inhibitora w późniejszym okresie życia jest wyższe. Wiadomo natomiast, że w takiej sytuacji należy rozważać obecność przeciwciał niehamujących aktywności czynnika VIII/IX.

W przyszłości testy ELISA powinny być wykonywane wówczas, gdy będą prowadzone nad inhibitorem prace dotyczące oceny odpowiedzi immunologicznej na czynnik VIII i IX oraz prace nad czynnikami ryzyka wystąpienia inhibitora.

Piśmiennictwo

1. Krudysz-Amblo J., Parhami-Seren B., Butenas S. i wsp. Quantitation of anti-factor VIII antibodies in human plasma. *Blood*, 2009, 113, 2587–2594.
2. Klintman J., Hillarp A., Berntorp E., Astermark J., Non-inhibitory antibodies in the MIBS cohort. *J. Thromb. Haemostas.* 2009; 7 (supl. 2) abstract OC-TH-050.

e-mail: michal.jamrozik@xl.wp.pl

Magdalena Kostrzewska

Kliniczne znaczenie utajonego krwawienia dostawowego w przebiegu wrodzonych osoczowych skaz krwotocznych

na podstawie wykładu *Clinical relevance of subclinical bleeds* — Cedric Hermans (Bruksela, Belgia)

Artropatia hemofilowa jest jednym z najczęstszych i najpoważniejszych powikłań ciężkiej i umiarkowanej hemofilii A i B. Przebudowa w obrębie stawu polegająca na postępującym włóknieniu, aż do destrukcji i deformacji chrząstki oraz elementów kostnych stawów, jest wynikiem przewlekłego stanu zapalnego błony maziowej, jaki powstaje w następstwie wylewów krwi do jamy stawowej [1]. W hemofilii, zwłaszcza jej ciężkiej postaci, dochodzi do samoistnych wylewów krwi do stawów [2]. Wprowadzenie profilaktyki pierwotnej polegającej na regularnej podaży osoczowych czynników krzepnięcia od okresu wczesnodziecięcego, czyli między 1. a 2. rokiem życia, do okresu przynajmniej zakończenia wzrastania, skutecznie zapobiega samoistnym wylewom, a więc także rozwojowi artropatii. Aktualnym modelem profilaktyki pierwotnej jest rozpoczęcie podawania czynnika krzepnięcia przed wystąpieniem pierwszego krwawienia dostawowego [3]. Stopień zniszczenia chrząstki i kości w obrębie stawu potwierdza się przy użyciu metod diagnostyki obrazowej: RTG, USG oraz MR. Rezonans magnetyczny stawu jest w chwili obecnej najlepszą metodą obrazowania zmian stawowych w hemofilii, bowiem pozwala monitorować proces leczenia w profilaktyce pierwotnej i wtórnej [4, 5]. Od czasu wprowadzenia profilaktyki pierwotnej w 1992 roku w kolejnych krajach, początkowo Europy Północnej,

następnie Europy Zachodniej i Ameryki Północnej, wyniki prowadzonych badań zarówno prospektywnych, jak i retrospektywnych dowodzą, iż podstawową korzyścią takiego postępowania jest zmniejszenie liczby krwawień dostawowych. Gringer i wsp. w prospektywnym, randomizowanym badaniu obejmującym 10-letni okres obserwacji 40 pacjentów z hemofilią A odnotowali zmniejszenie odsetka krwawień dostawowych (0,2/miesiąc *v.* 0,52/miesiąc) oraz zmniejszenie zmian widocznych w obrazie RTG (28% *v.* 74%) w odniesieniu do grupy pacjentów otrzymujących czynnik krzepnięcia w programie „na żądanie”, czyli w momencie aktywnego krwawienia [6]. Manco-Johnson i wsp. (JOS, *Joint Outcome Study*) także w prospektywnym, randomizowanym badaniu uwzględniającym ponad 4-letni okres obserwacji 65 pacjentów z hemofilią A stwierdzili, że 93% dzieci ocenianych w 6. roku życia otrzymujących profilaktykę pierwotną nie miało zmian stawowych w obrazie MR, w stosunku do 55% dzieci otrzymujących czynnik krzepnięcia w przypadku aktywnego krwawienia ($p = 0,002$). Jednocześnie mediana krwawień do stawu oraz krwawień ogólnych zmniejszyła się z 1,15 do 0,2 *v.* 17,1 do 4,35, $p < 0,001$ [7]. Jak wspomniano, obraz stawów oceniany w rezonansie magnetycznym pozwala precyzyjnie określić stopień zaawansowania przerostu błony maziowej i dalszych etapów przewlekłego zapalenia prowadzącego do destrukcji stawu. Wynik JOS wykazał umiarkowaną korelację między obecnością zmian w MR a liczbą jawnych klinicznie krwawień dostawowych, choć około 18,8% dzieci oceniono jako grupę ze zmianami w MR, mimo braku jawnych klinicznie krwawień. Uzyskane wyniki wskazują więc na to, że u pacjentów z ciężką postacią hemofilii może dochodzić do wylewów czy mikrowylewów do jamy stawowej, które w mniejszym stopniu, ale jednak powodują zmiany destrukcyjne w stawie. Aby to dokładnie ocenić, niewątpliwie potrzeby jest długi okres obserwacji dzieci, a następnie dorosłych chorych o ciężkim przebiegu, którzy od okresu wczesnodziecięcego otrzymywali leczenie substytucyjne. Wprowadzenie profilaktyki w dawkach od 25 do 40 j.m./kg mc. 2–3 razy w hemofilii A oraz od 25 nawet do 100 j.m./kg mc. 2–3 razy w tygodniu w hemofilii B (rekomendacja MASAC) [8] wydaje się być wystarczające, by zapobiegać jawnym klinicznie krwawieniom. Przedstawione wyniki badań skłaniają jednak do przemyśleń, czy w sposób wystarczający zapobiegają rozwojowi artropatii, czy jedynie spowalniają jej rozwój. Nieme kliniczne krwawienie pogarsza obraz NMR, co sugeruje, że być może proces zmian stawowych w przebiegu artropatii hemofilowej jest jednak bardziej zaawansowany niż tylko wynik jawnego klinicznie wynacznienia krwi do stawu [7, 9]. Czy wprowadzanie suplementacji czynnika krzepnięcia po ukończeniu 1. roku życia jest wystarczające wczesne? Być może w okresie niemowlęcym, krytycznym dla dynamicznego rozwoju wszystkich tkanek i narządów, w tym stawów, pojawiają się nieme kliniczne zmiany w ich obrębie. Czy krwawienie nieme klinicznie rzutuje na rozwój

artropatii? Wynik JOS podsuwa odpowiedź, że tak, ale w chwili obecnej nie potrafimy ocenić, w jakim zakresie. Proces destrukcji stawów w przebiegu hemofilii jest bardziej złożony niż pierwotnie sądzono i wymaga dalszych badań [10].

Piśmiennictwo

1. Rodriguez-Merchan E.C. Hemophilic synovitis: basic concepts. *Haemophilia* 2007; 13 (supl. 3): 1–3.
2. Windyga J., Chojnowski K., Klukowska A. i wsp. Zasady postępowania w hemofilii A i B. *Acta Haematol. Pol.* 2008; 39: 537–564.
3. Ahnström J., Berntorp E., Lindvall K. i wsp. A 6-year follow-up of dosing, coagulation factor levels and bleedings in relation to joints status in the prophylactic treatment of hemophilia. *Haemophilia* 2004; 10: 689–697.
4. Daldrup-Link H.E., Steinbach L. MR imaging of pediatric arthritis. *Magn. Reson Imaging Clin. N. Am.* 2009; 17: 451–67.
5. Doria A.S., Lundin B., Kilcoyne R.F. i wsp. Reliability of progressive and additive MRI scoring systems for evaluation of haemophilic arthropathy in children: expert MRI Working Group of the International Prophylaxis Study Group. *Haemophilia* 2005; 11: 245–253.
6. Gringeri A. A 10-year, randomized clinical trial on prophylaxis vs. on demand treatment in children with haemophilia A: the E.S.P.R.I.T. study. *Haemophilia* 2008; 14 (supl. 2): 99.
7. Manco-Johnson M.J., Abshire T.C., Shapiro A.D. i wsp., Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357: 535–544.
8. National Hemophilia Foundation, Medical and Scientific Advisory Council, MASAC Document #179 (replaces #170).
9. Coppola A., Franchini M., Tagliaferri A. i wsp. Prophylaxis in people with haemophilia. *Thromb. Haemost.* 2009; 101: 674–681.
10. Hermans C. Clinical relevance of subclinical bleeds. Abstract book 7 th inhibitor workshop for opinion leaders in haemophilia. Antalya. Turkey 2009; 11.

e-mail: makostrzewska@o2.pl

Wanda Badowska

Ocena diagnostyczna odpowiedzi na leczenie

na podstawie wykładu *Diagnostic assessment of treatment responsiveness* — Claude Negrier (Lyon, Francja)

Zgodnie z aktualną wiedzą najskuteczniejszymi lekami w hamowaniu krwawień u pacjentów z hemofilią powikłaną inhibitorem są koncentraty aktywowanych czynników zespołu protrombiny (aPCC, *activated prothrombin complex concentrate*) i rekombinowanego aktywnego czynnika VII (rVIIa). Koncentraty te aktywują krzepnięcie krwi z pominięciem etapu zależnego od obecności czynnika VIII lub czynnika IX. W porównaniu z historyczną grupą pacjentów stosowanie tych preparatów przyczyniło się do ogromnego postępu w leczeniu ciężkich krwawień oraz umożliwiło przeprowadzenie zabiegów stomatologicznych, a także operacji chirurgicznych u chorych z hemofilią z inhibitorami krzepnięcia krwi. Jednak do chwili obec-

nej wybranie opcji leczenia krwawień u chorych z hemofilią z krążącym antykoagulantem nie jest prostą decyzją.

Ocena skuteczności zastosowania preparatów omijających oraz przewidywanie stanu układu krzepnięcia krwi u pacjentów są utrudnione w związku z ograniczoną dostępnością wiarygodnych narzędzi kontroli laboratoryjnej działania tych preparatów. Efekt kliniczny po podaniu koncentratów aktywowanych czynników zespołu protrombiny lub rekombinowanego aktywnego czynnika VII jest zależny od wielu osobniczych właściwości pacjenta. Nie zawsze można przewidzieć, czy dany pacjent dobrze zareaguje na podanie aPCC lub uzyska się hemostazę po zastosowaniu rekombinowanego czynnika VII.

Profesor Claude Negrier przedstawił wyniki wieloosrodkowego badania pacjentów z hemofilią powikłaną inhibitorem, w którym metodą diagnostyczną, przedstawiającą graficznie i numerycznie dynamikę procesu hemostazy oraz właściwości fizyczne tworzącego się skrzepu pełnej krwi, była tromboelastometria i tromboelastografia. Badania tego typu odgrywają coraz większą rolę w dokumentowaniu wyników leczenia zaburzeń krzepnięcia, pozwalają również na wielokrotne kontrolowanie stanu hemostazy pacjenta w czasie rzeczywistym. Na podstawie badań własnych przeprowadzonych przez profesora Negriera oraz badań przeprowadzonych w innych ośrodkach europejskich oraz w Stanach Zjednoczonych stwierdzono, że tromboelastogramy wykazują dużą zmienność osobniczą zarówno w badaniu wyjściowym, jak i po wzbogaceniu *ex vivo* rVII i/lub aPCC. Badano zależność pomiędzy dawką rVII oraz koncentratów aktywowanych czynników zespołu protrombiny a parametrami tromboelastografii. W niektórych przypadkach zaobserwowano związek pomiędzy konieczną dawką leków omijających w zależności od aktywności inhibitora podaną w jednostkach Bethesda w próbkach krwi pacjentów z hemofilią A lub B z krążącym antykoagulantem.

Dzięki wprowadzeniu monitorowania aktywności hemostazy można racjonalizować kosztowne procedury leczenia preparatami omijającymi. Szybkie zdiagnozowanie oraz możliwość oceny wpływu zastosowanego leczenia na układ krzepnięcia ułatwiają podejmowanie właściwych decyzji terapeutycznych. W celu umożliwienia powszechnego wykorzystania tej metody w praktyce klinicznej dąży się do opracowania schematów postępowania, tak zwanych algorytmów, ściśle określających na podstawie wyników tromboelastometrii lub tromboelastografii, rodzaj, ilość oraz częstotliwość podawania preparatów omijających.

Autor zwrócił uwagę na konieczność standaryzacji badań tromboelastograficznych w celu uzyskania informacji, czy zastosowane preparaty omijające zabezpieczają chorych przed krwawieniem. Monitorowanie działania środków farmakologicznych dotyczy zarówno zbyt niskich w danej sytuacji klinicznej pacjenta dawek terapeutycznych, jak i ryzyka ich nadmiernego działania w postaci zagrożenia zakrzepicą, na przykład w wypadku jednoczesnego zastosowania koncentratów aktywowanych czynników zespołu pro-

trombiny oraz rekombinowanego aktywnego czynnika VII. Prawdopodobnie kontynuowanie badań pozwoli lepiej zrozumieć mechanizmy hemostazy oraz wyjaśnić przyczyny oporności niektórych pacjentów na różne leki omijające.

e-mail: hematologia@wssd.olsztyn.pl

Elżbieta Stasiak-Zajac

Terapia złożona — gdy jeden czynnik omijający nie wystarcza

na podstawie wykładu *Combination therapy — when one bypassing agent is not enough* — Guy Young (Los Angeles, Stany Zjednoczone)

Większość krwawień u pacjentów z hemofilią powikłaną inhibitorem ustępuje po leczeniu tak zwanymi czynnikami omijającymi (rVIIa, aPCC), ale zdarzają się krwawienia, które nie odpowiadają na podawanie żadnego z tych leków. W takich sytuacjach możliwości leczenia są ograniczone. Jedną z metod jest zastosowanie dwóch czynników omijających w połączeniu: albo sekwencyjnie (jeden po drugim), albo równocześnie.

Obecnie rośnie liczba doniesień, zarówno naukowych, jak i klinicznych, o korzystnym działaniu terapii łączonej, ich „sumującej się”, a nawet synergistycznej drodze działania.

Young po raz pierwszy zastosował terapię łączoną 10 lat temu u 10-letniego pacjenta z hemofilią A powikłaną inhibitorem, z wylewem do stawu kolanowego niereagującego na monoterapię koncentratem rekombinowanego czynnika VIIa (rVIIa) — w dawce początkowej 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$, podawanej wielokrotnie przez 2 dni, a następnie zwiększonej do 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. W poszukiwaniu sposobu zmniejszenia wylewu dostawowego i bólu autor empirycznie zastosował terapię sekwencyjną, podając koncentrat aktywowanego kompleksu czynników protrombiny (aPCC) naprzemiennie z rVIIa. Ostatecznie uzyskał poprawę kliniczną u tego pacjenta, choć początkowo nie było wiadomo, czy to efekt zastosowanego leczenia, czy naturalny przebieg krwawienia.

Również u drugiego pacjenta Young zastosował terapię sekwencyjną dopiero po kilku dniach monoterapii omijającej, najpierw pierwszym czynnikiem, a następnie drugim (do dzisiaj leczenie zawsze początkowo obejmuje jeden czynnik omijający, następnie drugi, a dopiero przy braku efektu — terapię łączoną). Dawki początkowe stosowanych koncentratów były niskie w obawie przed powikłaniami, które monitorowano, oznaczając zużycie fibrynogenu i czynników krzepnięcia.

Dlaczego złożona terapia sekwencyjna może być skuteczna?

Istota skuteczności złożonej terapii omijającej stanowi nieustający przedmiot badań; poszukuje się prostych testów laboratoryjnych do monitorowania jej skuteczności i ryzyka powikłań zakrzepowych.

Przetaczanie koncentratu aktywowanych czynników zespołu protrombiny (aPCC) i rekombinowanego czynnika

VIIa stanowi najważniejszą metodę leczenia omijającego u pacjentów z wysokim stężeniem inhibitora. Czynniki te wywołują hemostazę poprzez zwiększenie generacji trombiny, przy czym mechanizm ich działania jest różny rVIIa, jak wiadomo, ma wysokie powinowactwo do czynnika tkankowego (TF), który aktywuje zewnątrzpochodną drogę krzepnięcia. Kompleks TF/rVIIa aktywuje czynnik X do Xa, który wraz z VIIa przy udziale Va tworzy kompleks protrombinazy, generujący niewielką ilość trombiny. Wysokie stężenie farmakologiczne czynnika VIIa w obecności czynnika X i protrombiny zawartej w aPCC może intensywniej generować trombinę, w czym prawdopodobnie biorą udział inne jeszcze czynniki uaktywniające się podczas stosowania obu czynników omijających, a działające w mechanizmie sprzężenia zwrotnego.

Badania nad zastosowaniem leczenia omijającego sięgają 1992 roku, początkowo były przeprowadzane na modelach zwierzęcych. Wykazano, że najważniejsze znaczenie w omijaniu aktywności inhibitora mają zawarte w aPCC protrombina (II) oraz aktywowany czynnik X (Xa), a połączenie FEIBA z czynnikiem rVIIa wyraźnie skraca czas uzyskania skrzepu (Key i wsp., Allen i wsp.). Autor przytacza wyniki niektórych doświadczeń oceniających hemostazę u królików i małp przy stosowaniu różnych dawek oraz sposobów łączenia poszczególnych czynników omijających.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że terapia łączona wywiera efekt synergistyczny, a nie addycyjny.

Badano dawki i kolejność podawanych czynników pod kontrolą ACT (*activated clotting time*) — dodawano aPCC do wcześniej zastosowanego rVIIa, co wyraźnie skracało ACT; podanie czynników w kolejności odwrotnej, czyli najpierw aPCC, następnie rVIIa, również wyraźnie skracało ACT (wyniki podobne) i utrzymywało ACT na tym samym poziomie przez kilka dni.

Można by z tego wyciągnąć wniosek o możliwości stosowania niższych dawek, a tym samym tańszego sposobu leczenia.

Obecnie nie są prowadzone badania kliniczne oceniające skuteczność terapii sekwencyjnej z powodu zbyt małej liczby pacjentów leczonych w jednym ośrodku medycznym. Aktualnie nie można więc wysuwać jeszcze wniosków klinicznych, ale wiadomo, że kierunek postępowania jest słuszny i budzi nadzieję. Jak dotąd, opublikowano wyniki pojedynczych badań retrospektywnych.

W 2004 roku po raz pierwszy opisano grupę 5 pacjentów hospitalizowanych w sumie 91 dni podczas 20 pobyków szpitalnych. U osób tych zastosowano rVIIa od jednej do trzech dawek co 2 godziny, pomiędzy dawkami aPCC podawanymi co 12 godzin. Pacjenci byli obserwowani pod kątem skuteczności oraz bezpieczeństwa leczenia. U żadnej osoby nie stwierdzono zakrzepicy, małopłytkowości ani zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC).

W 2007 roku opublikowano kolejną pracę dotyczącą retrospektywnej oceny terapii sekwencyjnej u 4 pacjen-

tów hospitalizowanych w sumie 150 dni podczas 35 pobyków w szpitalu. U 3 z nich skuteczność terapii sekwencyjnej oceniano za pomocą tromboelastografii (TEG). Były to osoby, które nie uzyskały poprawy klinicznej po 3 dniach monoterapii, ale skuteczne u nich było 3-dniowe leczenie sekwencyjne. W czasie leczenia u pacjentów tych wykonywano badania laboratoryjne w kierunku zakrzepicy lub DIC. U żadnego chorego nie stwierdzono powikłań, ale wykazano znaczący wzrost stężenia D-dimerów w 35% pomiarów podczas 15 z 35 przyjęć. Wzrost stężenia D-dimerów (> 5 ug/ml) nie był związany z dawką podawanego czynnika, lokalizacją ani typem krwawienia bądź jego nasileniem. Kliniczną konsekwencją narastającego stężenia D-dimerów, bez względu na ich poziom, był powrót do monoterapii.

W ostatnich, jeszcze niepublikowanych, badaniach prowadzonych w Izraelu z zastosowaniem terapii złożonej (zredukowana o 1/3 dawka APCC, tj. 30–70 j./kg i zredukowana od 1/3 do 1/2 dawka rVIIa, tj. 20–30 ug/kg, podawanej jednocześnie), uzyskano szybszą generację trombiny (monitorowaną przez TGA) i dobrą hemostazę.

Terapia sekwencyjna ciągle jeszcze jest zbyt rzadko stosowana i wymaga perspektywnych badań klinicznych i laboratoryjnych.

The European Haemophilia Therapy Standardization Board, czyli niezależna grupa europejskich lekarzy, dzięki grantowi naukowemu firmy Baxter, prowadzi badania *International Sequential Combined Therapy* (INTER.SE.C.T.) nad skutecznością i bezpieczeństwem różnych metod terapii złożonej stosowanych u pacjentów z hemofilią powikłaną inhibitorem, którzy nie odpowiadają na leczenie pojedynczym czynnikiem.

e-mail: elstaza@op.pl

Magdalena Górka-Kosicka

Wywoływanie tolerancji immunologicznej (ITI) u pacjentów z hemofilią i krążącym antykoagulantem z zastosowaniem leków omijających

na podstawie wykładu *Peri-ITI-coverage with bypassing agents* — Carmen Escuriola-Ettingshausen (Frankfurt, Niemcy)

Wstęp

Jednym z najpoważniejszych powikłań związanych z leczeniem hemofilii jest wytworzenie przez chorego inhibitora czynnika VIII lub IX, zwanego także krążącym antykoagulantem. Ocenia się, że inhibitory czynnika VIII pojawiają się u około 30% chorych z ciężką postacią hemofilii A (poziom czynnika VIII < 1% normy) oraz u 0,9–7% pacjentów z umiarkowaną i łagodną hemofilią A [4, 8, 26], natomiast inhibitory czynnika IX — u 1,5–3% wszystkich pacjentów z hemofilią B [4, 5, 26]. Większość inhibitorów w hemofilii A, niezależnie od jej stopnia cięż-

kości, pojawia się we wczesnym dzieciństwie, zazwyczaj po pierwszych kilku–kilkunastu dniach ekspozycji na koncentrat czynnika VIII. Drugi okres zwiększonej zapadalności na inhibitory czynnika VIII przypada na 6. dekadę życia [8, 26]. Także w wypadku hemofilii B krążący antykoagulant pojawia się najczęściej w dzieciństwie, po pierwszych kilkunastu dniach ekspozycji na koncentrat czynnika IX [26].

Obecność inhibitora nie zwiększa śmiertelności chorych ani nie wpływa na częstość wylewów, ale komplikuje terapię, ponieważ krwawienia na ogół nie poddają się leczeniu substytucyjnemu z zastosowaniem niedoborowego czynnika krzepnięcia krwi [3, 4, 6, 26]. Zależnie od siły odpowiedzi odpornościowej ustroju na podawany dożylnie niedoborowy czynnik krzepnięcia inhibitor dzieli się na silne i słabe, a pacjentów odpowiednio — na silnie i słabo reagujących na antygen. Jeśli maksymalne miano przeciwciał przeciw czynnikowi VIII lub IX przekracza 5 jednostek Bethesda w mililitrze (j.B./ml), to taki inhibitor określa się jako silny. Inhibitor, którego miano jest zawsze mniejsze niż 5 j.m./ml określa się mianem słabego [12, 26]. Pacjenci słabo reagujący na antygen mogą być leczeni koncentratami ludzkiego czynnika VIII w zwiększonych dawkach. Chorzy z wysokim mianem inhibitora, czyli silnie reagujący na antygen, wymagają leczenia koncentratami omijającymi inhibitor. Obecnie na rynku są dostępne dwa takie leki: koncentrat aktywowanych czynników zespołu protrombiny (aPCC, *activated prothrombin complex concentrate*) i rekombinowany aktywny czynnik VII (rFVIIa). W wielu badaniach wykazano ich dużą skuteczność w leczeniu ostrych krwawień oraz w profilaktyce okołoperacyjnej u chorych na hemofilię powikłaną inhibitorem [4, 6, 26]. Największą wadą koncentratów omijających inhibitor jest brak możliwości laboratoryjnego monitorowania ich skuteczności oraz wysoki koszt [26]. W związku ze zwiększonym ryzykiem występowania powikłań oraz utrudnionym leczeniem głównym celem terapii chorych z obecnością inhibitora jest jego trwała eliminacja poprzez zastosowanie immunotolerancji (ITI, *immune tolerance induction*), polegającej na regularnych wstrzyknięciach koncentratów brakującego czynnika krzepnięcia [4, 6, 26].

Zastosowanie preparatów omijających inhibitor w okresie przed indukcją immunotolerancji

U pacjentów z ciężką postacią hemofilii A silnie odpowiadających na bodziec antygenowy najlepsze efekty eliminacji inhibitora uzyskuje się, rozpoczynając immunotolerancję przy jego mianie poniżej 10 j.B./ml. W związku z powyższym u niektórych chorych wstrzymuje się leczenie indukujące immunotolerancję do czasu zmniejszenia miana inhibitora. U tych pacjentów w wypadku wylewów zaleca się zastosowanie rFVIIa, ponieważ nie zawiera on nawet śladowych ilości czynnika VIII i nie powoduje odpowiedzi amnestycznej, czyli wzrostu miana inhibitora [2, 4, 16, 26].

Leczenie krwawień podczas indukcji tolerancji immunologicznej

Nawet niewielkie krwawienia występujące u chorych poddanych indukcji immunotolerancji wymagają szybkiego leczenia. W tym celu stosuje się koncentrat aktywowanych czynników zespołu protrombiny i rekombinowany aktywny czynnik VII [2, 6, 18]. Zalecana dawka aPCC wynosi 50–100 j./kg mc. co 6–12 godzin. Nie należy przekraczać maksymalnej dawki na dobę wynoszącej 200 j./kg mc. [6, 15]. Dawkowanie aktywnego czynnika VII jest takie samo jak u chorych niepoddanych ITI i wynosi 90–120 μ g/kg mc. Z powodu krótkiego okresu półtrwania rFVIIa jest podawany co 2–3 godziny [2, 6, 15, 18]. Możliwa jest także jednorazowa dawka 270 μ g/kg mc. [26]. Leczenie krwawień preparatami omijającymi inhibitor powinno być zakończone, gdy poziom inhibitora będzie mniejszy niż 1 j.B./ml. [6, 17]. Chorzy z mianem inhibitora poniżej 1 j.B./ml dobrze reagują na koncentraty czynnika VIII, ale istnieje u nich duże ryzyko odpowiedzi amnestycznej. Dlatego u tych pacjentów poziom inhibitora powinien być ściśle monitorowany, zwłaszcza po ekspozycji na czynnik VIII [6].

Jeśli krwawienia nie udaje się zahamować przy użyciu jednego preparatu omijającego inhibitor, należy zmienić lek na drugi. W wypadku braku efektu po zastosowaniu obydwu leków możliwa jest terapia sekwencyjna aPCC i rFVIIa. Jednoczesne zastosowanie koncentratu aktywowanych czynników zespołu protrombiny oraz rekombinowanego aktywnego czynnika VII wydaje się mieć działanie synergistyczne. Pozwala także na zmniejszenie dawek aPCC i rFVIIa [6, 21]. Terapia sekwencyjna znacznie zwiększa prawdopodobieństwo powikłań zakrzepowych, w związku z powyższym nie powinno się jej stosować u chorych z czynnikami ryzyka zakrzepicy [6].

Zastosowanie preparatów omijających inhibitor w okresie okołoperacyjnym

U chorych z wysokim mianem inhibitora istnieje bardzo duże ryzyko krwawień w okresie okołoperacyjnym, dlatego, jeśli jest możliwość alternatywnego leczenia, należy unikać zabiegów. Operacje, których nie można przełożyć, przeprowadza się tylko w ośrodkach referencyjnych [15]. W okresie okołoperacyjnym nie zaleca się czasowego przerywania immunotolerancji, ponieważ przerwa w odczulaniu zwiększa ryzyko niepowodzenia w eliminacji inhibitora [6, 15]. Opisy przypadków, wyniki badań retrospektywnych oraz badań prospektywnych wykazały, że aPCC i rFVIIa mają podobną skuteczność w zapobieganiu krwawieniom po interwencjach chirurgicznych [6, 10, 22, 24]. Koncentrat aktywowanych czynników zespołu protrombiny hamował krwawienia u blisko 90% chorych poddanych dużym i mniejszym zabiegom operacyjnym oraz zabiegom stomatologicznym [6]. Podaje się go co 6–12 godzin w dawce 50–100 j./kg mc. Z powodu zagrożenia powikłaniami zakrzepowymi nie powinno się przekraczać 200 j./kg mc. na dobę [15, 26]. Di Paola i wsp.

rekommendują aPCC w dawce 75–100 j./kg mc (maksymalnie 200 j./kg mc./d.) co 8 godzin u pacjentów poddanych dużym zabiegom chirurgicznym. Przy drobnych zabiegach dawka powinna wynosić 50–100 j./kg mc./dobę, a 6 godzin po ostatniej dawce aPCC można zastosować leki antyfibrynolityczne, polecane zwłaszcza po zabiegach stomatologicznych [6].

Efektywność rFVIIa w hamowaniu krwawień u pacjentów z inhibitorem poddanych zabiegom operacyjnym wynosi także około 90% [6, 10, 14]. Shapiro i wsp. wykazali doskonałą skuteczność tego leku w zabezpieczeniu hemostazy okołooperacyjnej, stosując dawkę 90 µg/kg mc. przed zabiegiem, a następnie co 2 godziny przez pierwsze 48 godzin po operacji. Leczenie było kontynuowane przez następne 3 dni w tej samej dawce, ale podawanej w odstępach 2–6-godzinnych [20]. Di Paola i wsp. [6] przy dużych zabiegach chirurgicznych stosowali rekombinowany aktywny czynnik VII w dawce 90 µg/kg mc. co 2 godziny w dniu operacji i co 4 godziny przez 3 kolejne dni lub tak długo, jak to było konieczne. Chorzy poddani drobnym zabiegom powinni otrzymać rFVIIa 90 µg/kg mc. co 2 godziny trzy dawki oraz lek antyfibrynolityczny 6 godzin po ostatniej dawce rekombinowanego aktywnego czynnika VII.

Profilaktyka z użyciem preparatów omijających inhibitor w trakcie ITI

Krwawienia występujące u chorych z inhibitorem są cięższe do opanowania, u tych pacjentów szybciej dochodzi do przewlekłego stanu zapalnego błony maziowej, nieodwracalnego zniszczenia chrząstki i kostnych struktur stawu oraz rozwoju artropatii [11, 13]. Koncentrat aktywowanych czynników zespołu protrombiny jest szeroko stosowany w profilaktyce krwawień u pacjentów, którzy nie są kandydatami do przeprowadzenia immunotolerancji [6, 9, 23, 24]. Profilaktyczne podawanie aPCC stosuje się także podczas indukcji immunotolerancji [6, 7, 11, 23, 24]. Protokół Bonn, jeden z najczęściej stosowanych w tym celu, w pierwszej fazie leczenia przewiduje u chorych z dużym ryzykiem krwawień iniekcje aPCC. Dawka waha się od 50 do 200 j./kg mc./d., a lek podaje się w zależności od intensywności krwawień — co 12–24 godziny u chorych z dużym ryzykiem do dwóch razy w tygodniu u pacjentów z mniej nasilonymi wylewami [4, 6, 7, 17, 25]. Z uwagi na możliwość powikłań zakrzepowych zaleca się zakończenie profilaktyki, gdy u pacjenta 30 minut po infuzji immunotolerancyjnej dawki czynnika VIII uzyskuje się wzrost jego poziomu (*recovery*) [3, 4].

Kreuz i wsp. [11] w swoich prospektywnych badaniach oceniali skuteczność aPCC w profilaktyce u 22 dzieci z wysokim mianem inhibitora poddanych ITI. Lek podawano w dawce 50 j./kg mc. raz na dobę, zwiększając do 100 j./kg mc. co 12 godzin w wypadku występowania krwawień. W okresie leczenia nie obserwowano krwawień zagrażających życiu, wylewy do stawów występowały średnio raz na rok, a zmiany destrukcyjne w stawach nie postępowały. Immunotolerancja zakończyła się sukcesem

u 82% chorych (18 z 22), a w trakcie terapii nie obserwowano powikłań zakrzepowych. W pracy Valentino [23] 3 chorych poddanych ITI otrzymywało profilaktycznie aPCC w dawce 100 j./kg mc. na dobę. Częstość wylewów u tych pacjentów przed rozpoczęciem profilaktyki wynosiła od 2,5 do 4,08 w okresie 100 dni, a po rozpoczęciu terapii obniżyła się do 0–1,42 na 100 dni. Leczenie było dobrze tolerowane i nie obserwowano powikłań zakrzepowych.

Stosowanie rekombinowanego aktywnego czynnika VII u pacjentów poddanych ITI jest zarezerwowane głównie, z powodu jego krótkiego okresu półtrwania (wynoszącego około 3 godzin), do profilaktyki okołooperacyjnej oraz leczenia krwawień [6]. Brackmann i wsp. [1] wykazali, że profilaktyka przy użyciu rFVIIa (90 µg/kg mc. co 12 godzin) wiąże się z większą liczbą wylewów niż profilaktyczne zastosowanie aPCC (w dawce 50 j./kg mc. co 12 godzin). Odstęp 12-godzinny pomiędzy iniekcjami rFVIIa jest najprawdopodobniej zbyt długi dla efektywnej kontroli hemostazy. Odmienny efekt osiągnęli Saxon i wsp. [19]; rFVIIa podawany raz na dobę w dawce 90 µg/kg mc. u chłopca w wieku przedszkolnym poddanego ITI pozwolił na znaczną redukcję liczby krwawień do stawu docelowego (*target joint*). Duża skuteczność zastosowanego leczenia może wskazywać, że biologiczny efekt działania rFVIIa jest dłuższy niż wynikałoby to z jego okresu półtrwania [4]. W związku z małą liczbą doniesień rola rekombinowanego aktywnego czynnika VII w profilaktyce podczas ITI wymaga dalszych badań.

Wnioski

Pojawienie się inhibitora czynnika VIII czy IX znacznie komplikuje leczenie chorych na hemofilię. Pomimo dużej skuteczności koncentratów czynników krzepnięcia omijających inhibitor nadrzędnym celem terapii tych chorych jest trwała eliminacja krążącego antykoagulantu poprzez zastosowanie immunotolerancji. Ponieważ ITI może trwać wiele miesięcy, a nawet lat, niezbędne jest w tym okresie skuteczne hamowanie krwawień czy stosowanie profilaktyki wtórnej w celu zapobiegania nawracającym wylewom i rozwojowi artropatii. W tym celu stosowane są koncentraty aktywowanych czynników zespołu protrombiny oraz rekombinowany aktywny czynnik VII. Leki te są dobrze tolerowane i nie obserwuje się działań niepożądanych terapii.

Piśmiennictwo

1. Brackmann H.H., Effenberger E., Hess L. i wsp. NovoSeven in immune tolerance therapy. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2000; 11 (supl. 1): 39–44.
2. Brackmann H.H., Effenberger W., Hess L. i wsp. Immune tolerance induction: a role for recombinant activated factor VII (rFVIIa)? *Eur. J. Haematol.* 1998; 61 (supl. 63): 18–23.
3. Brackmann H.H., Lenk H., Scharrer I. i wsp. German recommendations for immune tolerance therapy in type A haemophiliacs with antibodies. *Haemophilia* 1999; 5: 203–206.
4. Di Michele D.M., Hoots W.K., Pipe W. i wsp. International workshop on immune tolerance induction: consensus recommendations. *Haemophilia* 2007; 13 (supl. 1): 1–22.

5. Di Michele D.M. Inhibitor development in haemophilia B: an orphan disease in need of attention. *Br. J. Haematol.* 2007; 138: 305–315.
6. Di Paola J., Aledort L., Britton H. i wsp. Application of current knowledge to the management of bleeding events during immune tolerance induction. *Haemophilia* 2006; 12: 591–597.
7. Escuriola Ettingshausen C. Peri-ITI-coverage with bypassing agents. 7th Inhibitor Workshop for Opinion Leaders in Hemophilia. Antalya 24–26.06.2009: 17.
8. Hay C.R.M. The epidemiology of factor VIII inhibitors. *Haemophilia* 2006; 12 (supl. 6): 23–29.
9. Hilgartner M.W., Makiperna D., Di Michele D.M. Long term FEIBA prophylaxis does not prevent progression of existing joint disease. *Haemophilia* 2003; 9: 261–268.
10. Ingereslev J., Freidman D., Gastineau D. i wsp. Major surgery in haemophilic patients with inhibitors using recombinant factor VIIa. *Haemostasis* 1996; 26 (supl. 1): 118–123.
11. Kreuz W., Escuriola-Ettingshausen C., Mentzer D. i wsp. Factor VIII inhibitor bypass activity (FEIBA) for prophylaxis during immune tolerance induction (ITI) in patients with high-responding inhibitors. *Blood* 2000, 96; 11: 266a.
12. Kruse-Jarres R., Barnett B., Leissinger C. Immune tolerance induction for the eradication of inhibitors in patients with hemophilia A. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2008; 8: 1885–1896.
13. Leissinger C.A., Becton D.L., Ewing N.P. i wsp. Prophylactic treatment with activated prothrombin complex concentrate (FEIBA) reduces the frequency of bleeding episodes in pediatric patients with haemophilia A and inhibitors. *Haemophilia* 2007; 13: 249–255.
14. Lusher J., Ingerslev J., Roberts H. i wsp. Clinical experience with recombinant factor VIIa. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9: 119–128.
15. Manno C.S. Treatment options for bleeding episodes in patients undergoing immune tolerance therapy. *Haemophilia* 1999; 5 (supl. 3): 33–41.
16. Odeyemi I.A.O., Dano A.M. Optimising immune tolerance induction strategies in the management of haemophilia patients with inhibitors: a cost-minimisation analysis. *Curr. Med. Res. Opin.* 2009; 25: 239–50.
17. Oldenburg J., Schwaab R., Brackmann H.H. Induction of Immune Tolerance in Haemophilia A Inhibitor Patients by the "Bonn Protocol": Predictive Parameter for Therapy Duration and Outcome. *Vox Sang* 1999; 77 (supl. 1): 49–54.
18. Petrini P., Klementz G. Treatment of acute bleeds with recombinant activated factor VII during immune tolerance therapy. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 1988; 9 (supl. 1): 143–146.
19. Saxon B.R., Shanks D., Jory C.B. i wsp. Effective prophylaxis with daily recombinant factor VII a (rFVIIa-Novo Seven) in a child with high titre inhibitors and target joint. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 1126–1127.
20. Schapiro A.D., Gilchrist G.S., Hoots W.K. i wsp. Prospective, randomized trial of two doses of rFVIIa (NovoSeven) in haemophilia patients with inhibitors undergoing surgery. *Thromb. Haemostas.* 1998; 80: 773–778.
21. Schneiderman J., Nugent D.J., Young G. Sequential therapy with activated prothrombin complex concentrate and recombinant factor VIIa in patients with severe hemophilia and inhibitors. *Haemophilia* 2004; 10: 347–351.
22. Tjonnfjord G.E. Activated prothrombin complex concentrate (FEIBA) treatment during surgery in patients with inhibitors to FVIII/IX: the updated Norwegian experience. *Haemophilia* 2004; 10 (supl. 2): 41–45.
23. Valentino L.A. FEIBA prophylaxis in hemophilia A patients with inhibitors results in a 95% reduction in bleeding episodes. Bangkok, Thailand: Poster presented at 26th World Federation of Haematology Congress October 2004; 17–21.
24. Valentino L.A. FEIBA prophylaxis for patients with haemophilia and inhibitors. *Haemophilia* 2006; 12 (supl. 5): 26–31.
25. Wight J., Paisley S., Knight C. Immune tolerance induction in patients with haemophilia A with inhibitors: a systematic review. *Haemophilia* 2003; 9: 436–463.
26. Windyga J., Chojnowski K., Klukowska A. i wsp. Zasady postępowania w hemofilii A i B powikłanej inhibitorem. *Acta Haematologica Polonica* 2008; 38 (3): 565–579.

e-mail: magdagorska@tlen.pl

Jarosław Sokołowski

Rola płytek krwi w procesie krzepnięcia

na podstawie wykładu *The relevance of platelets for coagulation* — Riitta Lassila (Helsinki, Finlandia)

Płytki krwi (PLT), czyli trombocyty, są to najmniejsze komórki krwi nieposiadające jądra. W fazie spoczynku mają kształt płaskiego dysku, o średnicy 3–4 μm i objętości 5–10 μm^3 . Powstają przez fragmentację cytoplazmy megakariocytów szpiku kostnego [1]. Dzięki swoim zdolnościom do adhezji, agregacji i aktywacji płytki krwi uczestniczą w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Odgrywają istotną rolę w mechanizmie krzepnięcia krwi, głównie poprzez generację trombinu na fosfolipidach powierzchniowych, kontrolują proces fibrynolizy poprzez aktywatory i inhibitory plazminogenu i utrzymują integralność naczyń krwionośnych oraz są ważnym elementem w procesach neoangiogenezy. Ponadto pełnią funkcje transportowe, uczestniczą w gojeniu ran, w zjawiskach immunologicznych, fagocytozie, inicjują i podtrzymują procesy zapalne oraz przypisuje im się udział w procesie metastazy w nowotworach [2–5]. Działanie płytek wynika między innymi z ich stymulacji. Do silnych stymulatorów płytek należą: trombina, kolagen, jony Ca^{2+} , prostaglandyny, tromboksan A2 (TXA2), czynnik aktywujący płytki (PAF, *platelet-activating factor*). Słabsze działanie pobudzające aktywację płytek krwi wykazują między innymi dwufosforan adenozyliny (ADP), fibrynogen, czynnik von Willebranda (vWF), fibronektyna, trombospondyna, witronektyna, serotonina, adrenalina i wazopresyna. Adrenalina, chociaż sama jest słabym agonistą, nasila działanie innych aktywatorów.

Płytki krwi odgrywają istotną rolę w procesie krzepnięcia na wielu jego etapach poprzez:

1. Hemostazę pierwotną, która polega na wytworzeniu lokalnie, w miejscu uszkodzenia ściany naczyniowej, czopu płytkowego. W wyniku uszkodzenia naczynia odsłonięcie włókien kolagenu powoduje adhezję płytek, w czym pośredniczy czynnik vWF, pochodzący z osocza lub ziarnistości płytkowych. Czynnik vWF wiąże się z receptorem płytkowym glikoproteiną Ib (GPIb), co prowadzi do otwarcia

kanałów wapniowych i zmiany konformacyjnej receptora GPIIb/IIIa. Konformacja receptora GPIIb/IIIa umożliwia wiązanie się z fibrynogenem i tworzenie mostków między przylegającymi płytkami warunkujących ich agregację [6]. Czynniki vWF poza tym łączy się ze swoim płytkowym receptorem GPIb/IX, co skutkuje adhezją i agregacją płytek do uszkodzonej ściany naczynia [7].

2. Prokoagulacyjną aktywność związaną z ekspozycją fosfolipidów, na których z olbrzymią wydajnością zachodzą reakcje krzepnięcia krwi. Taką prokoagulacyjną aktywność wykazują fosfolipidy z ujemnym ładunkiem. Są to głównie fosfatydyloseryna i fosfatydyloetanolamina. W spoczynkowych płytkach fosfolipidy te są niedostępne dla czynników krzepnięcia, gdyż są zlokalizowane po wewnętrznej stronie błony komórkowej. Pod wpływem czynników aktywujących, tak zwanych agonistów płytkowych (np. trombiny lub kolagenu), przemieszczają się na powierzchnię błony komórkowej. Po utworzeniu kompleksu z aktywnymi czynnikami VIII, IX i X (zwanego tenazą) dochodzi do aktywacji czynnika X. Natomiast w wyniku interakcji fosfolipoprotein płytkowych z czynnikami Xa i Va powstaje kompleks protrombinazy [8].
3. Ziarnistości, w tym α -ziarnistości oraz ziarnistości elektronowo gęste. Ziarnistości α zawierają między innymi czynniki płytkowy 4 (PF-4), β -tromboglobulinę (β -TG), białka adhezyjne (fibronektynę, vWF, trombospondynę, witronektynę) oraz głównie czynnik krzepnięcia V i P-selektynę. W błonie otaczającej ziarnistości skumulowane są glikoproteiny (GP) tworzące receptory powierzchniowe odpowiedzialne za interakcje komórkowe. Ziarnistości gęste gromadzą głównie (ADP), trifosforan adenosyny (ATP), serotoninę, jony wapnia i jony magnezu. Podczas procesu aktywacji płytek zawartość wszystkich ziarnistości zostaje uwolniona do osocza.
4. Mikropęcherzyki (PMV, *platelet-derived microvesicles*), zwane także mikrocząstkami lub mikroplytkami (PMP, *platelet-derived microparticles*), powstają z płytek krwi po stymulacji między innymi trombiną, kolagenem lub innymi agonistami płytkowymi. Mikropęcherzyki to odłączane fragmenty komórkowe w czasie wypuklenia błony plazmatycznej jako wynik aktywnej sekrecji i/lub apoptozy płytek. Jako że są to fragmenty płytek, mają na swej powierzchni między innymi receptory GPIIb/IIIa oraz GPIb; fosfolipidy, w tym fosfatydyloserynę, dzięki czemu wykazują aktywność prokoagulacyjną [9]. Ponadto na ich powierzchni zachodzi aktywacja czynników X, V oraz generacja trombiny. W związku z tym PMV nazywane są prokoagulantem drobnofragmentarycznym (*procoagulant microparticles*).

Piśmiennictwo

1. Shattil S.J., Bennett J.S. Platelets and their membranes in hemostasis: physiology and pathophysiology; *Ann. Inter. Med.* 1980; 94: 108–118.
2. Amin Ch., Macman N., Key N.S. Microparticles in cancer. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2007–08; 36: 177–183.
3. Anoop K.E., Lincz L.F., Seldon M. Microparticles in Health and Disease. *Semin. Thromb. Hemost.* 2008; 34: 683–692.
4. Bakewell S.J., Nestor P., Prasad S. i wsp. Platelet and osteoclast beta 3 integrins are critical for bone metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100: 14205–14210.
5. Brill A., Elinav H., Varon D. Differential role of platelet granular mediators in angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* 2004; 63: 226–235.
6. Calvete J.J. Clues for understanding the structure and function of a prototypic integrin; the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *Thromb. Haemostas.* 1994; 72: 1–15.
7. White J.G., Krumwiede M.D., Cocking-Johnson D., Escolar G., Arterios. *Thrombos. and Vasc. Biol.* 1995; 15: 642–654.
8. Zwall R.F.A. Membrane and lipid involvement In blood coagulation 1978; 515: 163–205.
9. Anoop K.E., Lincz L.F., Seldon M. Microparticles in Health and Disease. *Semin. Thromb. Hemost.* 2008; 34: 683–692.

e-mail: jaroslaw_sokolowski@autograf.pl

Marta Robak

Rola mikrocząsteczek w hemostazie

na podstawie wykładu *The relevance of microparticles for hemostasis* — Andrea Artoni (Mediolan, Włochy)

Mikrocząstki (MP, *microparticles*) są fragmentami błon komórkowych wielkości od 0,05 μm do 1,5 μm . Powstają poprzez odszczepienie od aktywowanych lub ulegających apoptozie komórek — płytek krwi, komórek śródbłonna, leukocytów i erytrocytów. Mikrocząsteczki posiadają na swojej powierzchni antygeny charakterystyczne dla komórek, z których powstały. Uwalnianie MP zachodzi w naturalny sposób w czasie dojrzewania i starzenia się komórek. Ich tworzenie zwiększa się jednak w stanie niedotlenienia, w stanach zapalnych, pod wpływem stresu oksydacyjnego oraz czynnika martwicy nowotworów *alfa* lub pod wpływem sił ścinających w naczyniach tętniczych. Ponadto zwiększone ilości MP występują w przebiegu żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej, cukrzycy, miażdżycy oraz w chorobach układu sercowo-naczyniowego. Do uwalniania płytek dochodzi również podczas dłuższego przechowywania składników krwi do transfuzji. W regulacji procesu tworzenia się MP bierze udział kilka enzymów: gelsolina, translokaza aminofosfolipidów, skramblaza, flopaza oraz kalpaina. Ponadto ważnym elementem regulującym cały ten proces jest stężenie jonów Ca^{2+} w cytoplazmie komórki. W czasie aktywacji czy apoptozy komórek dochodzi do zaburzenia asymetrii fosfolipidów błony komórkowej w wyniku prze-

mieszczania się fosfatydyloseryny (PS) i fosfatydyloetanolaniny do warstwy zewnętrznej. Powstające zatem z tych komórek MP udostępniają powierzchnie, na której dochodzi do aktywacji protrombiny.

Biologiczne właściwości MP

Mikrocząsteczki mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie zakrzepicy. Już w 1946 roku Chargeff i West wysunęli hipotezę, że również osocze pozbawione płytek krwi zawiera czynnik przyspieszający generację trombiny. Jednak dopiero po 20 latach Wolf udowodnił, że osocze poddane ultrawiroowaniu zawiera fragmenty błon komórkowych, które mogą uczestniczyć w procesie trombinogenezy. Wykazano, że MP biorą udział w oddziaływaniu między różnymi komórkami oraz że mogą przekazywać informacje komórkom docelowym. Dotychczas najlepiej poznane są biologiczne właściwości, w tym aktywność prokoagulacyjna MP pochodzących z płytek krwi (PDMP, *platelet-derived MP*). Mikrocząsteczki są „rezerwuarem” czynnika tkankowego (TF, *tissue factor*), selektyn oraz cząstek adhezyjnych; PDMP zawierają na swojej powierzchni receptory dla czynnika VIII oraz V. Sinauridze i wsp. wykazali, że PDMP mają 50–100-krotnie wyższą aktywność prokoagulacyjną niż zaktywowane płytki krwi.

Mikrocząsteczki pochodzenia płytkowego i leukocytarnego wiążą się z aktywowanymi komórkami śródbłonna za pośrednictwem selektyn P i E, co prowadzi do lokalnego wzrostu stężenia TF w osoczu, przyczyniając się do aktywacji krzepnięcia i tworzenia zakrzepu.

P-selektyna obecna na powierzchni zaktywowanych płytek krwi umożliwia wychwytywanie krążących MP poprzez interakcje z receptorem PSGL-1 (*P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*), co może się przyczyniać do narastania zakrzepu. Uważa się, że mechanizm ten odgrywa znaczącą rolę w patogenezie nadkrzepliwości i zakrzepicy w niewydolności serca, w stanach zapalnych i nowotworach. Prokoagulacyjne działanie MP może być wykorzystywane w leczeniu skaz krwotocznych. W badaniach przeprowadzonych na myszach z hemofilią A wykazano, że wlew rekombinowanej P-selektyny powodował zwiększenie krążących MP pochodzenia leukocytarnego będących źródłem TF i fosfatydyloseryny, doprowadzając w ten sposób do nasilenia generacji trombiny i korekacji zaburzeń hemostazy. Przeprowadzono również badania u pacjentów z chorobą von Willebranda, u których analizowano wpływ desmopresyny na stężenie krążących MP. Wykazano, że desmopresyna powoduje zwiększenie tworzenia MP (szczególnie PDMP oraz wykazujących ekspresję TF), a ich największe stężenie osiągnięto 2–8 godzin po podaniu leku. Stwierdzono także pozytywną korelację pomiędzy wzrostem stężenia czynnika von Willebranda (vWF) i aktywności czynnika VIII a stężeniem MP. Równocześnie udowodniono, że duże multimetry vWF są konieczne do generacji MP *in vitro* i *in vivo* oraz że działanie prokoagulacyjne leków może zachodzić poprzez tworzenie MP.

Mikrocząsteczki posiadają antygeny powierzchniowe charakterystyczne dla komórek, z których pochodzą; PDMP posiadają receptory glikoproteinowe, między innymi: GPIIb α (β_3 integryna — CD42b), GPIIbIIIa (α IIB β_3 integryna — CD41a), GPIIb (α IIB β integryna — CD41), GPIX (CD42a), GPIIIa (β_3 integryna — CD61) oraz ekspresję P-selektyny (CD62P). Z badań przeprowadzonych *in vitro* wynika, że PDMP uwolnione z płytek aktywowanych kolagenem lub trombiną eksponują integrynę α IIB β_3 oraz mają zdolność wiązania fibrynogeny. Natomiast PMP pochodzące z płytek po aktywacji składnikami dopełniacza (C5b-9) mają również ekspresję integryny α IIB β_3 , z którą jednak nie wiąże się fibrynogen.

Mikrocząsteczki pochodzące z komórek śródbłonna posiadają ekspresję między innymi molekule adhezyjnej PECAM — 1 (CD31), E-selektyny (CD62E), integryny α v (CD51), VE-kaderyny (CD144) oraz endogliny (CD105). Według niektórych badaczy najlepszą kombinacją antygenów, które identyfikują MP śródbłonkowe, są CD105+/CD144+. Zwiększenie populacji MP o tym układzie antygenów może być wskaźnikiem uszkodzenia naczyń, co z kolei wiąże się z większym ryzykiem rozwoju powikłań zakrzepowych. Zaobserwowano, że MP pochodzące z komórek śródbłonna wykazują ekspresję multimetrów vWF.

Podstawową metodą oceniającą MP są badania w cytometrze przepływowym. Umożliwiają one analizę ilościową i jakościową MP; można je także wykrywać metodą immunoenzymatyczną ELISA, w której stosuje się mikrocząstki opłaszczane aneksyną V bądź przeciwciałami charakterystycznymi dla antygenów komórkowych MP. Metoda ta ma jednak ograniczone zastosowanie, ponieważ aneksyna V może wiązać się z mikrocząstką w niespecyficzny sposób.

e-mail: marta.zubkowicz@gmail.com

Jolanta Oleksiuk

Skuteczność profilaktyki okołoperacyjnej z zastosowaniem koncentratu aktywowanych czynników zespołu protrombiny u chorych na hemofilię powikłaną inhibitorem

na podstawie wykładu *Efficacy of peri-operative prophylaxis with aPCC* — Victor Jimenez Yuste (Madryt, Hiszpania)

Pojawienie się inhibitora czynnika VIII lub czynnika IX jest najczęstszym i najpoważniejszym powikłaniem leczenia substytucyjnego chorych na hemofilię. Ocenia się, że inhibitor czynnika VIII pojawia się u około 30% pacjentów z ciężką hemofilią A i u 0,9–7% pacjentów z umiarkowaną hemofilią A, natomiast inhibitor czynnika IX — u 1,5–3% wszystkich chorych na hemofilię B [1]. Leczenie hemofilii powikłanej inhibitorem ma na celu eliminację inhibitora poprzez zastosowanie immunotolerancji oraz hamowanie krwawień. Leczenie krwawień jest uzależnione od miana inhibitora, rodzaju odpowiedzi ana-

mnestycznej i nasilenia krwawienia. W przypadku chorych z niskim mianem inhibitora i przy krwawieniach zagrażających życiu można zastosować wysokie dawki koncentratu czynnika VIII lub IX. U pacjentów z wysokim mianem inhibitora dostępną i bezpieczną opcją terapeutyczną jest stosowanie koncentratów omijających inhibitor, tj. rekombinowanego czynnika VII (rVIIa) i koncentratu aktywowanych czynników zespołu protrombiny (aPCC). Z piśmiennictwa wynika, że oba preparaty mają podobną skuteczność w kontrolowaniu krwawień oraz zbliżony profil bezpieczeństwa w czasie inwazyjnych procedur. Rzadziej przed planową operacją są stosowane metody usuwające inhibitor z krwiobiegu, jak zewnątrzustrojowa absorpcja na kolumnach opłaszczonych białkiem A gronkowca czy plazmafereza [2, 3].

Pacjenci z hemofilią powikłaną inhibitorem, w porównaniu z chorymi bez inhibitora, mają w znacznie większym stopniu nasilone objawy artropatii hemofilowej, a co za tym idzie poważną dysfunkcję narządu ruchu. Zabiegi operacyjne u chorych z wysokim mianem inhibitora stanowiły istotny problem z powodu wysokiego ryzyka niekontrolowanych krwawień. Szczególnym wyzwaniem były duże zabiegi ortopedyczne, których często wymagają pacjenci z inhibitorem, ze względu na konieczność utrzymania prawidłowej hemostazy nie tylko w trakcie operacji, ale również przez czas niezbędny do zagojenia rany i rehabilitację. Przed wprowadzeniem do leczenia czynników omijających inhibitor, do późnych lat osiemdziesiątych, u chorych z inhibitorem były wykonywane jedynie zabiegi operacyjne ze wskazań życiowych. Obecnie możliwe jest wykonywanie wielu zabiegów ortopedycznych, które poprawiają funkcję stawów (synowektomia, artrodeza, korekcyjna osteotomia, implantacja endoprotezy), a przez to jakość życia chorych na hemofilię [2, 4].

aPCC jest skutecznym i bezpiecznym lekiem zapewniającym prawidłową hemostazę w okresie około- i pooperacyjnym. Może być stosowana w monoterapii, jak i w leczeniu skojarzonym z rFVIIa. Istnieje szereg doniesień o jej zastosowaniu jako pierwszoliniowej profilaktyki okresu okołooperacyjnego. Optymalne dawkowanie aPCC oraz okres stosowania ciągle pozostają nieustalone. W większości przypadków operacji ortopedycznych aPCC była stosowana w bolusie, w dawce 50–100 j.m./kg mc. (w zależności od rozległości operacji) przed zabiegiem, a następnie w odstępach 6–12-godzinnych, nie przekraczając dawki dobowej 200 j.m./kg mc. W niektórych ośrodkach stosowano dawki wyższe niż zalecana przez producenta 200 j.m./kg mc. na dobę, nie obserwując przy tym większej liczby powikłań zakrzepowych. Leczenie zwykle prowadzone jest przez okres około 10–14 dni oraz kontynuowane w trakcie rehabilitacji [5]. W niemal wszystkich opisywanych przypadkach leczenie zapewniało wystarczającą hemostazę oraz było dobrze tolerowane. Ocena skuteczności hemostatycznej opiera się na odpowiedzi klinicznej, na podstawie objętości krwi utraconej w trakcie zabiegu i po nim, częstości występowania krwiaków pooperacyjnych i konieczności transfuzji. Właściwe leczenie czynnikami omijającymi inhibitor jest utrudnione ze względu na brak dostępnego testu laboratoryjnego umożliwiającego

ustalenie właściwej dawki oraz monitorującego skuteczność leczenia. Być może w tym celu będzie wykorzystany pomiar generacji trombiny czy tromboelastometria.

Powikłania zakrzepowe u operowanych pacjentów leczonych koncentratami czynników omijających inhibitor są rzadkie. W pojedynczych przypadkach obserwowano zawał mięśnia sercowego czy zespół rozsianego wykrzepiania śródnaczyniowego (DIC) [6]. Częstość tych powikłań zależy nie tylko od dawki i częstotliwości podawania aPCC, ale w dużym stopniu od indywidualnych czynników ryzyka zakrzepicy. U każdego chorego należy ocenić indywidualne ryzyko powikłań zakrzepowozatorowych przed zabiegiem. W grupie z podwyższonym ryzykiem żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej lub zakrzepicą w wywiadzie należy rozważyć profilaktykę przeciwzakrzepową. Wszyscy pacjenci muszą być monitorowani pod kątem markerów uogólnionej aktywacji krzepnięcia krwi (płytki krwi, PT, APTT, fibrynogen, D-dimer). Nie zaleca się rutynowego podawania leków antyfibrynolitycznych w trakcie leczenia aPCC, gdyż mogą one zwiększać ryzyko powikłań zakrzepowych. Podsumowując, większość inwazyjnych procedur może być skutecznie przeprowadzonych z użyciem aPCC przy minimalnym ryzyku powikłań, pod warunkiem zachowania właściwego dawkowania i wnikliwej obserwacji w kierunku ewentualnych powikłań.

Do niedawna obecność inhibitora u chorego na hemofilię była istotnym przeciwwskazaniem do wykonania zabiegu operacyjnego, z wyjątkiem tych ratujących życie. Od czasu wprowadzenia do leczenia czynników omijających inhibitor, pomimo dużego ryzyka krwawienia, możliwe jest bezpieczne przeprowadzenie nawet rozległych zabiegów ortopedycznych. Utrzymanie prawidłowej hemostazy jest niezmiernie istotne w trakcie samego zabiegu, jak i w okresie okołooperacyjnym. W trakcie zabiegu zapobiega nadmiernej utracie krwi czy tworzeniu się krwiaków w ranie, co może niekorzystnie wpłynąć lub nawet zniweczyć wynik operacji. W okresie pooperacyjnym umożliwia prawidłowe gojenie się rany oraz odpowiednią rehabilitację. W związku z czym, pomimo wysokiego ryzyka powikłań krwotocznych, wyniki zabiegów ortopedycznych u pacjentów z inhibitorem są dobre, często nie odbiegają od tych uzyskiwanych u chorych bez inhibitora czy nawet u pacjentów bez zaburzeń krzepnięcia. Warunkiem jest wykonywanie zabiegów w wyspecjalizowanych ośrodkach leczenia hemofilii z udziałem interdyscyplinarnego zespołu [7]. W skład takiego zespołu powinien wchodzić hematolog z doświadczeniem w stosowaniu czynników omijających inhibitor oraz chirurg lub ortopeda znający specyfikę inwazyjnego leczenia chorych na hemofilię.

Chociaż aPCC jest stosowane od wielu lat, istnieje kilka zagadnień, takich jak wybór testu do monitorowania leczenia, wpływ na odpowiedź anamnestyczną czy dokładne określenie czynników związanych z ryzykiem powikłań zakrzepowych, które wymagają wyjaśnienia w toku dalszych badań na większych grupach pacjentów. Mimo to wprowadzenie aPCC do profilaktyki okołooperacyjnej stało się ogromnym postępem w leczeniu pacjentów z inhibitorem i stanowi milowy krok w rozwoju zabiegowego leczenia chorych z inhibitorem.

Piśmiennictwo

1. Gomperts E. D., Astermark J., Gringeri A. i wsp. From theory to practise: applying current clinical knowledge and treatment strategies to the care of haemophilia A patients with inhibitors. *Blood Rev.* 2008; 22 (supl. 1): S1–S11.
2. Rodriguez-Merchan E.C., Quintana M., Jimenez-Yuste V. i wsp. Orthopaedic surgery for inhibitor patients: a series of 27 procedures (25 patients). *Haemophilia* 2007; 13: 613–619.
3. Santagostino E., Morfini M., Auerswald G. K-H. i wsp. Paediatric haemophilia with inhibitors: existing management options, treatment gaps and unmet needs. *Haemophilia* 2009; 15: 983–989.
4. Tjonnefjord G.E., Brinch L., Gedde-Dahl III T. i wsp. Activated prothrombin complex concentrate (FEIBA) treatment during surgery in patients with inhibitors to FVIII/IX. *Haemophilia* 2004; 10: 174–178.
5. Lauroua P., Ferrer A.M., Guerin V. Successful major and minor surgery using factor VIII inhibitor bypassing activity in patients with haemophilia A and inhibitors. *Haemophilia* 2009; 29: 1–8.
6. Kraut E.H., Aledort L.M., Arkin S. i wsp. Surgical interventions in a cohort of patients with haemophilia A and inhibitors: an experimental retrospective chart review. *Haemophilia* 2007; 13: 508–517.
7. Jimenez-Yuste V. Rodriguez-Merchan E.C., Alvarez M.T. i wsp. Controversies and challenges in elective orthopedic surgery in patients with hemophilia and inhibitors. 2008; 45 (2 supl. 1): S64–S67.

e-mail: jola_oleksiuk@op.pl