

Инхибиторна хемофилия – съвременна концепция за етиопатогенеза и превенция

Доц. Петрана Чакърова,¹ д-р Мария Спасова,² д-р Иван Чакърров,¹ д-р Ангелина Стоянова²

¹Клиника по детски болести, Медицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора

²Клиника по Педиатрия и медицинска генетика, Медицински университет, Пловдив

Резюме

Най-важният страничен ефект при лечението на хемофилия А е развитието на антитела срещу фактор VIII. Те влияят върху реинфузирания фактор VIII и могат напълно да блокират хемостатичния потенциал на съсирващия продукт. Развитието на инхибитори при хемофилия А и хемофилия В се смята за многофакторно явление, което включва генетични и външни (свързани със средата) фактори. Най-силният показател за потенциалното развитие на инхибитори е генният дефект на фактор VIII, който определя тежестта на заболяването. Установени са две основни групи генни модификации, влияещи развитието на инхибитори: мутации с висок риск (големи делеции, инверсии на интрон 22 и интрон 1, nonsense мутации, non-A-run малки делеции, splice мутации в запазени позиции), които са свързани с неутрализиращ антиген и с тежък фенотип на хемофилия А. Втората група са мутации с нисък риск (missense мутации, дупликации и малки делеции/инсерции в A-run, splice мутации), които водят до липса на функционалност на фактор VIII гена и до тежък или в повечето случаи слаб/среден хемофилия А фенотип. Развитието на инхибитори е предизвикано от сложното взаимодействие между генетични и външни фактори.

Представяме три клинични случая – три момчета на 4, 7 и 9 години с инхибиторна хемофилия и с прогресивно увеличаващ се титър на инхибиторни антитела, както и прилагания терапевтичен подход при тях.

Ключови думи: инхибиторна хемофилия, антитела, мутации.

Inhibitor hemophilia – contemporary concept of etiopathogenesis and prevention

Petrana Chakarova,¹ Maria Spasova,² Ivan Chakarov,¹ Angelina Stoyanova²

¹Department of Pediatrics, Medical Faculty, Thracian University, Stara Zagora

²Department of Pediatrics and Medical Genetics, Medical University, Plovdiv

Abstract

The most important side effect during Hemophilia A treatment is the development of antibodies to factor VIII. They have an impact on the re-infused factor VIII and can completely block the haemostatic potential of the clotting product. Inhibitor development in hemophilia A and hemophilia B is considered a multifactor phenomenon, which includes genetic and external (environmental) factors. The strongest predictor of potential inhibitor development is factor VIII gene defect, which determines the severity of the disease. Two major groups of gene modifications are determined to influence inhibitor development: high risk mutations (large deletions, intron 22 and intron 1 inversions, nonsense mutations, non-A-run small deletions, splice site mutations at conserved positions), which are associated with no circulating antigen and severe HA phenotype. The second group are low risk mutations (missense mutations, duplications and small deletions/insertions within the A-run, splice-site mutations at non-conserved positions) causing the expressed FVIII protein to be non-functional and resulting in either a severe or, in most cases, a mild/moderate HA phenotype. Inhibitor development is caused by the complex interaction between genetic and external factors.

Presented are 3 clinical cases: 3 boys ages 4, 7, and 9 with inhibitor hemophilia and progressively increasing titer of inhibitor antibodies. The applied treatment is explained.

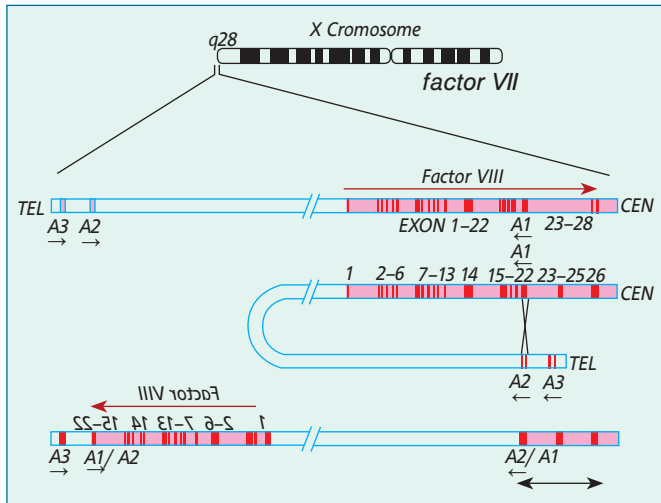
Key words: inhibitor hemophilia, antibodies, mutations.

Въведение

Днес е известно, че първоначално описаните антикоагуланти към антихемофилния фактор са неутрализиращи антитела към фактор VIII на съсирването, наричани инхибитори на фактор VIII.¹⁰ Развитието на инхибитори е многофакторно явление; в по-голямата си част то се обяснява от генетичните промени, но факторите на околната среда също допринасят за тяхно-

мо появяване. Образуването на антитела е резултат от поредица от тясно свързани взаимодействия между различните клетки на естествената и адаптивната имунна система в много различни компартменти.

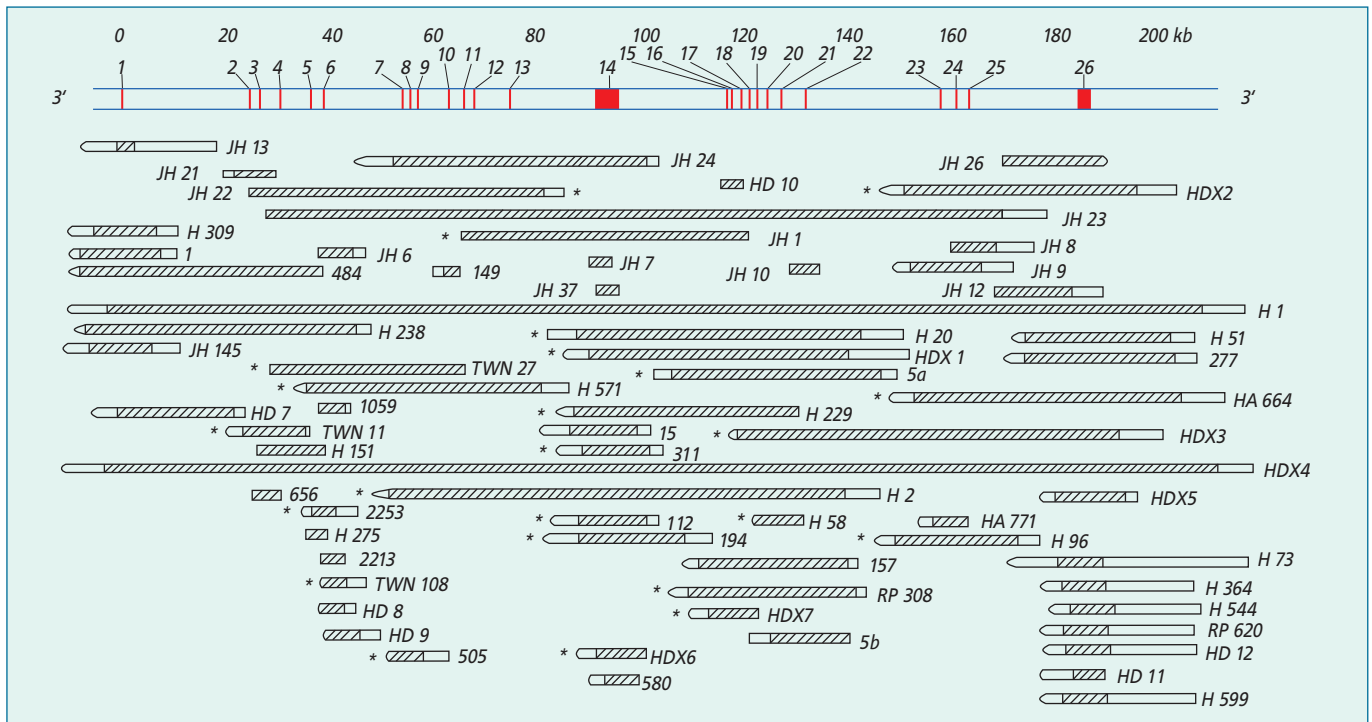
Рискът от развитие на антитела, които инхибират или деактивират заместващата терапия с фактор VIII или IX, е 3% при хемофилия Б, докато при пациенти с хемофилия А той е около 30%.⁸



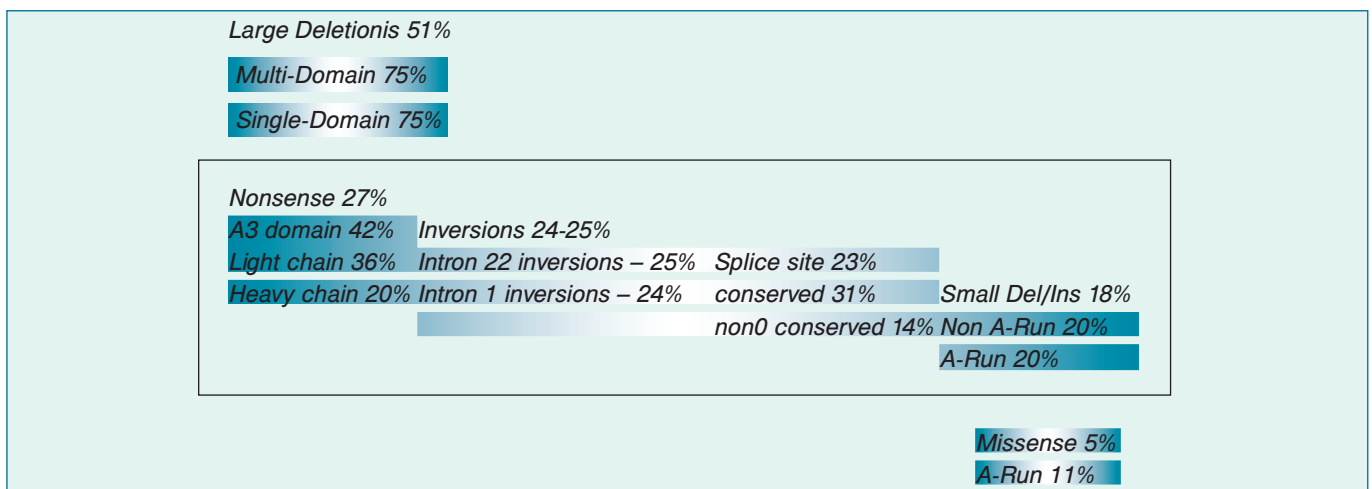
Фиг. 1. Модел за възникване на инверсия в гена на фактор VIII

Една от причините е разликата в молекулярния размер на фактор IX и фактор VIII. Инфузията на голяма несамостоятелна молекула ще произведе повече несамостоятелни епитопи и следователно може да носи по-висок риск, причинявайки развитие на инхибиторни антитела. Генетичните маркери, предразполагащи пациентите към образуване на инхибитори, освен мутациите в гените на фактор VIII и IX, включват промени в МНС (главния комплекс на тъканната съвместимост) алелите и полиморфизмите в имуноотговорните гени (IL -10, TNF, C1LA 4).

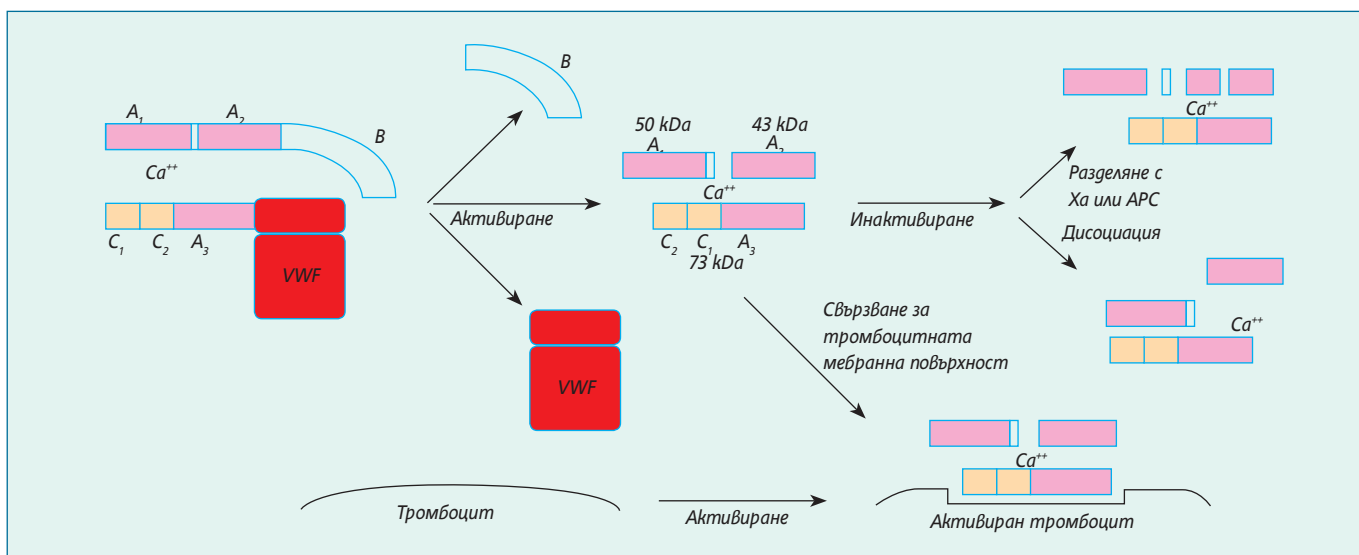
Мутациите, възпрепятстващи ендогенния синтез на протеин от фактор VIII – големи делеции, по sense мутации и инверсии в интрон 22 и интрон 1 (фиг. 1 и 2), се свързват с много по-чести случаи на



Фиг. 2. Делеции в гена за фактор VIII, установени при болни от хемофилия А. (Antonarakis S. E., 1998)¹



Фиг. 3. Инхибиторно преобладаване (процентно) при пациенти с хемофилия А с различни мутационни типове



Фиг. 4. Тромбин активиране и инактивиране на фактор VIII и формиране на комплекс с тромбоцитната повърхност (Kaufman R. J., 1992)⁹

инхибитори в сравнение с missense и splicing мутациите. При леката до средна по тежест хемофилия missense мутациите-дупликации, малки делеции, инсерция добавена в A-тип и splice site представляват основния тип мутации, със сравнително рядко срещани случаи на инхибитори от порядъка на 5%. Тези пациенти синтезират известно количество ендогенен протеин, който изглежда е достатъчен, за да предизвика имуно толеранс (фиг. 3).¹¹

Все пак, при пациенти с missense мутации, струпани в полето A2 и C2 (C1/C2 съединение), рискът от образуване на инхибитор е четворно по-голям, отколкото при пациенти с мутации извън този регион. (фиг. 4). Мутациите с висок риск са свързани с нециркулиращ Ag и фенотипно винаги са свързани с тежка хемофилия A.^{7, 16}

Имунология на образуването на инхибитори

Първоначалният процес при всяко образуване на антитела към протеините е разпознаването им чрез специфични „наивни“ В-клетки, които се намират и циркулират във фоликулите на периферните лимфоидни органи, като далак, лимфни възли или мукозна лимфоидна тъкан.

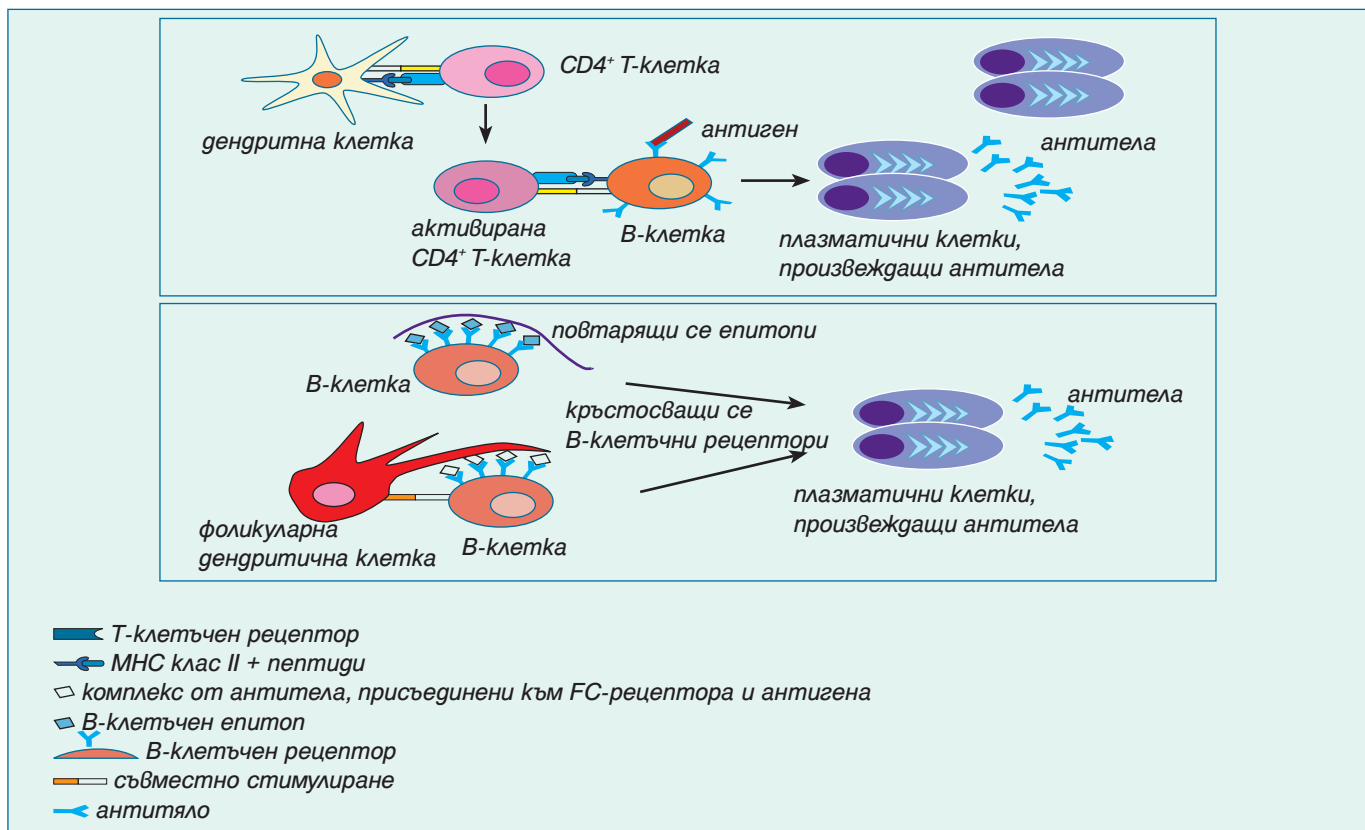
Протеините навлизат в тези лимфоидни органи и често са транспортирани от дендритни клетки, които могат да преработват Ag на повърхността на клетките в интактна форма, като правят възможно свързването със специфичните В-клетки.¹⁵ Протеините се свързват със специфични антиген рецептори (В-клетъчни рецептори). Свързването с рецепторите води до образуването на антиген-ре-

цепторни комплекси, които иницират активирането на В-клетките и клоново разширяване, както и диференцирането в плазмени клетки, произвеждащи антитела. Активирането на В-клетки, може да се осъществи по Т-клетъчно зависим и Т-клетъчно независим начин (фиг. 5).

Протеини, като фактор VIII, като цяло са смятани за Т-клетъчно зависими антигени. В-клетките, разпознаващи протеините, изискват помощта на CD4 хелперни клетки, за да се разширят и диференцират в произвеждащи антитела плазмени клетки. Взаимодействието между В-клетки и CD4+ Т-клетки задейства и превключването и афинитетно узряване на антителата, което води до превключването от IgM на IgG, IgA и IgE и до генерирането на антитела с висок афинитет.¹⁴

Афинитетното узряване се индуцира чрез хипермутации на гените на имуноглобулините и последващо оцеляване на онези В-клетки, които произвеждат антитела с най-висок афинитет. В-клетките изискват когнитивно (родствено) взаимодействие с CD4+ Т-хелперите. Първоначално обаче, CD4+ Т-хелперите трябва да взаимодействат с узрелите дендритни клетки, които представляват антигенни пептиди в съдържанието на главния комплекс на тъканна съвместимост (МНС) клас II и експресирани костимулиращи молекули.⁵

Дендритните клетки са считани за ключови регулатори на адаптивния имунитет срещу протеиновите Ag. Узряването на дендритните клетки изисква проинфламаторни стимули – цитокини или патоген-свързани моделни молекули, напр. лиганди за тол-подобни (toll-like receptors).^{4, 13}



Фиг. 5. Схематичен вид на T-клетъчно зависимите и T-клетъчно независимите антителни отговори

Негенетични рискови фактори за развитието на инхибитора

✦ Възраст – колкото по-рано пациентът започне терапия с фактор, толкова по-висок е рискът от развитие на инхибитори.

✦ Профилактика vs при необходимост – рискът от антитела намалява с 60% при пациенти, подложени на редовна профилактика в сравнение с тези, при които лечението е при необходимост.²

✦ Терапевтичният режим на продължителни инфузии повишава риска от развитие на инхибитори.

✦ При по-интензивно лечение рискът е по-голям.

✦ Продуктите от плазма носят по-малък риск от развитие на инхибитори (понижава се имуногенността на фактор VIII, което замаскира В- и Т-клетъчните епитопи или променя тристепенната структура на фактор VIII).

✦ Смяната на концентрантите на фактора също създава риск.

✦ Предизвикателствата на имунната система също играят роля в развитието на инхибитори.

Полиморфизмите в IL-10 гена, TNF- α и цитотоксичен Т-лимфоцитен антиген 4 (CTLA-4) се свързват с развитието на инхибитори.¹²

✦ Операциите и кръвенето са потенциални имуногенни фактори.

Цялостният риск за развитие на инхибитори отразява нивото на сигнали за опасност, уловени от имунната система на пациента.

На таблица 1 са представени 3 клинични случая, които показват значението на генетичните и негенетичните фактори в клиничната еволюция на хемофилията в детската възраст, както и от нуждата от провеждането на профилактика, независимо от ранното прилагане на рекомбинантни фактори при лечението on demand.

Целта на лечението на хемофилия А е да се предотвратят или лекуват епизодите на кръвене, главно чрез заместване на липсващия коагулоционен фактор VIII. Особено важни събития са разработването на безопасни и ефективни концентрати на фактор VIII, които са или извлечени от плазма, или рекомбинантни, въвеждането на профилактика и самостоятелни инфузии в домашни условия, както и развитието на терапии за предизвикване на имуно толеранс.

Пациентите с инхибитори имат повече епизоди, които са клинично по-сериозни или са с животозастрашаващо кръвене. Кръвенето е по-трудно за контролиране, защото пациентите не се влияят от инфузии с фактор VIII или IX и често трябва да бъдат лекувани с bypassing агенти, като рекомбинантен фактор VIIa или активирани концентрати на протромбиновия комплекс.

Показатели	I случай	II случай	III случай
Възраст	9 години; момче	7 години; момче	4 години; момче
НА(форма)	Тежка	Лека	Тежка
Ниво на фактор VIII	0.7%	8.8%	0.2%
Фамилна анамнеза	(+)	(-)	(+)
Начало на клинична изява	Период на новороденото (септалхематом и кръвене от пълната връв)	4-годишна възраст, епистаксис, субкутанни хематоми	На 5 ден от живота
Начало на лечение	Период на новороденото	На 4-годишна възраст	На 6 месец от живота
Вид на препарата	Плазмен дериват	Плазмен дериват	Рекомбинантен фактор VIII
Генетичен дефект	Инверсия в Intron 22		
Честота и вид на кръвене	Епистаксис на 22-месечна възраст; гингиворагии на 23-месечна възраст	6-годишна възраст, хемартроза на левия лакът; след 1 седмица отново 2 епизода на епистаксис	1 кръвоизлив на 2 месеца; меко-тъканни хематоми; епистаксис; рядко ставни кръвоизливи
Инхибитори	20 BU	1.1 BU	На 4 години инхибитор 2 BU
On demand	Novo Seven		Рекомбинантен фактор 35 UI/kg
Корекция в лечението	След 3 месец 34 BU		След 6 месец повишен титър на инх. 8.5 BU
Еволюция на кръвене	Мекотъканни хематоми и мукозно кръвене (едномесечно; 1 на 2 месеца)		Без клиника за повишена честота, тежест продъл. на симптомите на кръвене
Лечение: Novo Seven +FEIBA, без първична и вторична профилактика	14 ставни кръвоизлива (5 в дясното коляно)		

Табл. 1. Описание на три клинични случая

Регулиране на инхибиторите

Цялостният риск за развитие на инхибитор отразява нивото на сигнали за опасност, уловени от имунната система на пациента. Опасността се предава посредством различни сигнали, които са свързани или с патогени, или с тъканно и клетъчно увреждане. Поради тази причина пациентите се подлагат на фактор VIII при отсъствието на сигнали за имунологична опасност, като се избягва първоначално лечението с фактор VIII по време на инфекция; хирургичните намеси в първите 20 дни на излагане, както и ваксинациите в деня на лечението с фактор VIII. Всеки един настъпил кръвоизлив трябва да бъде лекуван навреме, като незабавно се приложат по-високи дози, като така се редуцира продължителното и интензивно лечение и се съкращава времето на тъканно увреждане.

Един ескалиращ режим с ниска доза може да предостави по-добър дългосрочен резултат при пациенти с не толкова често хемартрози, както и по-добри резултати, дължащи се на ранно започване на профилактика.

Едно ранно започване на профилактика се свързва с намаляване на скоростта на развитие на инхибитори при пациенти с остра хемофилия А, като това евентуално се дължи на минимизиране на излагане на имунната система за опасност през първите 20 дни на излагане.³

След като веднъж пациентите са развили толеранс към фактор VIII, обикновено след 20 до 50 дни на излагане на режима с ниска доза и позволяване на венозен достъп, профилактиката може да бъде сменена с по-типичния режим от 3 пъти седмично, което се оказва оптимална обща защита.⁶

Изводи

1. Прилагането на рекомбинантни фактори удължава природните дадености и е „златен стандарт“.

2. Изявата на 4-5 кръвоизлива месечно е индикация за започване на профилактичен режим.

3. Рекомбинантните фактори са най-подходящи при малко лекувани или нелекувани деца.

4. Рекомбинантните фактори от IV генерация са с удължено действие, което ги прави най-подходящи.

При инхибиторна хемофилия поведението цели ерадикация на това състояние.

5. Индикацията на имунен толеранс се определя от:

- дозата на фактор VIII;
- възрастта на започване на ITI;
- вид на продукта;
- имуномодулация.

Съвременните насоки в клиничното поведение при хемофилия са:

1. Индивидуализиране на лечението.
2. Генна диагностика.
3. Фармакокинетика.
4. Ставен статус.
5. Нови подходи при профилактиката, а тя е:
 - ✦ Ранна профилактика.
 - ✦ Толеризиращ режим.
 - ✦ Първа апликация – без кръвоизлив.

Насоки в България

Оптимизиране на лечението чрез:

1. Използване на рекомбинантни фактори.
2. Индивидуализиране на лечението.
3. Профилактика.
4. Комплексно лечение.

При инхибиторна хемофилия:

1. Имунен толеранс.
2. Комбинирано лечение на кръвоизливите.

Литература

1. Antonarakis SE. Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and haemophilia A. *Hemophilia* July 1998; volume 4 (Suppl. 2): p. 1–11.
2. Astermark J. Non genetic risk factor and the development of inhibitors in hemophilia: a comprehensive review and consensus report. *Hemophilia* 2010; 16(5):747–66.
3. Bidlingmaier C, Deml MM, Kurnik K. Continuous infusion of factor concentrates in children with hemophilia A in comparison with bolus injections. *Hemophilia* 2006; 12:212–17.
4. Ceruti A. The regulation of IgA class switching. *Nature Rev Immunol* 2008; 8:421–34.
5. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Rev Immunol* 2010; 10:826–37.
6. Coppola A, Di CM, De SC. Primary prophylaxis in children with hemophilia. *Blood Transfus* 2008; 6 (Suppl. 2):4–11.
7. Gouw SC, van der Born JG, Marijke van den BH. Treatment – related risk factor of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* 2007; 109, 4648–4654.
8. Gringery A et.al. Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. *Blood* 2003; 102(7):2358–63.
9. Kaufman Regulation of Factor VIII Activity. *Annual Review of Medicine* February 1992; vol. 43; 325–339.
10. Margolius A, Jackson DP, Ratnoff O. Circulating anticoagulants: a study of 40 cases a review of the literature. *Medicine* (Baltimore) 1961; 40:145–202.
11. Oldenburg J, Pavlova A, Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Hemophilia* 2006; 12 (Suppl. 6):15–23.
12. Reding MT. Immunological aspects of inhibitor development. *Haemophilia* 2006; 12 (Suppl. 6):p. 30–5; discussion 35–6.
13. Swanson CL, Wilson TJ, Strauch P, Colonna M, Pelanda R, Torres RM. Type I IFN enhances follicular B cell contribution to the T cell – independent antibody response. *J Exp Med* 2010; 207:1485:500.
14. Wolniak KL, Shinall SM, Waldschmidt TJ. The germinal center response. *Crit Rev Immunol* 2004; 24–39–65.
15. Wykes M, Pombo A, Jenkis C, MacPherson GG. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol* 1998; 161–1313–19.
16. Yang J, Benyamin B, McEvoy BP, Gordon S, Henders AK, Nyholt DR, Madden PA, Heath AC, Martin NG, Montgomery GW, Goddard ME, Visscher PM: Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nat Genet* 2010; 42:565–569.