Povezanost prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika s ukupnim trombinskim potencijalom i fenotipskim izražajem u bolesnika s hemofilijom A

Miloš, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:075077

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marija Miloš

Povezanost prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika s ukupnim trombinskim potencijalom i fenotipskim izražajem u bolesnika s hemofilijom A

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Marija Miloš

Association of procoagulant and fibrinolytic factors with thrombin potential and hemophilia A phenotype

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marija Miloš

Povezanost prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika s ukupnim trombinskim potencijalom i fenotipskim izražajem u bolesnika s hemofilijom A

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Prof. dr. sc. Renata Zadro

Zagreb, 2012.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen na Zavodu za hematologiju i koagulaciju, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Renate Zadro kojoj se zahvaljujem na velikoj stručnoj i organizacijskoj pomoći tijekom cijelog razdoblja planiranja i izrade ovog rada, kao i iznimno dragocjenim savjetima prilikom pisanja.

Rad je većim dijelom izrađen u okviru projekta „Dijagnostika i terapija poremećaja hemostaze“ Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (broj projekta: 214-1081872-0054, voditelj prof. dr. sc. Silva Zupančić-Šalek).

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za hematologiju i koagulaciju, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb na dragocjenoj pomoći koju su mi pružili pri obradi uzoraka i izvođenju analiza. Posebno se zahvaljujem kolegici Désirée Coen Herak, mag. med. biochem. na nesebičnoj stručnoj pomoći i na svakoj drugoj podršci. Zahvaljujem kolegici dr. sc. Mili Lovrić na njenom doprinosu i potpori.

Velika zahvala prof. dr. sc. Silvi Zupančić-Šalek na savjetima pri odabiru bolesnika, kontaktu s bolesnicima, i pregledu medicinske dokumentacije, kao i medicinskim sestrama Centra za hemofiliju, Zavoda za hematologiju, Klinike za unutarnje bolesti, KBC Zagreb koje su mi pri tome pružile svoju dragocjenu pomoć.

Hvala mojoj obitelji i svim prijateljima na strpljivosti i potpori.

Rad posvećujem svojoj dragoj djeci Luciji i Ivanu, te ocu Frani Penava, učitelju koji me je cijeli život poticao na učenje.

SAŽETAK

Hemofilija A je rijetki X-vezani nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi koji nastaje zbog potpunog ili djelomičnog manjka aktivnosti FVIII u cirkulaciji. S obzirom na ostatnu aktivnost FVIII bolest se dijeli na teški, srednje teški i blagi oblik. Kod teškog oblika bolesti javljaju se spontana krvarenja u zglobove i mišiće, dok su kod blažih oblika spontana krvarenja rijetka. Literaturni podaci ukazuju na veliku heterogenost kliničkog izražaja hemofilije A, a mehanizmi zaslužni za tu heterogenost nisu posve jasni. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi mogući utjecaj drugih prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika, osim FVIII, na endogeni trombinski potencijal i na klinički izražaj bolesti. Također je ispitana vrijednost novih metoda, analize reakcijske krivulje APTV-a i analize stvaranja trombina u dijagnostici hemofilije A budući da se ovim metodama mjeri ukupni hemostatski potencijal plazme. Dobiveni rezultati potvrđuju pretpostavke o povećanoj aktivnosti fibrinolitičkog sustava kod hemofilije A u odnosu na zdravu populaciju, koja je izraženija kod teškog oblika bolesti. Iako rezultati ovog i nekih drugih istraživanja upućuju na mogućnost pojačane fibrinolize kod bolesnika s težom kliničkom slikom, potrebna su dodatna ispitivanja s obzirom da su u različitim studijama dobiveni dvojbeni rezultati. Ispitivanjem analize reakcijske krivulje APTV-a potvrđena je vrijednost metode u dijagnostici hemofilije A. Pokazana je dobra korelacija sa standardnim laboratorijskim metodama i kliničkim pokazateljima te dobro razlikovanje stupnja bolesti na temelju mjerenih parametara, osobito parametra DELTA. Jednostavnost i cijena metode, koja zahtijeva samo mjerenje APTV-a bez potrebe za dodatnim reagensima, nije zanemariva dodatna prednost ove metode. Ispitivanjem analize stvaranja trombina najbolji su rezultati dobiveni za parametar AUC, iako je u odnosu na parametar DELTA dobivena slabija korelacija sa standardnim laboratorijskim metodama i kliničkim pokazateljima, te slabije razlikovanje stupnja bolesti hemofilije A. U postojećoj izvedbi metoda nije primjenjiva u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici bolesnika s hemofilijom A i potrebne su određene dorade i izmjene.

Ključne riječi: hemofilija A, FVIII, prokoagulacijski čimbenici, fibrinolitički čmbenici, fenotipski izražaj hemofilije A, analiza reakcijske krivulje APTV-a, analiza stvaranja trombina

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Hemophilia A is a rare X-linked bleeding disorder characterized by a complete or partial deficiency of coagulation FVIII activity and increased bleeding tendency. Based on FVIII activity, hemophilia A is classified as severe, moderate or mild. The clinical phenotype of severe hemophilia A consists of spontaneous joint and muscle bleeds, whereas spontaneous bleeding episodes are rare in the moderate and mild categories of disease. Large heterogeneity in bleeding pattern has been observed among patients with hemophilia A, indicating that the residual level of FVIII is not the only determinant of the clinical phenotype. The mechanisms contributing to wide phenotypical heterogeneity are poorly understood and probably multifactorial. The aim of this study was to identify whether plasma levels of common prothrombotic and fibrinolytic factors are associated with clinical phenotypes in hemophilia A patients. Additionally, new laboratory methods that assess overall clotting function, clot waveform analysis and thrombin generation test, were evaluated in order to find out whether these methods are superior determinants of clinical phenotype, compared to standard laboratory parameters.

Materials and Methods: The activity or concentrations of 11 common prothrombotic and fibrinolytic factors were measured and correlated to endogenous thrombin potential and clinical parameters. A new quantitative aPTT waveform analysis was developed from a single aPTT measurement with two different evaluation modes (drifting baseline-DB and point of inflexion-PI), that enabled the calculation of 3 quantitative parameters: DELTA (aPTT-PI minus aPTT-DB), RATIO-1 (aPTT-PI/aPTT-DB) and RATIO-2 (DELTA/aPTT-DB). Additionaly, commercially available thrombin generation test ETP-C, setting for hemophilia patients (Siemens, Marburg, Germany), was measured. The performance of the two methods was evaluated in 101 healthy male subjects and 100 hemophilia A patients.

Results: Obtained results showed enhanced fibrinolytic activity in hemophila A patients as compared to healthy subjects, as well as in severe hemophilia A patients compared to those with mild disease. By using new quantitative aPTT waveform analysis, good correlation to standard laboratory methods and to clinical parameters was obtained, especially when using parameter DELTA. Also, good discrimination was obtained between normal subjects and hemophilia A patients, as well as between severe and mild hemophilia A patients. Thrombin generation test revealed AUC as the best discriminating parameter.

Discussion: The enhanced fibrinolytic activity in patients with severe clinical phenotype was not confirmed with certainity and additional studies are required for investigating the

mechanisms contributing to wide phenotypical heterogeneity in hemophilia A patients. The fact that new quantitative aPTT waveform analysis was at least equivalent to standard laboratory methods (especially for DELTA) and was characterized by simplicity and cost benefit makes this approach a reasonable and promising tool for assessing coagulation in hemophilia patients. Although the AUC was the best discriminating parameter in TGT, the correlation to routine laboratory methods and clinical parameters was weaker than those obtained by waveform analysis. Also, many preanalytical issues were opened by using thrombin generation test, and they were pronounced due to weak thrombin signal in hemophilia setting of the method.

Conclusions: We can conclude that new waveform analysis derived from the routine aPTT assay could be an excellent laboratory tool for assessing coagulation process, as well as for obtaining additional information about hemophilia patients. Based on the obtained results, the used ETP-C method did not fulfill, for the time being, the goals expected for a routine laboratory method.

Key words: hemophilia A, FVIII, procoagulant factors, fibrinolytic factors, hemophilia A phenotype, aPTT waveform analysis, thrombin generation test

KLJUČNE RIJEČI:

HEMOFILIJA A
FVIII
PROKOAGULACIJSKI ČIMBENICI
FIBRINOLITIČKI ČIMBENICI
FENOTIPSKI IZRAŽAJ HEMOFILIJE A
ANALIZA REAKCIJSKE KRIVULJE APTV-A
ANALIZA STVARANJA TROMBINA

KRATICE

AIDS	sindrom stečene imunodeficijencije, engl. *acquired immune deficiency syndrome*
APC	aktivirani protein C
APC	stanice koje predočuju antigen, engl. *antigen-presenting cells*
aPCC	aktivirani koncentrat protrombinskog kompleksa, engl. *activated prothrombin complex concentrates*
APTV	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
APTV-DB	APTV određen metodom pomaka osnovne linije, engl. *drifting baseline*
APTV-FA	APTV određen zadanom promjenom apsorpcije, engl. *fixed absorbance*
APTV-PI	APTV određen metodom točke infleksije, engl. *point of inflexion*
aPTTSR	kvantitativni parametar APTV-omjer, engl. *aPTT-slope ratio*
AUC	površina ispod krivulje, engl. *area under the curve*
BDDrFVIII	rekombinantni pripravak faktora VIII kojemu nedostaje domena B, engl. *B-domain deleted recombinant FVIII molecule*
CTI	inhibitor tripsina iz (kukuruza) žitarica, engl. *corn trypsin inhibitor*
CTLA-4	protein 4 povezan s T citotoksičnim limfocitima,
CURVES	program za procjenu i evaluaciju krivulja, engl. *curve evaluation software*
DaPTT	kvantitativni parametar delta APTV
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
ELFA	enzimunokemijska metoda s fluorescentnom detekcijom
ETP	endogeni trombinski potencijal
FEIBA	komercijalni pripravak lijeka za premoštavajuću terapiju kod hemofilije A, engl. *factor eight bypassing activity*
FII	faktor II
FIX	faktor IX
FIXa	aktivirani oblik faktora IX
FV	faktor V
FVG1691A	polimorfizam u genu za faktor V gdje je na poziciji 1691 gvanin zamijenjen adeninom
FVII	faktor VII
FVIIa	aktivirani oblik faktora VII
FVIII	faktor VIII

FVIIIa	aktivirani oblik faktora VIII
FVIIIch	kromogena metoda za određivanje aktivnosti faktora VIII
FVIIIkgl	koagulacijska metoda u jednom stupnju za određivanje aktivnosti faktora VIII
FX	faktor X
FXa	aktivirani oblik faktora X
FXI	faktor XI
FXIII	faktor XIII
F1+2	protrombinski fragment 1+2
HAMSTeRS	internetska baza podataka za hemofiliju A, engl. *International Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site*
HBV	virus hepatitisa B
HCV	virus hepatitisa C
HIV	virus humane imunodeficijencije, engl. *human immunodeficiency virus*
IgG	imunoglobulin G
IgG4	imunoglobulin G subklase 4
ISTH	Internacionalno društvo za trombozu i hemostazu, engl. *International Society on Thrombosis and Haemostasis*
ITI	indukcija imune tolerancije, engl. *immune tolerance induction*
LRP	protein srodan receptoru za lipoprotein male gustoće, engl. *low-density-lipoprotein receptor-related protein*
mAPTV	modificirani APTV
MHC	antigen glavnog sustava histokompatibilnosti, engl. *major histocompatibility complex*
NBU	Nijmegen-Bethesda jedinica (jedinica za titar inhibitora)
PAI-1	inhibitor aktivatora plazminogena 1
PAI-2	inhibitor aktivatora plazminogena 2
PCR	lančana reakcija polimeraze, engl. *polymerase chain reaction*
PPP	plazma siromašna trombocitima, engl. *platelet poor plasma*
PRP	plazma bogata trombocitima, engl. *platelet rich plasma*
PV	protrombinsko vrijeme
RFLP	polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata, engl. *restriction fragment length plymorphisms*
rFVIIa	aktivirani rekombinantni faktor VII
rFVIII	rekombinantni faktor VIII

ROC	ROC analiza, engl. *Receiver Operating Characteristic*
SSC	Znanstveni pododbor, engl. *Scientific and Standardisation Committee*
TAFI	trombinom aktivirani inhibitor fibrinolize
TAFIa	aktivirani oblik trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize
TAFIa/TAFIai	koncentracija aktivnog i inaktiviranog oblika trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize
TF	tkivni faktor
TFPI	inhibitor puta tkivnog faktora, engl. *tissue factor pathway inhibitor*
TGT	analiza stvaranja trombina, engl. *thrombin generation test*
TNF	faktor nekroze tumora, engl. *tumor necrosis factor*
t-PA	tkivni aktivator plazminogena
u-PA	urokinazni aktivator plazminogena
VWD	von Willebrandova bolest, engl. *von Willebrand disease*
VWF	von Willebrandov faktor, engl. *von Willebrand factor*
VWF:Ag	antigena koncentracije von Willebrandovog faktora
VWF:RCo	ristocetin kofaktorska aktivnost von Willebrandovog faktora

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. Hemofilija A – uvodni dio....1

1.2. Podjela hemofilije A....1

1.3. FVIII i njegova uloga u sustavu zgrušavanja....2

1.4. Fibrinolitički sustav....6

1.5. Molekularne osnove i nasljeđivanje kod hemofilije A....9

1.6. Klinička slika kod bolesnika s hemofilijom A....11

1.7. Liječenje bolesnika s hemofilijom A i komplikacije kod liječenja....14

1.8. Fenotipske heterogenosti kod hemofilije A....20

1.9. Laboratorijska dijagnostika hemofilije A....21

1.9.1. Standardne laboratorijske metode....21

1.9.1.1. Mjerenje aktivnosti FVIII....21

1.9.1.2. Određivanje inhibitora na FVIII....22

1.9.2. Nove laboratorijske metode....23

1.9.2.1. Analiza reakcijske krivulje APTV-a (engl. *waveform analysis*)....23

1.9.2.2. Analiza stvaranja trombina (engl. *thrombin generation test*, TGT)....24

1.9.2.3. Automatizirana tromboelastografija (engl. *thromboelastography*)....26

1.9.3. Molekularna dijagnostika hemofilije A....27

2. OBRAZLOŽENJE TEME....29

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA....30

4. MATERIJAL I METODE....31

4.1. Ispitanici i uzorci....31

4.2. Metode....31

4.2.1. Mjerenje aktivnosti FVIII....31

4.2.1.1. Koagulacijska metoda (FVIIIkgl)....31

4.2.1.2. Kromogena metoda (FVIIIch)....33

4.2.2. Dokazivanje prisutnosti inhibitora na FVIII i kvantitativno mjerenje titra inhibitora (Nijmegen modifikacija Bethesda metode)....34

4.2.3. Analiza reakcijske krivulje APTV-a....35

4.2.4. Analiza stvaranja trombina....37

4.2.5. Kromogena metoda za mjerenje aktivnosti FXIII....40

4.2.6. Enzim-imunofluorescencijska metoda za mjerenje koncentracije antigena

VWF (VWF:Ag).....41
4.2.7. Aglutinacijska metoda za mjerenje aktivnosti VWF (VWF:RCo).....41
4.2.8. Enzim-imunokemijska metoda (ELISA) za mjerenje koncentracije protrombinskog fragmenta 1+2 (F1+2).....42
4.2.9. Kromogena metoda za mjerenje aktivnosti inhibitora aktivatora plazminogena 1 (PAI-1).....42
4.2.10. Kromogena metoda za mjerenje aktivnosti plazminogena.....43
4.2.11. Kromogena metoda za mjerenje aktivnosti inhibitora plazmina.....43
4.2.12. Kromogena metoda za mjerenje aktivnosti trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize (TAFI).....44
4.2.13. Enzim-imunokemijska metoda (ELISA) za mjerenje koncentracije aktivnog i inaktiviranog oblika trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize (TAFIa/TAFIai).....44
4.2.14. Dokazivanje polimorfizama FVG1691A i FIIG20210A.....45
4.3. Statistička analiza.....46

5. REZULTATI.....48
5.1. Klinička obilježja bolesnika s hemofilijom A.....48
5.2. Prokoagulacijski i fibrinolitički čimbenici.....53
5.3. Usporedba mjerenja aktivnosti FVIII koagulacijskom i kromogenom metodom.....56
5.4. Rezultati dokazivanja prisutnosti inhibitora na FVIII i kvantitativnog mjerenja titra inhibitora.....59
5.5. Rezultati analize reakcijske krivulje APTV-a.....59
5.6. Rezultati analize stvaranja trombina.....69
5.7. Povezanost prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika s endogenim trombinskim potencijalom.....78
5.8. Povezanost prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika s kliničkim izražajem kod hemofilije A.....80
5.9. Utjecaj polimorfizama FVG1691A i FIIG20210A na endogeni trombinski potencijal i klinički izražaj kod hemofilije A.....85
5.10. Utjecaj krvne grupe na endogeni trombinski potencijal i klinički izražaj kod hemofilije A.....88

6. RASPRAVA.....93

7. ZAKLJUČCI.....104

POPIS LITERATURE.....107

ŽIVOTOPIS AUTORA 116

POPIS OBJAVLJENIH DJELA.....117

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....118

BASIC DOCUMENTATION CARD.....119

1. UVOD

1.1. Hemofilija A – uvodni dio

Hemofilija A je rijetki nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi koji nastaje zbog potpunog ili djelomičnog manjka koagulacijske aktivnosti faktora zgrušavanja VIII (FVIII) u cirkulaciji, kao posljedica mutacije u genu za FVIII. Naziv bolesti potječe od grčkih riječi *haima,* koja znači krv, te *philein,* koja znači voljeti. Hemofilija A je drugi po učestalosti nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi (iza von Willebrandove bolesti), s incidencijom 1 na 5000 novorođene muške djece (ili 1 na 10000 ukupno rođene djece). Rasprostranjena je jednakomjerno po cijelom svijetu i zahvaća u jednakoj mjeri sve rase. Glavni simptom hemofilije A su prekomjerna, opetovana krvarenja u različite dijelove tijela, čija učestalost i intenzitet koreliraju s ostatnom aktivnošću FVIII (1-3).

Prvi zapisi o hemofiliji potječu iz 2. stoljeća naše ere, iz vremena kada su rabini primijetili da neka muška djeca produljeno krvare prilikom obrezivanja, što je tumačeno kao poremećaj vaskularnog sustava. Tana'im opisuje sljedeće: "Ako majka dadne obrezati prvog sina i on umre, zatim drugog sina, koji također umre, tada ona ne smije dati obrezati trećeg sina". Tek početkom 19. stoljeća američki liječnik Otto opisuje hemofiliju kao poremećaj u sastavu krvi od kojeg obolijevaju muškarci, a prenose ga zdrave žene (4). Sredinom 19. stoljeća pokazano je da postoje najmanje dva tipa hemofilije, uzrokovana manjkom FVIII (hemofilija A) i faktora zgrušavanja IX (FIX, hemofilija B), koji se klinički ne mogu razlikovati. Hemofilija je nazvana i "kraljevskom bolešću" zahvaljujući britanskoj kraljici Viktoriji s kraja 19. stoljeća koja je kao zdravi prenositelj bolesti prenijela bolesni gen za FVIII na sina Leopolda, koji je umro u 31. godini od cerebralnog krvarenja nakon pada, te na dvije kćeri. One su preko svojih kćeri koje su se udale na ruski, španjolski i pruski dvor prenijele bolest u njihove kraljevske obitelji (2,5,6).

1.2. Podjela hemofilije A

Glavni simptom hemofilije A je povećana sklonost krvarenjima. Intenzitet i učestalost krvarenja najčešće su u izravnoj ovisnosti o stupnju manjka aktivnosti FVIII. Stoga je i preporuka Znanstvenog pododbora za FVIII i FIX (engl. *Scientific and Standardisation Committee, SSC*) Međunarodnog društva za trombozu i hemostazu (engl. *International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH*) da se podjela hemofilije A temelji na izmjerenoj ostatnoj aktivnosti FVIII u krvi, a ne na temelju kliničkih pokazatelja. Teški oblik

hemofilije A definiran je aktivnošću FVIII<0,01 kIU/L, umjereni oblik aktivnošću FVIII između 0,01 i 0,05 kIU/L i blagi oblik aktivnošću FVIII >0,05 do 0,40 kIU/L. (7,8). Teški oblik čini oko 50% ukupnih slučajeva hemofilije A, a karakteriziran je čestim (obično više puta mjesečno), spontanim krvarenjima, najčešće u zglobove, koja se javljaju već od ranog djetinjstva. Kod umjerenog oblika bolesti (otprilike 10% slučajeva hemofilije A) spontana krvarenja su rijetka, dok se bolesnici oboljeli od blagog oblika bolesti (oko 40% slučajeva hemofilije A) nerijetko otkriju tek slučajno, rutinskim pregledom krvi ili zbog produljenog krvarenja nakon kirurškog zahvata (Tablica 1.1). (1,3,5,9).

Tablica 1.1 Podjela hemofilije A i klinički pokazatelji.

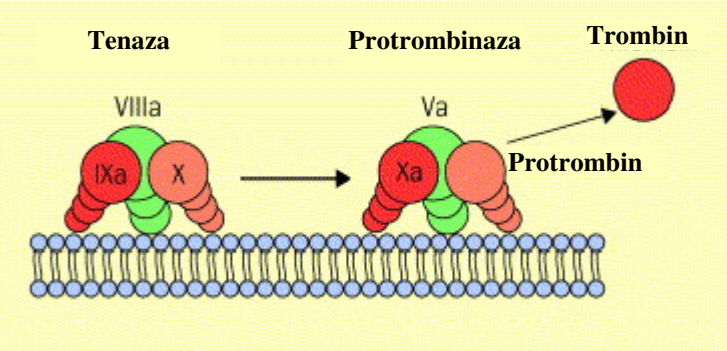
Hemofilija A	**FVIII (kIU/L)**	**Klinički pokazatelji**
Teški oblik	<0,01	spontana krvarenja u zglobove već od ranog djetinjstva
Umjereni oblik	0,01 - 0,05	krvarenja sekundarno (trauma, kirurški zahvat) rijetko spontano
Blagi oblik	>0,05 - 0,40	krvarenja samo sekundarno

Novije epidemiološke studije ukazuju na velike razlike u učestalosti pojedinih oblika hemofilije A u različitim zemljama, ovisno najviše o njihovom ekonomskom statusu. U bogatijim zemljama, s razvijenijom dijagnostikom hemofilije A, otkriva se veći broj slučajeva s blagim oblikom bolesti nego što je to slučaj u siromašnim zemljama gdje se takvi bolesnici otkrivaju rijetko, obično zbog produljenog krvarenja nakon kirurškog zahvata. Stoga je u bogatijim zemljama udio blage hemofilije A prema teškom obliku 34% prema 43%, dok je, primjerice, u Kini učestalost blagog oblika bolesti samo 16%. Najviši udio blagog oblika bolesti (51%) naveden je u Kanadskom registru hemofilije (engl. *Canadian Hemophilia Registry*) (7,10).

1.3. FVIII i njegova uloga u sustavu zgrušavanja

Sustav zgrušavanja se normalno provodi kroz seriju uzastopnih enzimskih reakcija u kojima FVIII čini jednu od ključnih komponenti unutarnjeg puta. U plazmi je prisutan u izrazito niskoj koncentraciji (0,2 mg/L), dovoljnoj za optimalnu prokoagulacijsku aktivnost. U svom aktiviranom obliku (FVIIIa) služi kao kofaktor serinskoj proteazi, aktiviranom FIX (FIXa),

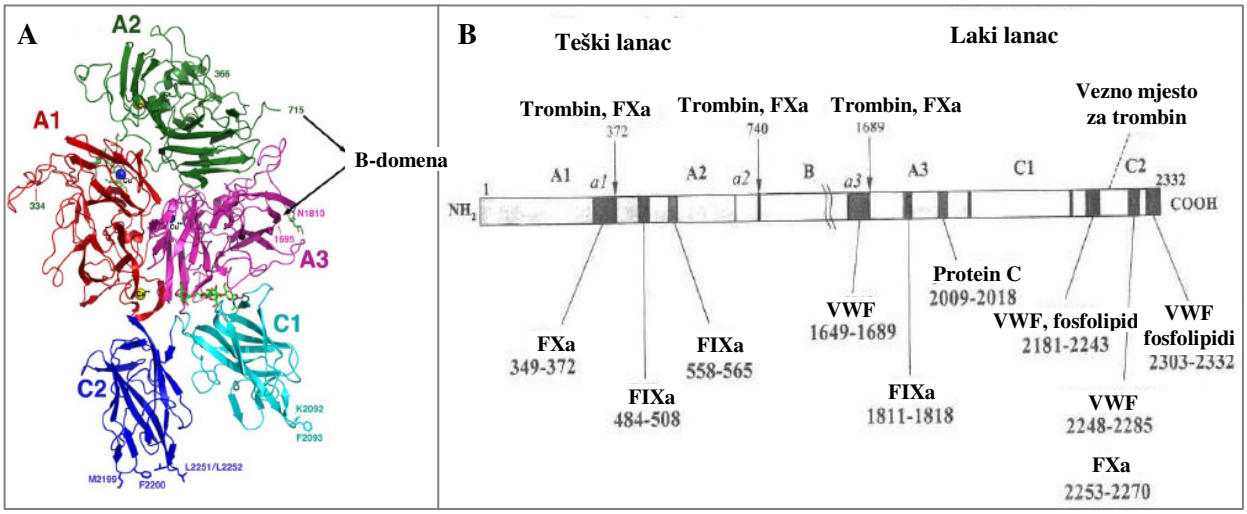
višestruko povećavajući njegovu katalitičku aktivnost, tj. brzinu reakcije aktivacije faktora X u aktivni oblik FXa (200 000x) (11). FXa sudjeluje u daljnjim reakcijama pretvorbe zimogena protrombina u trombin, ključne molekule u sustavu zgrušavanja potrebne, između ostalog, za konačni nastanak fibrina (Slika 1.1). Kompleks tenaze, kako se još naziva kompleks FVIIIa i FIXa, vezan je preko kalcijevih iona na fosfolipidne membrane aktiviranih trombocita. Upravo su aktivirani trombociti zaslužni za lokalizaciju ovih koagulacijskih reakcija na mjestu ozljede krvne žile, a fosfolipidni dvosloj za optimalnu prostornu orijentaciju pojedinih komponenti kompleksa tenaze. Spomenuto snažno ubrzavanje koagulacijskih reakcija preko interakcija ovisnih o FVIII nužno je za normalno provođenje koagulacijskog procesa *in vivo* pa svaka promjena u funkciji FVIII dovodi do poremećaja zgrušavanja, tj. razvoja hemofilije A (1,12,13).



Slika 1.1 Uloga FVIII u sustavu zgrušavanja (kompleks tenaze) (14).

Tijekom posljednjih desetljeća, nakon izdvajanja pročišćenog proteina FVIII (1983.) te kloniranja gena za FVIII (1982.-1984.), značajno je unaprijeđeno razumijevanje strukture i funkcije proteina i gena za FVIII. Prethodnik proteina FVIII (2351 aminokiselina) sintetizira se najvećim dijelom u hepatocitima i ima molekularnu masu 293 kDa. Odcjepljenjem signalnog peptida nastaje zreli jednolančani protein (2332 aminokiseline) koji se sastoji od 3 homologne domene A, dvije homologne domene C i jedinstvene, ugljkohidratima bogate domene B, raspoređene prema redoslijedu A1-A2-B-A3-C1-C2, kako je prikazano na slici 1.2. FVIII pokazuje visok stupanj homologije s faktorom V (FV) i ceruloplazminom (domene A i C). Uloga vezujuće domene B nije ključna za koagulacijsku funkciju FVIII i aktivacijom FVIII dolazi do njenog odcjepljenja. Prije lučenja FVIII u plazmu dolazi do proteolitičkog cijepanja na veznom mjestu između domena B i A3, te višestrukih proteolitičkih cijepanja unutar domene B (1,11,13,15), čime nastaje heterodimerna struktura FVIII (Slika 1.3). Ova heterodimerna struktura FVIII sastoji se od teškog lanca (A1-A2-B domene) i lakog lanca

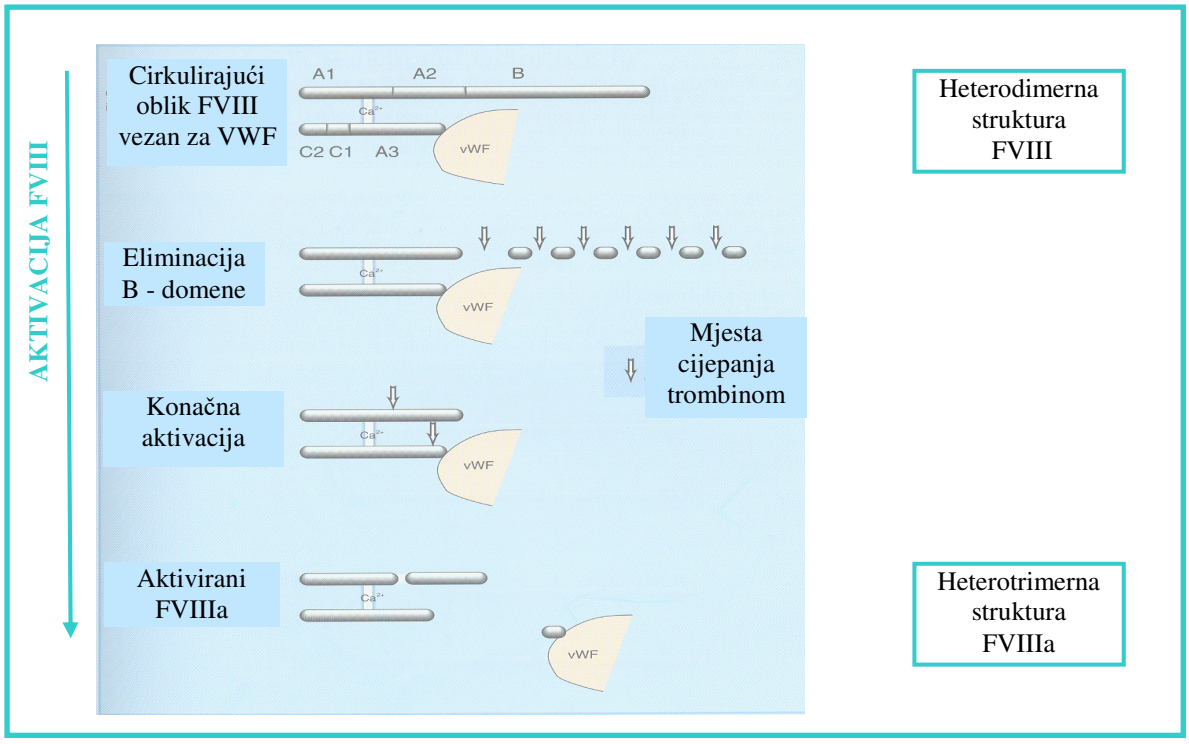
(A3-C1-C2 domene) koji su međusobno povezani preko dvovalentnoga metalnog iona. Neposredno nakon otpuštanja u cirkulaciju FVIII se nekovalentnom vezom (elektrostatske i hidrofobne interakcije) veže na von Willebrandov faktor (VWF) preko regija na lakom lancu, pretežno na domeni C2 (Slika 1.2B). Godinama se smatralo da se radi o jednom proteinu, ali se danas zna da je VWF zaseban protein kojeg sintetiziraju endotelne stanice jetre i megakariociti, kao podjedinice molekularne mase od oko 220 kDa, čijim povezivanjem nastaje multimerni oblik VWF (15 000 kDa), proteinski nosač FVIII. Vezanje FVIII na VWF je nužno za održavanje normalne koncentracije i funkcije FVIII u cirkulaciji, jer onemogućuje prerano vezanje (prije aktivacije trombinom) FVIII u kompleks tenaze, ali i štiti labilni FVIII od prerane proteolitičke inaktivacije djelovanjem aktiviranog proteina C (APC), FIXa i FXa. Važnost vezanja FVIII na VWF potvrđuje činjenica da manjak VWF uzrokuje sekundarni manjak FVIII, koji se nalazi kod von Willebrandove bolesti (engl. *von Willebrand disease*, VWD).



Slika 1.2 Prostorna struktura FVIII (A). Shematski prikaz domena s glavnim funkcionalnim veznim mjestima u proteinu FVIII (B) (1,11).

Na mjestu ozljede krvne žile i aktivacije sustava zgrušavanja, FVIII se aktivira djelovanjem dva fiziološka aktivatora: trombina i FXa. Obje proteaze cijepaju FVIII na istim mjestima, Arg372 i Arg740 unutar teškog lanca te Arg1689 unutar lakog lanca, pri čemu nastaje heterotrimerna struktura aktiviranog FVIIIa, koja se sastoji od fragmenata A1, A2 i A3-C1-C2, (Slika 1.3). Domene A1 i A3 zadržavaju interakciju preko metalnog iona, te je ova dimerna struktura mnogo slabijim, elektrostatskim interakcijama povezana s podjedinicom A2. Cijepanje na poziciji Arg1689 omogućava odcjepljenje FVIIIa od VWF. Nastankom

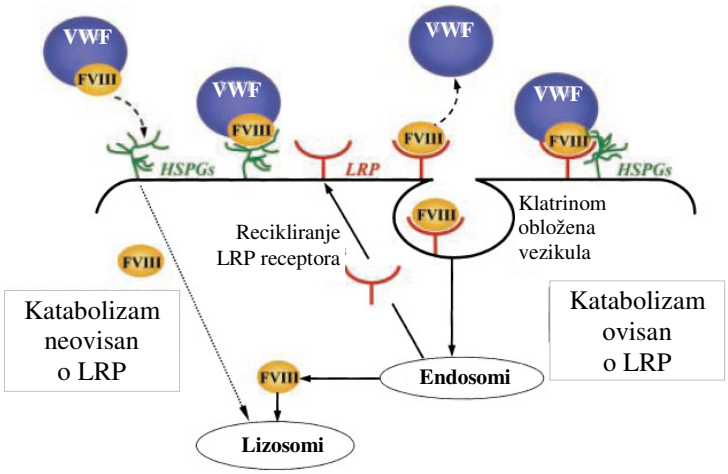
prvih količina trombina, nakon početne faze aktivacije vanjskog puta zgrušavanja, događa se početna aktivacija FVIII u FVIIIa koja nije dovoljna za održavanje hemostaze jer vanjski put biva brzo inhibiran djelovanjem inhibitora puta tkivnog faktora (engl. *tissue factor pathway inhibitor*, TFPI). Za potpunu aktivaciju FVIII potrebna je veća količina trombina koja se razvija djelovanjem FIXa u amplifikacijskoj fazi koagulacijskih reakcija (1,13)



Slika 1.3 Shematski prikaz aktivacije heterodimera FVIII i nastanak heterotrimera FVIIIa (16).

Za potpunu funkcionalnu aktivnost FVIII nužna je nesmetana interakcija sa svim važnim ligandima, uključujući VWF kao proteinski nosač, trombin i FXa kao fiziološke aktivatore, te fosfolipide, FIXa i FX kao komponente kompleksa tenaze. Vezna mjesta na FVIII za sve navedene ligande označena su na slici 1.2B. Ključno vezno mjesto za trombin i FXa nalazi se na domeni C2, kao i prethodno spomenuto vezno mjesto za VWF. U kompleksu tenaze FVIIIa se za fosfolipide veže preko hidrofobne sekvence smještene također na domeni C2, a interakcija s FIXa se preko domena A3 i A2, pri čemu FIXa stabilizira FVIIIa u kompleksu tenaze povezujući domenu A2 s ostatkom heterotrimerne strukture FVIIIa. Ova je interakcija ključna zbog brze, spontane disocijacije podjedinice A2 s ostatka slobodne molekule FVIIIa, što je razlog izrazito kratkog poluživota FVIIIa u cirkulaciji (oko 2 min), te gubitka kofaktorne aktivnosti. FVIIIa se inaktivira i proteolitičkim cijepanjem, djelovanjem APC-a, najvažnijim mehanizmom inaktivacije koagulacijske aktivnosti FVIIIa *in vivo*. Povezivanje s

FX, kao supstratom reakcije kompleksa tenaze, provodi se preko veznog mjesta na domeni A1. Katabolizam i lučenje FVIII iz cirkulacije provodi se preko jetrenog receptora, proteina srodnog receptoru za lipoprotein male gustoće (engl. *low-density-lipoprotein receptor-related protein*, LRP). Primarno vezno mjesto za kompleks FVIII-VWF su heparan sulfat proteoglikani na površini stanica koji predočuju taj kompleks LRP-receptorima (Slika 1.4). Vezivanje kompleksa na receptor provodi se preko A2-domene FVIII, nakon čega slijedi katabolizam FVIII i recikliranje VWF. Razumijevanje ovih mehanizama upućuje na moguće načine produljenja poluživota FVIII u krvi i daje novi smjer u razvoju budućih terapijskih pripravaka FVIII (1,12,13,15).



Slika 1.4 Katabolizam FVIII preko receptora LRP (15).

1.4. Fibrinolitički sustav

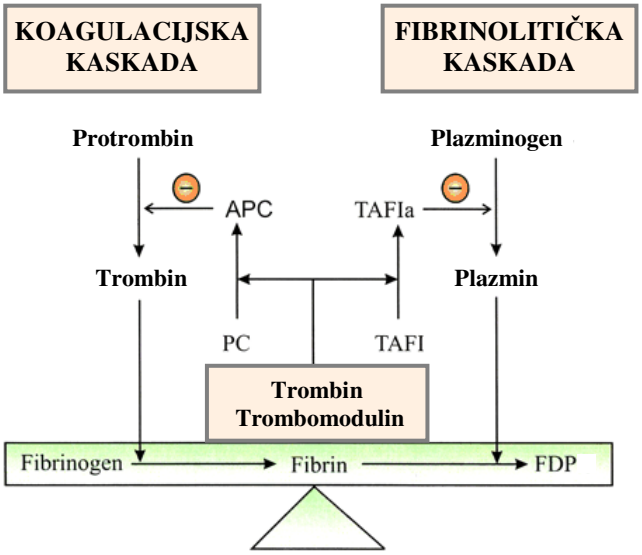
Kao rezultat aktivacije sustava zgrušavanja i nastanka trombina dolazi do pretvorbe topivog fibrinogena u netopive fibrinske niti, čijim se odlaganjem na mjestu ozljede krvne žile sprječava daljnje krvarenje te štiti organizam od gubitka krvi. Nastali fibrin služi kao supstrat, ali i kao kofaktor u aktivaciji drugog sustava, sustava fibrinolize. Ravnoteža između ova dva sustava, tj. ravnoteža između nastajanja i razgradnje fibrinskog ugruška, rezultat je regulacijskih mehanizama nastalih međudjelovanjem staničnih i nestaničnih elemenata (endotelne stanice, trombociti, koagulacijski i fibrinolitički plazmatski proteini). Gubitak ove ravnoteže rezultira patofiziološkim posljedicama koje se očituju dvojako: krvarenjem (u slučaju kada fibrinoliza prevladava nad koagulacijom) ili trombozom (u slučaju kada koagulacija prevladava nad fibrinolizom) (17).

Stvaranjem prvih količina fibrina dolazi do inicijacije sustava fibrinolize i to oslobađanjem tkivnog aktivatora plazminogena (t-PA) iz endotelnih stanica oštećene krvne žile. Dolazi do vezanja t-PA i plazminogena preko veznih mjesta za lizin na C-terminalne lizinske ostatke na

fibrinu i djelomično razgrađenom fibrinu, pri čemu nastaje tzv. ternarni kompleks. Rezultat vezanja ternarnog kompleksa je aktivacija plazminogena i nastajanje plazmina, središnjega fibrinolitičkog enzima odgovornog za razgradnju fibrina do topivih fragmenata. Aktivacija plazminogena djelovanjem t-PA u ternarnom kompleksu s fibrinom je oko 400x učinkovitija nego u otopini (kofaktorska uloga fibrina) (18). Neprekidnom razgradnjom fibrina djelovanjem plazmina dolazi do oslobađanja novih C-terminalnih lizinskih ostataka na molekuli fibrina koji djeluju kao vezna mjesta za nove molekule t-PA i plazminogena, čime se proces višestruko ubrzava i fibrinoliza prelazi iz faze inicijacije u fazu propagacije.

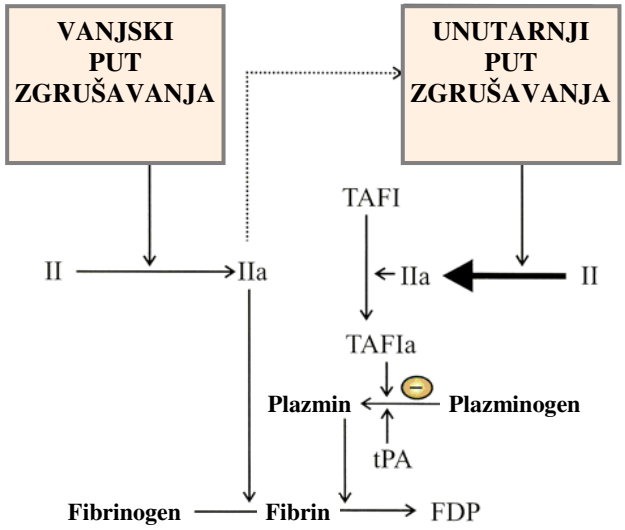
Regulacija procesa fibrinolize provodi se na najmanje 3 razine: inhibicijom proteolitičkih enzima t-PA i urokinaznog aktivatora plazminogena (u-PA) odgovornih za aktivaciju plazminogena djelovanjem inhibitora aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) i inhibitora aktivatora plazminogena-2 (PAI-2); inhibicijom već stvorenog plazmina djelovanjem inhibitora plazmina (nastaje neaktivan kompleks plazmin-inhibitor plazmina), te aktivacijom inhibitora fibrinolize aktiviranog trombinom (TAFI) u aktivni oblik, TAFIa, djelovanjem trombina nastalog tijekom procesa zgrušavanja. Mehanizam djelovanja TAFI je inhibicija propagacijske faze fibrinolize proteolitičkim cijepanjem C-terminalnih lizinskih ostataka s djelomično razgrađenog fibrina, čime se narušava kofaktorska uloga fibrina, tj. gube se vezna mjesta za t-PA i plazminogen na fibrinu (19,20).

Kao protein koji se aktivira do aktivnog enzima djelovanjem kompleksa trombin-trombomodulin, TAFI predstavlja poveznicu između koagulacijskog i fibrinolitičkog sustava (Slika 1.5). Trombomodulin, membranski protein koji se nalazi na endotelnim stanicama, vezanjem za trombin mijenja njegovu specifičnost za supstrat te tako trombin više ne prepoznaje fibrinogen kao supstrat, nego aktivira protein C i TAFI i time potiče inhibiciju koagulacije i fibrinolize.



Slika 1.5 Ravnoteža između procesa stvaranja i razgradnje fibrina (17).

Za aktivaciju TAFI potrebna je velika količina trombina, koja nastaje u fazi amplifikacije sustava zgrušavanja, djelovanjem prvih, malih količina trombina (nastalog u fazi inicijacije preko vanjskog puta zgrušavanja) na unutarnji put zgrušavanja. Pri tome svaki poremećaj u nastajanju velikih količina trombina u fazi amplifikacije može rezultirati smanjenom aktivacijom TAFI i ubrzanom fibrinolizom (Slika 1.6)

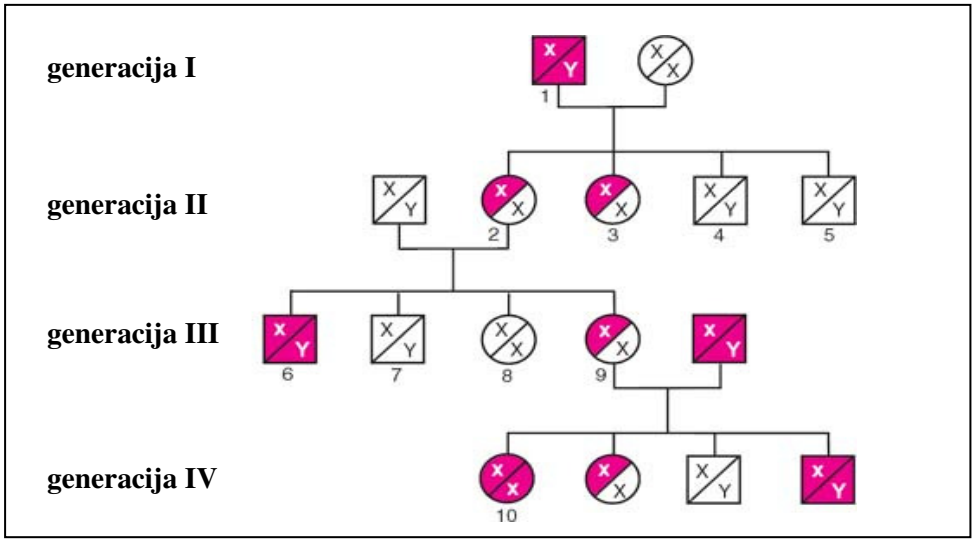


Slika 1.6 Aktivacija TAFI i inhibicija fibrinolize preko unutarnjeg puta zgrušavanja (17).

Kod hemofilije A, zbog smanjene aktivnosti FVIII i poremećenog unutarnjeg puta zgrušavanja, dolazi do usporenog nastajanja trombina, čime se remeti ovaj regulacijski mehanizam i dolazi do pojačane fibrinolize. Smatra se da ovi mehanizmi mogu imati utjecaj na težinu krvarenja i fenotipski izražaj kod hemofilije A jer utječu na stabilnost fibrinskog ugruška i njegovu razgradnju (17,20).

1.5. Molekularne osnove i nasljeđivanje kod hemofilije A

Gen odgovoran za sintezu FVIII smješten je na dugom kraku kromosoma X (Xq28), veličine je 186 kb, a sastoji se od 26 eksona koji kodiraju sintezu prethodnika jednolančanog glikoproteina FVIII. Hemofilija A je nasljedni, X-vezani recesivni poremećaj koji se očituje kod muškaraca, a prenose ga uglavnom zdrave žene. Oboljeli od hemofilije nasljeđuje kromosom X s mutiranim genom za FVIII te zdravi kromosom Y (Slika 1.7, Generacija I, broj 1). Ako bolesnik s hemofilijom i zdrava žena (s dva zdrava kromosoma X) imaju potomstvo, sve će njihove kćeri biti nositeljice mutiranog gena i prenositeljice bolesti (jer će naslijediti kromosom X s mutiranim genom za FVIII od oca i zdravi kromosom X od majke), a svi će njihovi sinovi biti zdravi i neće moći prenijeti bolest u sljedeću generaciju (jer će naslijediti zdravi kromosom Y od oca i zdravi kromosom X od majke). Dakle, sinovi bolesnika s hemofilijom su 100% zdravi (Slika 1.7, Generacija II, broj 4 i 5), dok su kćeri 100%-tne prenositeljice bolesti (Slika 1.7, Generacija II, broj 2 i 3). Većina žena nositeljica mutiranog gena za FVIII (engl. *carrier*) su klinički zdrave osobe jer imaju zdravi alel od majke. Potomci zdravog muškarca (zdravi kromosomi X i Y) i žene prenositeljice hemofilije (zdravi kromosom X i kromosom X s mutiranim genom za FVIII) su 50% bolesni (jer od oca nasljeđuju zdravi kromosom Y, a od majke mogu naslijediti ili zdravi kromosom X ili kromosom X s mutiranim genom za FVIII) (Slika 1.7, Generacija III, brojevi 6 i 7). Također, 50% kćeri će biti prenositeljice bolesti (jer od oca nasljeđuju zdravi kromosom X, a od majke mogu naslijediti ili zdravi kromosom X ili kromosom X s mutiranim genom za FVIII) (Slika 1.7, Generacija III, brojevi 8 i 9) (9,21).

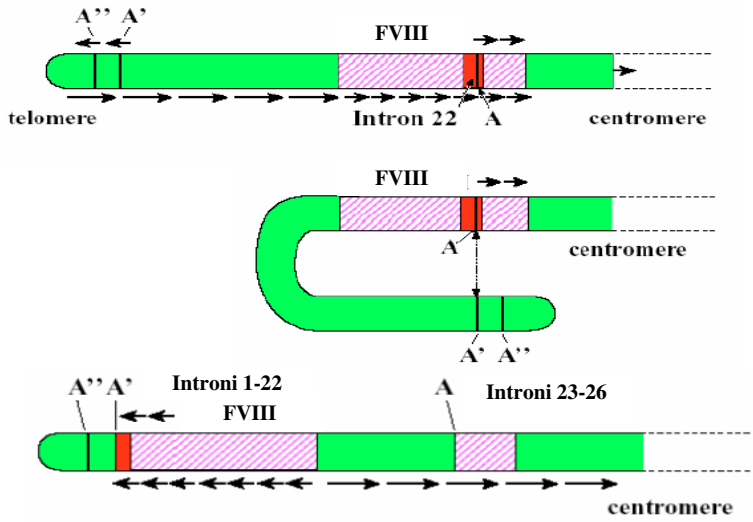


Slika 1.7 Nasljeđivanje kod hemofilije (9).

Iako je hemofilija X-vezani, recesivni poremećaj od kojeg obolijevaju muškarci, nije rijetkost da žene nositeljice mutiranog gena imaju smanjenu aktivnost FVIII u cirkulaciji. Obično se takvo smanjenje aktivnosti očituje kao menoragija, ali i produljeno krvarenje nakon kirurških zahvata ili veće traume. Izrazito rijetko žene obole od hemofilije - kćeri bolesnika s hemofilijom i majke nositeljice mutiranog gena (Slika 1.7, Generacija IV, broj 10) i imaju simptome poput oboljelih muškaraca. Također, poremećaji kao što su Turnerov (XO) sindrom, von Willebrandova bolest tipa 2N, ili stečena hemofilija mogu kod žena dovesti do značajnog sniženja aktivnosti FVIII i blažih ili težih simptoma krvarenja (5,7).

Do danas je poznato i u literaturi opisano više od 1200 različitih mutacija u genu za FVIII, odgovornih za nastanak hemofilije A, a registrirane su na internetskoj bazi podataka HAMSTeRS (engl. *International Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site*) (http://europium.csc.mrc.ac.uk) (22). Mutacije se mogu kategorizirati u tri skupine: velike preuredbe gena, manje ili veće insercije i delecije, te točkaste mutacije (pogrešne ili besmislene, engl. *missense* ili *nonsense*) kojih ima najviše i dokazane su u svih 26 eksona. Svi tipovi mutacija mogu prouzročiti teški oblik hemofilije A, a najznačajnije i najučestalije su inverzija introna 22 i introna 1, odgovorne za 45-50%, odnosno 2% slučajeva teške hemofilije A. Slika 1.8 predstavlja shematski prikaz inverzije introna 22 kod kojeg dolazi do prijeloma gena za FVIII u intronu 22 te se dio gena od introna 1 do introna 22 prebacuje na telomerni kraj kromosoma, u obrnutom smjeru (inverzija). Takav se gen ne prepisuje, nema sinteze proteina, koncentracija i aktivnost FVIII u plazmi je nemjerljiva i osobe razvijaju teški oblik hemofilije A. Većina točkastih mutacija u genu za FVIII opisana je samo jedanput, iako ima

slučajeva mutacija koje se češće pojavljuju. Točkaste su mutacije često povezane s varijabilnim kliničkim fenotipom. Gotovo sve opisane mutacije kod blagog oblika hemofilije A su pogrešne točkaste mutacije i do danas ih je opisano preko 200 (7,23). Mogu se podijeliti u dvije skupine: mutacije koje rezultiraju kvantitativno normalnom sintezom disfunkcionalnog proteina FVIII koji se održava u cirkulaciji u stabilnom obliku (mutacije na mjestu cijepanja i aktivacije trombinom, mutacije na veznom mjestu za fosfolipide, mutacije na mjestu odgovornom za interakciju s FIXa) i mutacije kod kojih su i sinteza i aktivnost proteina FVIII smanjeni (mutacije vezane za sintezu i lučenje proteina u cirkulaciju, mutacije koje mijenjaju sposobnost vezanja FVIII na VWF, mutacije koje smanjuju stabilnost FVIII u cirkulaciji zbog ubrzane disocijacije domene A2 (23). Besmislene točkaste mutacije obično su povezane s teškim oblikom bolesti, kao i insercije i delecije kod kojih dolazi do pomaka okvira čitanja (engl. *frameshift*). Konačno, opisane su i mutacije u mjestu povezivanja eksona (engl. *splice-site mutation*) koje su također najčešće povezane s teškim oblikom bolesti. U oko 70% bolesnika potvrđuje se nasljeđivanje mutacije u obitelji, dok otprilike jedna trećina bolesnika s hemofilijom, iz obitelji s negativnom anamnezom, imaju mutacije *de novo* (5,12,24-26).



Slika 1.8 Shematski prikaz inverzije introna 22 u genu za FVIII (26).

1.6. Klinička slika kod bolesnika s hemofilijom A

Kao što je navedeno u poglavlju 1.2. i u tablici 1.1 glavni simptom hemofilije A je povećana sklonost krvarenjima čiji intenzitet ovisi o aktivnosti FVIII u krvi.

Kod teškog oblika bolesti tipična je pojava spontanih krvarenja ili krvarenja zbog neznatne traume, u velike zglobove, ili nastaju duboki intramuskularni hematomi, često i više puta

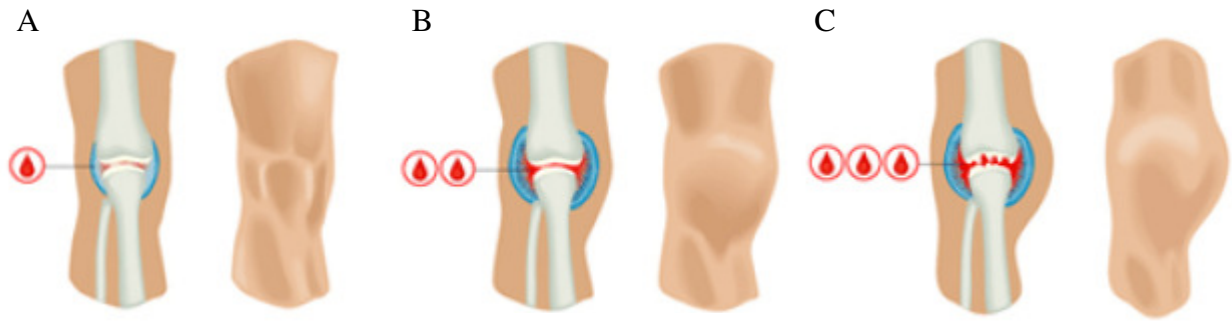
mjesečno. Kao rezultat opetovanih krvarenja razvijaju se promjene lokomotornog sustava s teškom invalidnošću. Krvarenja ne prestaju samostalno i zahtijevaju nadomjesnu terapiju FVIII, izrazito su bolna, praćena su gubitkom krvi i nerijetko potrebom za transfuzijama krvnih pripravaka. I najmanje ozljede, kao što su porezotine, mogu dovesti do nekontroliranog krvarenja koje može trajati tjednima. Čak i najjednostavniji kirurški zahvati kao što je npr. vađenje zuba, praćeni su visokim rizikom od krvarenja i zahtijevaju prethodnu pripremu nadomjesnom terapijom. Prije uvođenja nadomjesne terapije mnoga su djeca oboljela od hemofilije umirala zbog slučajnog ugriza za jezik ili usnice, ili nakon vađenja zuba (6). Kod teške hemofilije krvarenja se nerijetko javljaju već kod poroda, posebno kod kompliciranog poroda, u obliku krvarenja u unutarnje, vitalne organe, a rjeđe kao intrakranijalna krvarenja. Kod novorođenčadi se može pojaviti i krvarenje iz pupka ili krvarenje nakon uzimanja krvi. Ukoliko u novorođenačkoj dobi nije dijagnosticirana bolest, tipični period pojave krvarenja je druga polovina dojenačke dobi u kojoj dijete počinje puzati i kretati se te je izloženo većim ili manjim traumama. U toj dobi javljaju se prva krvarenja u koljena, krvarenja u usta, hematomi glave, a nakon traume glave i intrakranijalna krvarenja. Kako dijete raste i razvija se spontana su krvarenja sve češća, osim ako je dijete na preventivnoj nadomjesnoj terapiji pripravcima FVIII (1,3,27).

Kod umjerenog oblika hemofilije A spontana krvarenja su rijetka, a najčešće se javljaju zbog minimalne traume ili kiruršog zahvata. Bez liječenja, krvarenje je dugotrajno, a simptomi i komplikacije krvarenja identični su onima kod teškog oblika bolesti. Bolest se obično dijagnosticira u dobi od 5. do 6. godine života. Učestalost krvarenja je obično jedanput mjesečno do jedanput u 3 mjeseca (1,3,27,28).

Blagi oblik hemofilije A često se otkrije tek u odrasloj dobi, krvarenja se javljaju samo sekundarno, zbog traume ili kirurškog zahvata. Međutim, ukoliko bolest nije prepoznata, krvarenja mogu biti toliko opsežna da ugrožavaju život bolesnika, kao što je to slučaj kod teškog oblika bolesti (1,3,7,10,27,28).

Tipični oblik krvarenja kod hemofilije je krvarenje u velike zglobove, najčešće koljena, lakat, gležanj, kuk, rameni i ručni zglob. Krvarenje potječe iz krvnih žila sinovije i u akutnoj fazi sinovijalni prostor je proširen i ispunjen krvlju (Slika 1.9A). Klinički, početak akutne faze krvarenja praćen je blagim osjećajem nelagode (*aura*) i blagim ograničenjem pokretljivosti zgloba. Kako se zglob puni krvlju, dolazi do oticanja zgloba te zglob postaje bolan i vruć. Zbog zadržavanja krvi u sinovijalnom prostoru, uzrokovanog učestalim i opetovanim krvarenjima, dolazi do razvoja kronične upalne reakcije na sinovijalnoj membrani zgloba te hiperplazije sinovijalne membrane, što dalje potiče naticanje, napetost i bol u zglobu, tijekom

idućih mjeseci (Slika 1.9B). Nažalost, ovi se patološki procesi nastavljaju i nakon prestanka krvarenja. Terminalna faza - kronična hemofilična artropatija (Slika1.9C), karakterizirana je teškim ili potpunim ograničenjem pokretljivosti zgloba, trajnim i nepovratnim oštećenjem zglobne hrskavice, kroničnim promjenama na kosti kao što su nekroza i pojava cisti, te oštećenjem mišića. (1,3,9,13).



Slika 1.9 Razvoj hemofilične artropatije u zglobu koljena bolesnika s hemofilijom A zbog ponavljanih krvarenja: početno krvarenje i pojava krvi u zglobu (A), kronična upalna reakcija u zglobu (B), trajno oštećenje zglobne hrskavice (C) (9).

Osim krvarenja u zglobove, kod hemofilije se javljaju i druge tipične lokalizacije krvarenja: krvarenja u mišiće, intracerebralna krvarenja, hematurije, krvarenja iz probavnog sustava, te krvarenja kod vađenja zuba.

Krvarenja u mišiće su česta kod teškog oblika hemofilije (oko 30%). Manja krvarenja spontano prestaju i krv se resorbira, ali kod većih krvarenja zbog pritiska na okolno tkivo dolazi do težih posljedica. Krvarenja u mišić *iliopsoas* često su opsežna te uzrokuju jaku bol i oštećenje mišića i femoralnog živca. Rezultat je rotacija (fleksija) kuka i neurološki simptomi kod oko 37% bolesnika (1,5,9).

Intracerebralna krvarenja su najčešći uzrok smrti kod hemofilije, a mogu se pojaviti spontano ili nakon neznatne traume. U slučaju traume glave kod bolesnika s teškim oblikom hemofilije A nužna je hitna primjena nadomjesne terapije faktorom FVIII (1,5,6).

Spontana hematurija je relativno česta kod teškog oblika hemofilije A. Obično je bezbolna i prestaje bez primjene terapije. U slučaju da ne prestaje nakon nekoliko dana, potrebno je uvesti nadomjesnu terapiju (1,5).

Višestruka krvarenja na istom mjestu te neodgovarajuće liječenje mogu rezultirati nastankom pseudotumora, kapsuliranog hematoma koji vremenom progresivno raste i pritišće okolne

strukture. Kirurško liječenje pseudotumora je izrazito teško i rizično. Danas je uz odgovarajuće liječenje hemofilije nastanak pseudotumora ipak rijetkost.

1.7. Liječenje bolesnika s hemofilijom A i komplikacije kod liječenja

Liječenje bolesnika s hemofilijom A osniva se na nadomjesnoj terapiji pripravcima FVIII. Tijekom posljednjih trideset godina dogodila se prekretnica u liječenju bolesnika s hemofilijom A, razvojem pročišćenih koncentrata FVIII dobivenih iz ljudske plazme, kao i proizvodnjom rekombinantnih pripravaka ljudskog FVIII. Dok su nekada bolesnici s teškim oblikom hemofilije A umirali u ranom djetinjstvu, danas se očekivana duljina života dječaka s teškim oblikom hemofilije A gotovo ne razlikuje od normalne (1). U švedskom nacionalnom registru uzroka smrti navodi se očekivana duljina života za bolesnike s teškom hemofilijom: u periodu od 1831. do 1920. ona je iznosila 11,4 godina; u periodu od 1921. do 1960. 20 godina; u periodu od 1961. do 1980. 56,8 godina. Nažalost, prema Američkom centru za hemofiliju, zbog epidemije AIDS-a 80-ih godina prošlog stoljeća, očekivana duljina života je pala na 49 godina (13,29).

Pool i sur. su 1964. godine objavili da se krioprecipitacijom svježe smrznute plazme dobije koncentrat FVIII, specifičniji i djelotvorniji pripravak od svježe plazme u liječenju hemofilije A (30). Prvi su krioprecipitati imali nisku aktivnost FVIII (0,1 do 0,5 U/mg proteina) i sadržavali su i druge proteine plazme (fibrinogen i fibronektin), a kasnije su razvijeni pročišćeni, djelotvorniji pripravci s aktivnošću FVIII i do 15 U/mg ukupnih proteina. Svi su ti pripravci proizvedeni iz većeg broja prikupljenih plazmi davatelja (2000 – 200 000) te su stoga doveli do dramatičnoga neželjenog učinka – prijenosa virusa hepatitisa B i C, a kasnije i virusa HIV-a. Posljedica je visoki postotak bolesnika s hemofilijom (posebno starije dobi) zaraženih virusima hepatitisa B (HBV) i C (HCV), a u svijetu i virusom HIV-a, dok je u Hrvatskoj, nasreću, infekcija virusom HIV-a mala. Godine 1992. u svijetu je više od 1600 bolesnika s hemofilijom A bilo zaraženo virusom HIV-a, a dvije trećine je u kasnijim godinama umrlo (6,13). Iako su kasnije, uvođenjem virusne inaktivacije koncentrata FVIII kao i uvođenjem osjetljivijih laboratorijskih metoda pretraživanja krvi darivatelja na spomenute viruse, dobiveni sigurniji pripravci, i dalje njihovom uporabom nije potpuno isključen rizik prijenosa određenih uzročnika. To se ponajprije odnosi na termorezistentni parvovirus B19 i prione, uzročnike Creutzfeldt-Jakobove bolesti (1,29,31,32). Danas se svi dječaci oboljeli od hemofilije cijepe protiv hepatitisa B, a oni koji su već primali pripravke dobivene iz ljudske plazme redovito se testiraju na biljege hepatitisa i HIV-a.

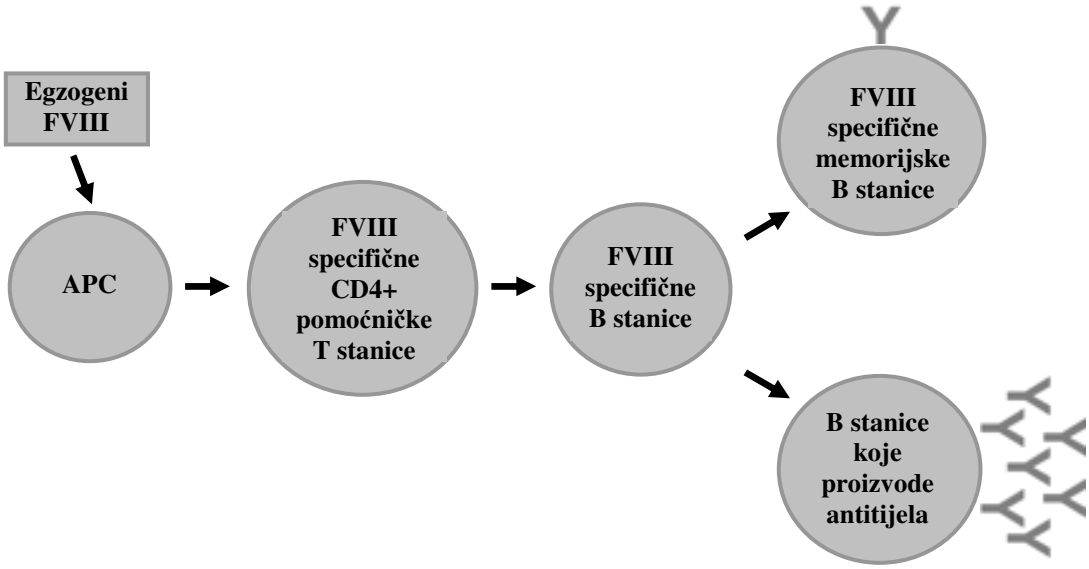
Razvojem molekularnih tehnologija 90-ih godina prošlog stoljeća pripravljeni su rekombinantni pripravci FVIII (rFVIII). Prva generacija pripravaka rFVIII (Kogenate, Bayer HealthCare, Njemačka; Recombinate, Baxter, SAD) sadržavala je ljudski albumin kao stabilizator, a u proizvodnji su korišteni i neki životinjski proteini (kao medij u staničnim kulturama). U proizvodnji druge generacije pripravaka rFVIII umjesto albumina kao stabilizator je korištena saharoza ili neki drugi stabilizator koji nije ljudskog podrijetla (Kogenate FS, Bayer HealthCare, Njemačka), ali su i dalje korišteni životinjski proteini kao medij u staničnim kulturama. Također su proizvedeni pripravci rFVIII kojemu nedostaje domena B koja nije nužna za koagulacijsku aktivnost FVIII (engl. *B-domain deleted recombinant FVIII molecule,* BDDrFVIII)(ReFacto, Genetics Institute, SAD). Najnovija, treća generacija pripravaka ne sadržava proteine ljudskoga niti životinjskog podrijetla (Advate, Baxter, SAD) (1,29,33).

Uporabom rekombinantnih pripravaka FVIII postignuta je, uz visoku učinkovitost u liječenju hemofilije A, izrazito visoka razina sigurnosti od mogućeg prijenosa virusnih infekcija. Dapače, primjena pripravaka treće generacije koji ne sadržavaju proteine ljudskog i životinjskog podrijetla potpuno je isključila tu mogućnost. Veliki izazov u liječenju hemofilije A danas, međutim, ostaje druga velika komplikacija liječenja hemofilije A, a to je razvoj alogenih antitijela (inhibitora) na FVIII (33,34).

Inhibitori na FVIII su antitijela koja se javljaju kao posljedica nadomjesne terapije kod oko 20-30% bolesnika s teškim oblikom hemofilije A. To su poliklonska antitijela klase IgG, najčešće subklase IgG4, usmjerena prema epitopima u molekuli FVIII koji su uključeni u interakcije bitne za njegovu koagulacijsku aktivnost (35). Antitijela koja se razvijaju prema epitopima nebitnima za koagulacijsku aktivnost FVIII su ne-inhibicijska antitijela, a njihova uloga *in vivo* nije do kraja razjašnjena (36). Izgleda da i ona mogu smanjiti odgovor organizma na nadomjesnu terapiju ubrzavanjem klirensa FVIII (37). Iako rijetko (4-6%), inhibitori se mogu pojaviti i kod umjerene i blage hemofilije A. Nastaju kao odgovor na egzogeni FVIII, ali mogu križno reagirati s endogenim FVIII i tako dovesti do nastanka fenotipa teške hemofilije (38). Kod bolesnika s inhibitorima daljnja terapija pripravcima FVIII je nedjelotvorna jer inhibicijska antitijela brzo inaktiviraju egzogeni FVIII i bolesnik nastavlja neprekidno krvariti usprkos terapiji (1,5,34,39). Prema preporuci SSC-a za FVIII i FIX ISTH-a inhibitori na FVIII dijele se na inhibitore s niskim odgovorom (engl. *low response inhibitors*) i inhibitore s visokim odgovorom (engl. *high response inhibitors*) (40). Antitijela s trajnom aktivnošću <5 NBU/mL (Nijmegen-Bethesda jedinica) usprkos

nadomjesnoj terapiji definiraju se kao inhibitori s niskim odgovorom, a antitijela s aktivnošću >5 NBU/mL kod bilo kojeg mjerenja definiraju se kao inhibitori s visokim odgovorom.

Usprkos dugogodišnjem intenzivnom istraživanju, pitanje uzroka nastanka inhibitora kod nekih bolesnika ostalo je velikim dijelom nerazjašnjeno (41). Proces stvaranja inhibicijskih antitijela prema egzogenom FVIII uključuje T-limfocite, B-limfocite i stanice koje predočuju antigen (engl, *antigen-presenting cells*, APC). Egzogeni FVIII veže se na površinu APC, ulazi u stanicu procesom endocitoze i proteolitički se cijepa do peptidnih molekula koje se vežu na antigene glavnog sustava histokompatibilnosti klase II (engl. *major histocompatibilty complex*, MHC) i predočavaju na površini stanice APC T-pomoćničkim limfocitima preko T-staničnog receptora. Aktivacijom T-pomoćničkih limfocita oslobađaju se citokini (interleukini 2,4,5,10 i 12, interferon-γ) koji vezanjem na odgovarajuće receptore potiču proliferaciju i diferencijaciju B-limfocita, te proizvodnju specifičnih antitijela prema FVIII (Slika 1.10) (42).



Slika 1.10 Proces nastajanja inhibicijskih antitijela prema egzogenom FVIII (43).

Poznato je da ima više čimbenika koji mogu utjecati na razvoj inhibitora, uključujući genetičke i negenetičke čimbenike. Od genetičkih čimbenika najveći utjecaj ima mutacija u genu za FVIII koja je uzrok nastanka hemofilije A. Neki su tipovi mutacija povezani s većom vjerojatnošću nastanka inhibitora na FVIII. Također, polimorfizam gena za molekule MHC koje su odgovorne za imunološki odgovor organizma na FVIII, ali i polimorfizmi u genima za neke druge regulatore imunih reakcija (interleukin 10, TNF alfa i protein 4 povezan s T citotoksičnim limfocitima, CTLA-4) mogu imati utjecaj na razvoj inhibitora. Utjecaj ovih polimorfizama još se uvijek istražuje. Negenetički čimbenici mogu biti ovisni o bolesniku

(životna dob kod početka nadomjesne terapije, nadomjesna terapija povezana s nekim drugim izazovima za imunološki sustav) i ovisni o terapiji (vrsta pripravka FVIII, način primjene lijeka) (35,39,41,42).

U literaturi se danas puno raspravlja o tome koji su pripravci FVIII bolji za primjenu u liječenju hemofilije A: pripravci priređeni iz ljudske plazme ili rekombinantni pripravci. Čini se da bitnu ulogu ima i VWF kao proteinski nosač FVIII. Prema nekim studijama VWF smanjuje antigeničnost FVIII maskirajući epitope odgovorne za razvoj inhibitora, te na taj način djeluje zaštitno u smislu razvoja inhibitora (41). To se ponajprije odnosi na inhibitore usmjerene prema lakom lancu FVIII. U tom bi smislu pripravci FVIII priređeni iz ljudske plazme, koji sadržavaju i VWF, bili bolji za terapiju hemofilije A od rekombinantnih pripravaka koji ne sadrže VWF. Međutim, na temelju velikog broja studija u kojima su uspoređivani, nije nađena razlika u razvoju inhibitora primjenom rekombinantnih pripravaka u odnosu na pripravke dobivene iz ljudske plazme (34). S obzirom na dosadašnje spoznaje o navedenoj problematici, rekombinantni pripravci se zbog svoje sigurnosti u smislu virusne infekcije preporučuju kao lijek izbora za liječenje bolesnika s hemofilijom A, ali uz daljnji razvoj i usavršavanje pripravaka dobivenih iz ljudske plazme. Postupak inaktivacije virusa u današnjim pripravcima iz ljudske plazme toliko je usavršen da je prijenos virusa gotovo samo teoretski moguć, a zbog cijene su ti pripravci svakako dostupniji svim bolesnicima, neovisno o geografskoj širini i ekonomskom statusu (2,29,31,32,34,44).

Danas se u liječenju hemofilije A primjenjuju dva osnovna oblika liječenja: liječenje po potrebi i (preventivno) profilaktično liječenje. Liječenje po potrebi podrazumijeva davanje pripravka FVIII u slučaju potrebe, tj. akutnog krvarenja. Učestala krvarenja bitno povećavaju rizik za razvoj hemofilične artropatije zglobova i invalidnosti. Zbog toga je uveden novi pristup, preventivno liječenje, s ciljem smanjenja posljedica i komplikacija krvarenja, redovitim davanjem pripravaka FVIII, tj. održavanjem aktivnosti FVIII na razini umjerene hemofilije. Razlikuje se primarno i sekundarno preventivno liječenje. Primarnu profilaksu je prvi put primijenila profesorica Inga Marie Nilsson u Švedskoj krajem 50-ih godina prošlog stoljeća. Definira se kao redovita primjena FVIII duže od dva mjeseca ili primjena prije pojave krvarenja uopće. Sekundarna se profilaksa primjenjuje kod bolesnika kod kojih je već došlo do krvarenja u zglobove, a uključuje dugotrajnu redovitu primjenu lijeka u cilju sprječavanja nastanka “ciljnog zgloba”. Ciljni zglob je zglob u kojem se ponovljena krvarenja javljaju bez povratka u “zdravo” stanje između krvarenja (3,5). Zbog bolje učinkovitosti preventivnog liječenja u odnosu na liječenje po potrebi danas se smatra da u razvijenim zemljama redovitu profilaksu treba ponuditi svim oboljelima od teškog oblika hemofilije u

trenutku postavljanja dijagnoze ili nakon prvih nekoliko epizoda krvarenja, usprkos problemima s intravenoznim pristupom zbog učestale primjene lijeka. Problem ostaju nerazvijene zemlje u kojima živi otprilike tri četvrtine svih oboljelih od hemofilije, a koji ne dobivaju niti jedan odgovarajući oblik terapije (39).

Izračun doze FVIII u terapiji akutnog krvarenja kod hemofilije A provodi se na temelju više različitih jednadžba. Infuzija 1U FVIII/kg tjelesne mase povećava aktivnost FVIII za 0,02 kU/L plazme. Najčešća jednadžba za izračun doze je sljedeća (5):

FVIII (U) = [(željena aktivnost FVIII – aktualna aktivnost FVIII) x tjelesna težina bolesnika (kg)]/2

Aktivnost FVIII u plazmi koja se želi postići terapijom ovisi o mjestu i veličini krvarenja i iznosi za većinu krvarenja 0,30-0,50 kIU/L, a za intrakranijalna krvarenja i za kirurške intervencije 1,00 kIU/L (3,5).

Terapija akutnog krvarenja kod bolesnika koji su razvili inhibitore na FVIII je kompliciranа i skupa, a ovisi o titru antitijela. Kod inhibitora s niskim odgovorom liječenje se provodi visokim dozama FVIII (100-200 U/kg). Bolesnici koji imaju inhibitore s visokim odgovorom liječe se premošćivajućim lijekovima (engl. *bypassing agents*): aktiviranim koncentratima protrombinskog kompleksa (engl. *activated prothrombin complex concentrates,* aPCC; *factor eight bypassing activity,* FEIBA, Baxter, Austrija) ili aktiviranim rekombinantnim faktorom VII (rFVIIa, NovoSeven, Novo Nordisk, Danska). Načelo ove terapije je premošćivanje poremećaja u unutarnjem putu zgrušavanja aktiviranim faktorima VII, IX i X. Prema najnovijim istraživanjima ova su dva pripravka jednakovrijedna po učinku, ali neki bolesnici bolje reagiraju na jedan u odnosu na drugi. Učinak FEIBE je značajno slabiji (40-60%) u odnosu na učinak FVIIa ili koncentrata FVIII kod bolesnika bez inhibitora (80-90%) (39). Koncentrat FVIII svinjskog podrijetla također je djelotvoran kod inhibitora koji ne pokazuju križnu reakciju sa svinjskim FVIII. Indukcija imune tolerancije (engl. *immune tolerance induction,* ITI) je oblik liječenja kod kojeg se nastali inhibitori nastoje ukloniti. Načelo ove metode liječenja je izgradnja tolerancije imunološkog sustava bolesnika prema FVIII ponavljanim, redovitim izlaganjem egzogenom antigenu u niskim ili visokim dozama, ovisno o primijenjenom protokolu (3,5,29).

Kod umjerene i blage hemofilije A može se u terapiji koristiti dezmopresin, analog vazopresina otkriven 1977. god., koji oslobađa VWF iz endotelnih stanica i na taj način

sekundarno povećava koncentraciju FVIII. Prednost dezmopresina je sigurnost kod primjene i cijena. Antifibrinolitici se rabe u liječenju hemofilije, ali samo kao dodatna terapija uz pripravke FVIII (3,5,13).

U tablici 1.2 nalazi se popis lijekova registriranih u Republici Hrvatskoj za liječenje hemofilije A, za nadomjesnu terapiju i za premošćivajuću terapiju.

Tablica 1.2 Popis lijekova za liječenje hemofilije A koji su registrirani na osnovnoj listi lijekova Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje.

NEZAŠTIĆENO (GENERIČKO) IME LIJEKA	**PROIZVOĐAČ**	**ZAŠTIĆENO IME LIJEKA**
Lijekovi za nadomjesnu terapiju		
FVIII	Talecris Biotherapeutics	Koāte
FVIII	Octapharma	Octanate
Rekombinantni FVIII	Baxter	Recombinate
Rekombinantni FVIII	Bayer Biologicals	Kogenate Bayer
Koncentrirani FVIII s VWF	Baxter	Immunate
Koncentrirani FVIII s VWF	Octapharma	Wilate
Lijekovi za premošćivajuću terapiju		
Aktivirani koncentrat faktora protrombinskog kompleksa	Baxter	Feiba
Aktivirani rekombinantni FVIIa	Novo Nordisk	NovoSeven

Korekcija pogreške u genu za FVIII prijenosom "zdravog" gena pomoću genskih vektora (retrovirusni vektori) najnoviji je pristup liječenju hemofilije te jedini koji bi rezultirao izlječenjem bolesti. Genska terapija intenzivno se istražuje u posljednjem desetljeću na životinjskim modelima, s obzirom da hemofilija predstavlja idealan model kao bolest koja uključuje jedan poremećeni protein (FVIII) čiji nadomjestak u relativno niskim koncentracijama (0,01-0,05 kIU/L) može dovesti do značajnog kliničkog učinka i čija se aktivnost može relativno jednostavno mjeriti. Iako su životinjski modeli polučili izvrsne rezultate, kliničke studije koje su u tijeku trebaju riješiti izazove koji se odnose na upotrijebljene vektore, odabir ciljnog tkiva i dr. Osim genske terapije, liječenje hemofilije u

budućnosti uključuje razvoj pripravaka FVIII (FIX za hemofiliju B) i FVIIa s produljenim poluživotom (pegilirani FVIII, fuzijski protein FVIII) (39).

1.8. Fenotipske heterogenosti kod hemofilije A

Kao što je opisano u poglavlju 1.2., podjela hemofilije A temelji se na izmjerenoj aktivnosti FVIII u krvi. U većini slučajeva postoji dobra korelacija, međutim literaturni podaci pokazuju da kod određenog broja bolesnika postoji bitna heterogenost između izmjerene koagulacijske aktivnosti FVIII i kliničke težine bolesti ili kliničkog odgovora na terapiju. Mnoge su studije pokazale da oko 10% bolesnika s teškim oblikom hemofilije A nema spontana krvarenja u zglobove te da imaju minimalnu artropatiju, dok oko 12% bolesnika s umjerenim oblikom bolesti ima učestala krvarenja (45-51). To potvrđuje da ostatna aktivnost FVIII nije jedina odrednica kliničkog fenotipa te da postoje drugi čimbenici koji utječu na klinički izražaj bolesti. Mehanizmi zaslužni za heterogenost kliničkog fenotipa nisu posve jasni i smatra se da su višestruki. Kao što je navedeno u poglavlju 1.4., postoji više od 1200 različitih mutacija u genu za FVIII, odgovornih za nastanak hemofilije A, koje svakako doprinose heterogenosti fenotipskog izražaja. Osim toga, poznate su i opisane razlike u mjerenju aktivnosti FVIII različitim metodama ovisno o prisutnoj mutaciji u genu za FVIII. To se uglavnom odnosi na točkaste mutacije kod blage hemofilije A (52). Mnogi autori navode mogući utjecaj protrombotičkih rizičnih čimenika na klinički fenotip kod hemofilije A, kao što je manjak proteina C i S te polimorfizmi FVG1691A i FIIG20210A, (46-48). Protrombotički rizični čimbenici svojim učinkom (posebno FVG1691A) djelomično nadoknađuju nisku aktivnost FVIII, što rezultira pojačanom proizvodnjom trombina, bržim stvaranjem ugruška, te u konačnici blažom kliničkom slikom. Grünewald i sur. su pokazali statistički značajno višu koncentraciju VWF:Ag i tPA, te višu aktivnost TAFI u skupini bolesnika s težom kliničkom slikom (49). Paradoksalan porast fibrinolize kod težeg oblika bolesti objašnjavaju intenzivnom stimulacijom nedjelotvornoga hemostatskog sustava, uzrokovanom učestalim krvarenjima, koja rezultira koaktivacijom fibrinolitičkog sustava koji je, za razliku od koagulacijskog, potpuno funkcionalan. Međutim, mehanizam pojačane aktivacije fibrinolize kod težih oblika kliničke slike hemofilije A nije do danas u potpunosti razjašnjen. Dosadašnje studije upućuju na važnost TAFI i njegove aktivacije kod hemofilije A, ali, s obzirom na do sada pokazane rezultate za aktivnost i/ili koncentraciju različitih oblika TAFI potrebna su dodatna istraživanja (50,51). Poznat je i utjecaj farmakokinetičkih čimbenika kao što je poluživot FVIII nakon nadomjesne terapije te utjecaj VWF i krvne grupe bolesnika, kao i okolišnih čimbenika (životni stil i intenzitet tjelesne aktivnosti). Bolesnici s krvnom grupom 0

i nižom koncentracijom i aktivnosti VWF imaju značajno kraći poluživot FVIII, pojačanu sklonost krvarenjima, te zahtijevaju jaču nadomjesnu terapiju za prevenciju krvarenja (45).

1.9. Laboratorijska dijagnostika hemofilije A

Uloga laboratorija u cjelokupnoj kliničkoj obradi bolesnika s hemofilijom A je iznimno važna. Od vremena kada je razvijena i prvi put opisana koagulacijska metoda za mjerenje aktivnosti FVIII 50-ih godina prošlog stoljeća, ona se uz određene prilagodbe koristi do danas kao osnovna metoda za laboratorijsku dijagnostiku hemofilije A (52,53). Precizno i točno mjerenje aktivnosti FVIII je ključni korak u postavljanju dijagnoze, procjeni težine i oblika bolesti, procjeni rizika od razvoja inhibitora na FVIII, te u praćenju liječenja pripravcima FVIII bez obzira radi li se o liječenju po potrebi ili preventivnom liječenju (54). Naime, podjela hemofilije A temelji se na izmjerenoj ostatnoj aktivnosti FVIII u krvi, a za razlikovanje teškog oblika bolesti od umjerenog i blagog potrebno je točno mjerenje izrazito niskih aktivnosti FVIII (oko 0,01 kIU/L). Osim toga, u praćenju terapije kod teškog oblika bolesti potrebno je precizno mjerenje izrazito niskih aktivnosti FVIII s obzirom da već aktivnost FVIII≥0,01 kIU/L dovodi do bitnog poboljšanja u učestalosti i težini krvarenja (55).
Posljednjih se godina ispituju neke nove metodološke mogućnosti laboratorijskog praćenja bolesnika s hemofilijom A. Cilj je ovih istraživanja razviti pouzdanu i osjetljivu globalnu koagulacijsku metodu, tj. mjerenje ukupnoga hemostatskog potencijala u organizmu, a ne samo ostatne aktivnosti FVIII. Standardne koagulacijske pretrage mjere samo početak (inicijaciju) koagulacijske reakcije, tj. početak nastajanja ugruška (5% od ukupnog ugruška). Glavnina trombina razvija se tek nakon što je nastala prva količina fibrina i nakon što je kod standardnih koagulacijskih metoda mjerenje već završeno. Rezultati ovih analiza mogli bi biti bolji pokazatelji kliničkog izražaja bolesti, bolji pokazatelji učinka terapije kao i bolji pretkazatelji bolesnika s visokim rizikom krvarenja (54,56). U ovom će poglavlju biti opisana načela metoda koje se tradicionalno koriste u koagulacijskim laboratorijima za dijagnostiku hemofilije A (mjerenje aktivnosti FVIII i određivanje inhibitora na FVIII), te novih metoda koje se još uvijek rutinski ne primjenjuju (analiza reakcijske krivulje APTV-a, analiza stvaranja trombina i automatizirana tromboelastografija).

1.9.1. Standardne laboratorijske metode

1.9.1.1. Mjerenje aktivnosti FVIII

Postoje tri metode mjerenja aktivnosti faktora FVIII u plazmi: koagulacijska metoda u jednom stupnju, koagulacijska metoda u dva stupnja i kromogena metoda.

Koagulacijska metoda u jednom stupnju (engl. *one-stage method*) je najčešće korištena metoda za mjerenje koagulacijske aktivnosti i otkrivanje manjka FVIII u krvi. Metoda je opisana još 1953. god. (57). Mjerenje koagulacijske aktivnosti FVIII temelji se na svojstvu visoko razrijeđene plazme bolesnika da skrati, tj. korigira APTV plazme koja ima aktivnost FVIII<0,01 kIU/L (deficijentna plazma za FVIII) u reakcijskom sustavu koji se sastoji još od APTV-reagensa i kalcija. S obzirom da su u reakcijskom sustavu svi faktori zgrušavanja, osim FVIII, prisutni u suvišku (iz deficijentne plazme), vrijeme nastanka ugruška ovisno je samo o aktivnosti FVIII u uzorku ispitivane plazme (52,53).

Koagulacijska metoda u dva stupnja (engl. *two-stage method*) je opisana još 1955. god. (58). U prvom stupnju reakcije razrijeđenja ispitivane plazme miješaju se s fosofolipidima i kalcijem, što rezultira nastankom protrombinaze. Aktivnost protrombinaze, koja je proporcionalna aktivnosti FVIII u uzorku, mjeri se nakon dodatka "normalne" plazme kao izvora protrombina i fibrinogena. Danas je metoda u dva stupnja uglavnom zamijenjena kromogenom metodom koja se lako automatizira (52,53).

Kromogena metoda je prvi put opisana 1975. god. (59). Preporučena je od SSC-a za FVIII i FIX ISTH-a kao referentna metoda za mjerenje aktivnosti FVIII u plazmi i u koncentratima FVIII. Reakcijska smjesa sastoji se od pročišćenog aktiviranog FIXa, pročišćenog FX, fosfolipida, kalcija, trombina, kromogenog supstrata osjetljivog na FXa i uzorka u kojem se mjeri aktivnost FVIII. Trombin iz reagensa aktivira FVIII iz uzorka, pri čemu nastali FVIIIa, uz FIXa, fosfolipide i kalcij, aktivira FX koji u završnoj reakciji cijepa kromogeni supstrat. Nastala boja je proporcionalna aktivnosti FVIII iz uzorka i mjeri se spektrofotometrijski (52,53).

1.9.1.2. Određivanje inhibitora na FVIII

Važnost inhibitora za klinički tijek bolesti i razvoj komplikacija kod hemofilije A naglašen je u prethodnim poglavljima. Pretraživanje na prisutnost inhibitora kod bolesnika s hemofilijom A provodi se obično 1-2x godišnje, osim u slučaju kliničke sumnje, tj. izostanka odgovora na nadomjesnu terapiju kada se pretraživanje radi učestalije.

Metoda Bethesda za mjerenje titra inhibitora na FVIII opisana je 1975. god. (60), a temelji se na mjerenju pada aktivnosti egzogenog FVIII (iz "normalne" plazme) nakon miješanja s uzorkom u omjeru 1:1 i inkubacije 2 sata na 37°C. Kontrolna mješavina se, analogno testnoj mješavini, sastoji od jednakih omjera "normalne" plazme i imidazolskog pufera. Osjetljivost i specifičnost metode je poboljšana Nijmegen-modifikacijom u kojoj je imidazolski pufer zamijenjen puferiranom deficijentnom plazmom za FVIII koja ne sadrži inhibitore na FVIII

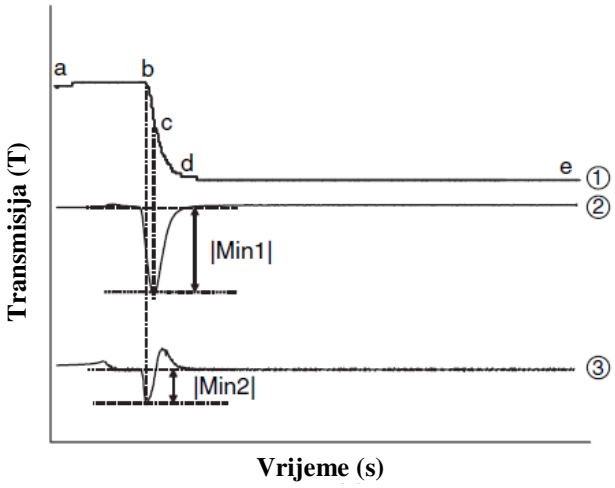
(61). Ova je metoda preporučena od SSC-a za FVIII i FIX ISTH-a kao referentna metoda za određivanje inhibitora na FVIII (62). Ostatna aktivnost FVIII u testnoj mješavini, izmjerena koagulacijskom metodom u jednom stupnju ili kromogenom metodom, mjera je inhibicijske aktivnosti u ispitivanom uzorku. Jedna Nijmegen-Bethesda jedinica je definirana kao količina antitijela koja neutralizira 50% aktivnosti FVIII iz "normalne" plazme (5,37,38).

1.9.2. Nove laboratorijske metode

1.9.2.1. Analiza reakcijske krivulje APTV-a (engl. *waveform analysis*)

Moderni koagulacijski analizatori imaju mogućnost neprekidnog optičkog mjerenja promjene apsorpcije ili transmisije svjetla u reakcijskoj smjesi u kojoj se provodi koagulacijska reakcija (PV ili APTV) i nastaje fibrin. Mjerenje promjena optičkog signala nastavlja se i nakon što nastane prva količina trombina i fibrina. Kao rezultat kontinuiranog mjerenja nastaje optički profil koagulacijske reakcije, sigmoidalna reakcijska krivulja (engl. *waveform*) koja prati cjelokupni tijek i brzinu pretvorbe fibrinogena u fibrin. Na taj način reakcijska krivulja odražava ukupni tijek stvaranja trombina i omogućava bolji uvid u cjelokupni hemostatski potencijal plazme.

Analiza reakcijske krivulje APTV-a je metoda koja je primarno razvijena na automatiziranom optičkom koagulacijskom analizatoru MDA-II (bioMerieux, Durham, SAD). Krivulje dobivene matematičkom analizom te programska podrška analizatora omogućavaju izračun parametara koji daju uvid u cjelokupni koagulacijski proces (Slika 1.11, krivulja 1). Mjerenjem prve derivacije transmisije svjetla tijekom reakcije (dT/dt) dobije se podatak o brzini reakcije (engl. *velocity*, Slika 1.11, krivulja 2), a minimalna vrijednost prve derivacije (Min1) predstavlja točku najveće brzine promjene transmisije svjetla, tj. točku u kojoj je brzina reakcije najveća (točka **c**). Mjerenjem druge derivacije transmisije svjetla tijekom reakcije (dT^2/dt^2) dobije se podatak o ubrzanju reakcije (engl. *acceleration*, Slika 1.11, krivulja 3), a minimalna vrijednost druge derivacije (Min2) predstavlja točku s najvećim ubrzanjem, tj. početak koagulacijske reakcije (točka **b**). To je točka koju uređaj MDA-II bilježi kao vrijeme zgrušavanja određene reakcije. Točke **a** i **e** označavaju početak i kraj signala mjerenja (54,55,63,64).



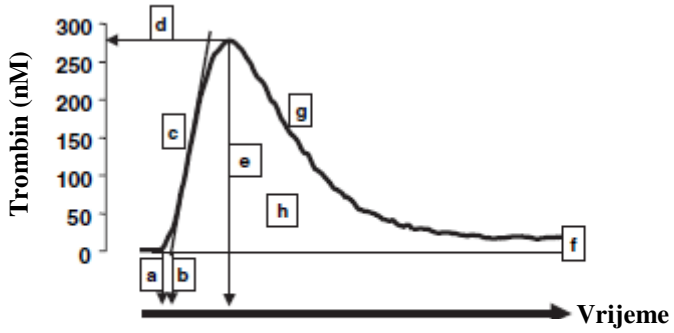
Slika 1.11 Analiza reakcijske krivulje APTV-a na analizatoru MDA-II (55): promjena transmisije svjetla tijekom vremena (krivulja 1), prva derivacija transmisije svjetla, dT/dt (krivulja 2), druga derivacija transmisije svjetla, dT^2/dt^2 (krivulja 3). Početak signala mjerenja (točka a), početak koagulacijske reakcije (točka b), točka najveće brzine koagulacijske reakcije (točka c), završetak koagulacijske reakcije (točka d), kraj signala mjerenja (točka e).

1.9.2.2. Analiza stvaranja trombina (engl. *thrombin generation test,* TGT)

Trombin je konačni proizvod i ključni, snažni enzim sustava zgrušavanja. U fazi inicijacije oslobađanjem tkivnog faktora (TF) nakon oštećenja stijenke krvne žile te aktivacijom niza koagulacijskih reakcija u kojima sudjeluje više faktora zgrušavanja nastaje mala količina trombina. Ovaj trombin dalje potiče aktivaciju sustava zgrušavanja mehanizmom pozitivne povratne sprege, aktivirajući trombocite te FV, FVIII i FXI. Umnažanjem sustava zgrušavanja dolazi do stvaranja velikih količina trombina, erupcije trombina (engl. *burst of thrombin*), što rezultira konačnim nastankom ugruška.

Tradicionalne koagulacijske pretrage, kao što su PV i APTV, mjere početak procesa nastajanja fibrina iz fibrinogena, tj. osjetljive su samo na male količine trombina nastale u fazi inicijacije. TGT mjeri cjelokupni proces nastajanja trombina tijekom vremena koji je ovisan i o nastanku i djelovanju prirodnih inhibitora trombina, te kao takav predstavlja način procjene cjelokupnoga hemostatskog potencijala jer odražava ravnotežu između plazmatskih prokoagulacijskih i antikoagulacijskih čimbenika (54,64-66). Primjena TGT u klinici opisana je prvi put 1953. godine (67). Metoda je uključivala aktivaciju koagulacijske reakcije nakon defibrinacije plazme te izdvajanje zasebnih alikvota iz reakcijske smjese u drugi reakcijski sustav tijekom vremena. Kinetika stvaranja trombina je praćena dodatkom fibrinogena kao

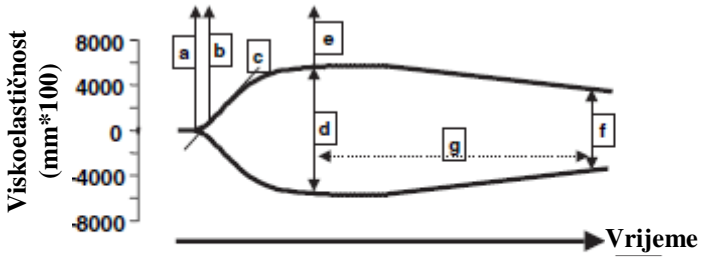
prirodnog supstrata trombina. Uvođenjem sporo reagirajućih kromogenih i fluorogenih supstrata izbjegnuta je potreba izdvajanja zasebnih alikvota i omogućena automatizacija metode. Kod kromogenih metoda uz dodatak inhibitora polimerizacije fibrina, nije potrebna prethodna defibrinacija plazme. Posljednjih su godina razvijene tri automatizirane TGT-metode (CAT-Thrombinoscope™assay, Maastricht, Nizozemska; TGA, Technoclone, Beč, Austrija; ETP, Siemens, Marburg, Njemačka). Kao uzorak se može koristiti trombocitima bogata (engl. *platelet rich plasma*, PRP) i siromašna plazma (engl. *platelet poor plasma*, PPP) ili puna krv. Intenzitet mjerenog signala proporcionalan koncentraciji nastalog trombina mjeri se tijekom vremena (spektrofotometrijski ili fluorometrijski) i bilježi u obliku karakteristične krivulje stvaranja trombina koja se kvantitativno procjenjuje na temelju prethodno definiranih parametara (Slika 1.12). Tipična krivulja stvaranja trombina ima početnu fazu od početka mjerenja do pojave porasta signala – faza odgode (engl. *lag phase*) (a), fazu strmog porasta (c), fazu postupnog pada intenziteta signala (g) i ostatnu aktivnost trombina (f). Važni parametri su maksimum trombinske aktivnosti (d), vrijeme potrebno da se postigne maksimum trombinske aktivnosti (e) i površina ispod krivulje ili endogeni trombinski potencijal (ETP) (h). ETP je definiran kao *in vitro* potencijal plazme ispitanika da nakon indukcije koagulacije tijekom vremena stvara trombin (68,69).



Slika 1.12 Krivulja stvaranja trombina s karakterističnim fazama i karakterističnim parametrima (69): faza od početka mjerenja do pojave porasta signala - faza odgode (a), točka porasta signala (b), faza strmog porasta signala (c), maksimum trombinske aktivnosti (d), vrijeme potrebno da se postigne maksimum trombinske aktivnosti (e), ostatna aktivnost trombina (f), faza postupnog pada intenziteta signala (g), površina ispod krivulje ili endogeni trombinski potencijal (ETP) (h).

1.9.2.3. Automatizirana tromboelastografija (engl. *thromboelastography*)

Tromboelastografija je metoda, prvi put opisana 1948. god. (70), u kojoj se nakon aktivacije zgrušavanja dodatkom kalcija mjeri mehanička stabilnost ugruška nastalog u uzorku pune krvi, neprekidnim mjerenjem viskoelastičnih svojstava ugruška i njihovim grafičkim bilježenjem u obliku karakteristične krivulje, tromboelastograma. Metoda se izvodi pomoću posebnog instrumenta čije glavne dijelove čine viseća torzijska nit, cilindar i cilindrična kiveta u koju se stavlja puna krv i koja oscilira pod malim kutem oponašajući uvjete sporog protoka koji odgovaraju venskom protoku krvi (engl. *low shear stress*). Kako dolazi do nastanka ugruška u oscilirajućoj kiveti, signal se prenosi preko cilindra i viseće torzijske niti i postaje jači kako raste količina i čvrstoća ugruška, a zatim tijekom vremena postupno slabi kako se ugrušak postupno lizira. U metodi se koristi puna krv sa ili bez antikoagulansa, čime se u potpunosti oponašaju složeni fiziološki uvjeti međuodnosa staničnih i nestaničnih plazmatskih čimbenika u nastajanju i lizi ugruška. Modificirana tromboelastografija nudi još više informacija i prednosti u odnosu na klasičnu tromboelastografiju jer se ispitivanje provodi uz uporabu aktivatora i inhibitora zgrušavanja, što skraćuje reakcijsko vrijeme kontroliranom aktivacijom i povećava preciznost i specifičnost metode (54,69). Novi instrumenti za tromboelastografiju (TEG® Hemostasis Analyzer, Haemonetics Corp, Braintree, SAD; i ROTEM®, Tem International GmbH, München, Njemačka) imaju računalnu podršku koja omogućuje preciznu analizu tromboelastograma (Slika 1.13). Tromboelastografijom se procjenjuju različita fizikalno-kemijska svojstva ugruška: brzina porasta i mehaničkog jačanja ugruška (c), maksimalna amplituda (d), vrijeme do nastanka maksimalne amplitude (e) kao pokazatelja zajedničkog učinka koagulacijskih faktora i trombocita, te amplituda mjerena u predefiniranom vremenskom intervalu nakon maksimalne amplitude (f) i indeks lize ugruška (g) kao pokazatelja fibrinolitičkih svojstava ispitivanog uzorka.



Slika 1.13 Karakteristični izgled krivulje tromboelastografa i karakteristični parametri (69): vrijeme do početka stvaranja ugruška (a), vrijeme do nastanka ugruška odgovarajuće čvrstoće (b), brzina porasta i mehaničkog jačanja ugruška (c), maksimalna amplituda (d), vrijeme do nastanka maksimalne amplitude (e), amplituda mjerena u predefiniranom vremenskom intervalu nakon maksimalne amplitude (f) i indeks lize ugruška (g).

1.9.3. Molekularna dijagnostika hemofilije A

Molekularna dijagnostika hemofilije A dostupna je od vremena kloniranja gena za FVIII (1984. god.). Iako se dijagnoza bolesti i dalje temelji na rutinskim pretragama u laboratorijima za ispitivanje poremećaja hemostaze, tj. mjerenju aktivnosti FVIII koagulacijskom metodom, molekularna dijagnostika svakako pruža dodatne informacije i mogućnosti u dijagnostici i terapiji hemofilije A: pouzdano određivanje statusa nositelja mutacije i prenositelja bolesti; mogućnost genetičkog savjetovanja, tj. dobivanja pravilnih informacija o prijenosu bolesti na potomstvo te mogućnost odluke obaviještenog bolesnika vezane uz potomstvo; prenatalna dijagnostika; procjena rizika za razvoj inhibitora na FVIII; procjena uspješnosti novijih terapijskih pristupa (25,71).

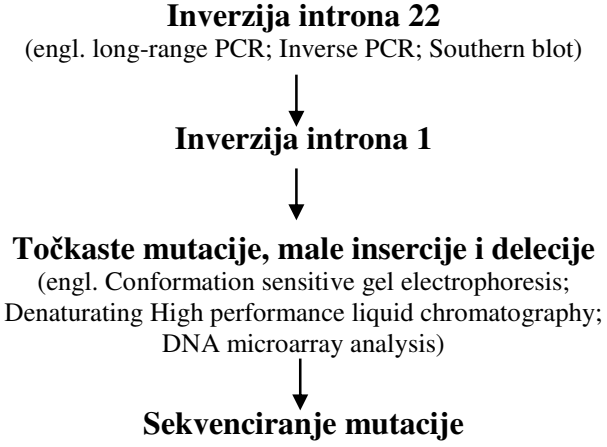
S obzirom na veličinu gena za FVIII, razvoj tehnika za molekularnu dijagnostiku hemofilije A predstavljao je veliki izazov. Danas su razvijene dvije strategije molekularne dijagnostike: analiza povezanosti tj. neizravna pretraga prijenosa hemofiličnog gena (engl. *linkage analysis*) ili izravno dokazivanje mutacije odgovorne za razvoj bolesti, a koriste se za otkrivanje nositelja mutacije (žene koje su zdravi prenositelji bolesti) i za prenatalnu dijagnostiku. Također, svim mogućim nositeljima mutacije potrebno je izmjeriti koagulacijsku aktivnost FVIII kako bi se procijenio njihov rizik od krvarenja. Prenatalna dijagnostika na hemofiliju A provodi se od 10. do 12. tjedna trudnoće u uzorku dobivenom biopsijom korionskih resica ili, rjeđe, amniocentezom u 16. gestacijskom tjednu (25,71).

Iako se analiza povezanosti polimorfizama koristi sve rjeđe zbog različitih nedostataka (izdvojeni slučaj hemofilije A, odnosno negativna obiteljska anamneza, odsutnost informativnih polimorfnih biljega i problem nesudjelovanja članova obitelji), ona i danas ima

svoje mjesto u molekularnoj dijagnostici hemofilije A u slučajevima postojanja pozitivne obiteljske anamneze i informativnih polimorfnih biljega. Jednostavna je, brza i jeftina. Najčešći polimorfni biljezi koji se pretražuju ovom metodom su slijedovi ponavljajućih polimorfizama u intronima 13 i 22 te *Bcl*I dimorfizam u intronu 18, a zajedno su informativni u 90% testiranih obitelji. Rezultati su dostupni unutar nekoliko dana, što je prihvatljivo za prenatalna testiranja (25,71).

Izravno dokazivanje mutacije posebno je korisno kod izdvojenih slučajeva teške hemofilije A (bez obiteljske anamneze) gdje je isključena mogućnost analize povezanosti polimorfizama, te kod utvrđivanja sklonosti za razvoj inhibitora na FVIII. Bolesnici s velikim delecijama i insercijama te besmislenim mutacijama i inverzijama gena imaju značajno veći rizik (70%) razvoja inhibitora od bolesnika s pogrešnim mutacijama i malim insercijama i delecijama (10%). Čini se da je i odgovor na ITI povezan s genotipom FVIII. Bolesnici s inverzijama i besmislenim mutacijama imaju veću vjerojatnost za odgovor na ITI od bolesnika s mutacijama s pomakom okvira čitanja i velikim delecijama (24,25,71).

Prema predloženom algoritmu (Slika 1.14) prvi korak u izravnom dokazivanju mutacije čini dokazivanje inverzije introna 22 (zbog visoke učestalosti). Ukoliko je nalaz negativan, slijedi dokazivanje inverzije introna 1, a potom dokazivanje točkastih mutacija te malih insercija i delecija. Konačna potvrda otkrivene mutacije provodi se metodom sekvenciranja mutiranog ulomka gena. Osjetljivost otkrivanja mutacija primjenom navedenog algoritma iznosi 85-95% (71).



Slika 1.14 Algoritam izravnog dokazivanja mutacija kod teškog oblika hemofilije A (71).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Hemofilija A je rijetki X-vezani nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi koji nastaje zbog potpunog ili djelomičnog manjka aktivnosti FVIII u krvotoku, a očituje se povećanom sklonošću krvarenjima. S obzirom na ostatnu aktivnost FVIII hemofilija A se dijeli na teški, umjereni i blagi oblik. Kod teških oblika bolesti javljaju se spontana krvarenja u zglobove i mišiće, dok su kod blažih oblika spontana krvarenja rijetka.

Literaturni podaci ukazuju na značajnu heterogenost kliničkog izražaja hemofilije A. Oko 10% bolesnika s teškim oblikom bolesti nema spontana krvarenja u zglobove i ima minimalnu artropatiju, dok oko 12% bolesnika s umjerenim oblikom bolesti ima učestala krvarenja. Ovi podaci govore da ostatna aktivnost FVIII nije jedina odrednica kliničkog fenotipa kod hemofilije A te da postoje drugi čimbenici koji imaju utjecaj na klinički izražaj bolesti. Danas nije potpuno jasno o kojim se čimbenicima radi, ali dosadašnje spoznaje upućuju na utjecaj drugih prokoagulacijskih, ali i fibrinolitičkih čimbenika te je osobita pozornost usmjerena na protrombotičke rizične čimbenike. Protrombotički rizični čimbenici svojim učinkom mogu djelomično nadoknaditi nisku aktivnost FVIII, što bi rezultiralo blažom kliničkom slikom bolesti od očekivane. Neka istraživanja govore o hemofiliji A kao o kombiniranom poremećaju koagulacijskog i fibrinolitičkog sustava, s paradoksalnim porastom fibrinolize kod težeg oblika bolesti. Mehanizmi pojačane aktivacije fibrinolize kod težih oblika kliničke slike hemofilije A nisu potpuno razjašnjeni. Literaturni podaci govore i o bitnom utjecaju VWF i krvne grupe bolesnika, kao i okolišnih čimbenika (životni stil i intenzitet tjelesne aktivnosti). Naime, bolesnici s krvnom grupom 0 imaju nižu koncentraciju i aktivnost VWF, što može imati utjecaja i na poluživot FVIII kod nadomjesne terapije.

S obzirom na heterogenost kliničkog izražaja među bolesnicima s istom aktivnosti FVIII, mjerenje samo ostatne aktivnosti FVIII nije optimalna metoda za dijagnozu i praćenje hemofilije A jer se mjerenjem samo jednog dijela koagulacijskog procesa ne procjenjuju drugi čimbenici koji mogu imati utjecaj na koagulacijski status bolesnika. Osim toga, standardnim koagulacijskim pretragama mjeri se samo početak procesa nastajanja trombina (oko 3% ukupnog trombina) i nastanka fibrina iz fibrinogena (inicijacija koagulacije), dok glavnina trombina koji nastaje u jednoj reakciji (oko 97%) ostaje „neprocijenjena“. Zbog svega toga javlja se potreba za novim laboratorijskim metodama koje bi odražavale aktivnost i međusobne interakcije svih bitnih čimbenika, tj. ukupni hemostatski potencijal i globalnu procjenu hemostatskog statusa bolesnika.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Mjerenjem aktivnosti i/ili koncentracije 11 prokoagulacijskih i fibrinolitičkih parametara kod bolesnika s hemofilijom A ispitati moguće mehanizme i utjecaje koji rezultiraju razlikama u fenotipskom izražaju bolesti.
2. Ispitati povezanost i utjecaj 11 prokoagulacijskih i fibrinolitičkih parametara s endogenim trombinskim potencijalom.
3. Ispitati povezanost i utjecaj 11 prokoagulacijskih i fibrinolitičkih parametara s fenotipskim izražajem hemofilije A.
4. Usporediti koagulacijsku i kromogenu metodu mjerenja aktivnosti FVIII i usporediti ih s novim metodama: analiza reakcijske krivulje APTV-a i analiza stvaranja trombina.
5. Razviti i primijeniti metodu kvantitativne analize reakcijske krivulje APTV-a na analizatoru BCS.
6. Ispitati dijagnostičku vrijednost analize reakcijske krivulje APTV-a u dijagnostici hemofilije A te usporediti metodu sa standardnim laboratorijskim pretragama.
7. Ispitati dijagnostičku vrijednost analize stvaranja trombina u dijagnostici hemofilije A te usporediti metodu sa standardnim laboratorijskim pretragama i analizom reakcijske krivulje APTV-a.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Ispitanici i uzorci

Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb u razdoblju od 2009. do 2011. god. u suradnji s Centrom za hemofiliju Zavoda za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC. U istraživanje je uključeno 100 bolesnika koji boluju od teškog, umjerenog ili blagog oblika hemofilije A u dobi iznad 16 godina. Za sve bolesnike prikupljeni su sljedeći klinički podaci: dob kod prvog krvarenja u životu, učestalost i uobičajena mjesta krvarenja, broj zglobova zahvaćenih hemofiličnom artropatijom, te godišnja potrošnja pripravaka FVIII ili pripravaka za premošćivajuću terapiju. Također su prikupljeni podaci o statusu bolesnika vezanom uz razvoj inhibitora na FVIII, infekciji virusima hepatitisa B, C i HIV-a u vrijeme provođenja istraživanja, te o krvnoj grupi.

Kontrolna se skupina sastojala od 101 zdravog, muškog ispitanika starosne dobi između 16 i 84 godine (medijan dobi 56 godina).

Kao uzorak je korištena periferna venska krv s natrij-citratom kao antikoagulantom, uzeta natašte za svakog ispitanika. Krv je centrifugirana 2 puta na 4000 okretaja/min radi dobivanja PPP. Mjerenje aktivnosti FVIII koagulacijskom metodom, ispitivanje na prisutnost i određivanje titra inhibitora FVIII i analiza reakcijske krivulje APTV-a provedeni su u svježim uzorcima plazmi. Alikvoti prethodno odijeljenih plazmi pohranjeni su na -30°C za preostale analize. Stanični dio periferne krvi korišten je za izdvajanje DNA iz leukocita koja je zatim pohranjena na +4°C za molekularno-genetičke analize.

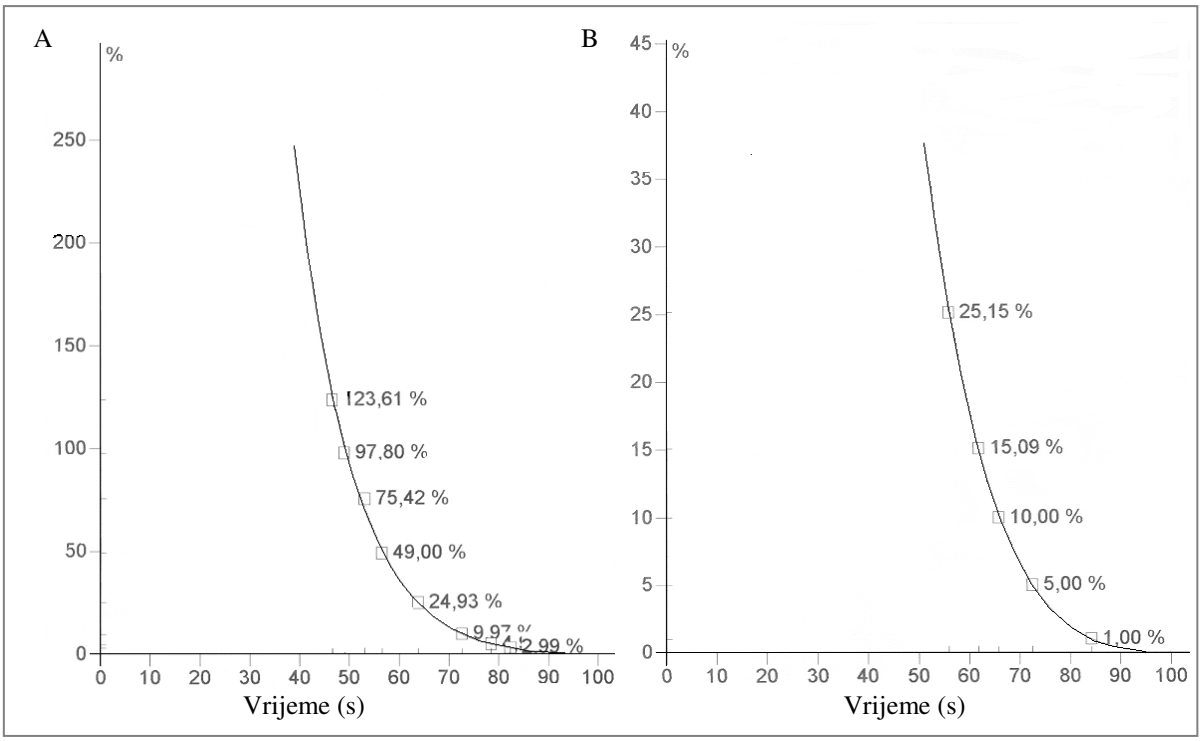
4.2. Metode

4.2.1. Mjerenje aktivnosti FVIII

4.2.1.1. Koagulacijska metoda (FVIIIkgl)

Za mjerenje aktivnosti FVIII korištena je koagulacijska metoda u jednom stupnju. Metoda se temelji na svojstvu visoko razrijeđene plazme bolesnika da skrati, tj. korigira APTV plazme koja ima aktivnost FVIII<0,01 kIU/L (deficijentna plazma za FVIII). U modificiranoj metodi APTV-a u uzorak plazme razrijeđen imidazolskim puferom (omjer 1+9) dodaje se deficijentna plazma za FVIII, te se u toj smjesi određuje APTV u sekundama. Dodatkom deficijentne plazme za FVIII u reakcijski sustav, vrijeme nastanka ugruška ovisi samo o aktivnosti FVIII u uzorku jer deficijentna plazma sadrži sve ostale faktore zgrušavanja u suvišku.

Iz prethodno priređene kalibracijske krivulje koja predstavlja odnos vremena zgrušavanja u sekundama (s) i aktivnosti FVIII (%) u razrijeđenjima standardne plazme, analizator automatski očita aktivnost FVIII (%) u ispitivanom uzorku (Slika 4.1). Očitana se vrijednost podijeli sa 100 radi dobivanja aktivnosti FVIII u kIU/L. Naime, aktivnost od 1 IU/mL (1 kIU/L) definira se kao aktivnost FVIII u 1 mL svježe smjese plazmi zdravih osoba (engl. *pool*) i odgovara 100%-tnoj aktivnosti FVIII u zdravoj populaciji. Priređene su dvije kalibracijske krivulje: "normalna" krivulja - za očitavanje aktivnosti FVIII>0,05 kIU/L (>5%) i "niska" krivulja – za očitavanje aktivnosti FVIII<0,10 kIU/L (<10%). Svako mjerenje aktivnosti FVIIIkgl potrebno je provesti u najmanje tri različita razrijeđenja uzorka plazme (52,53).



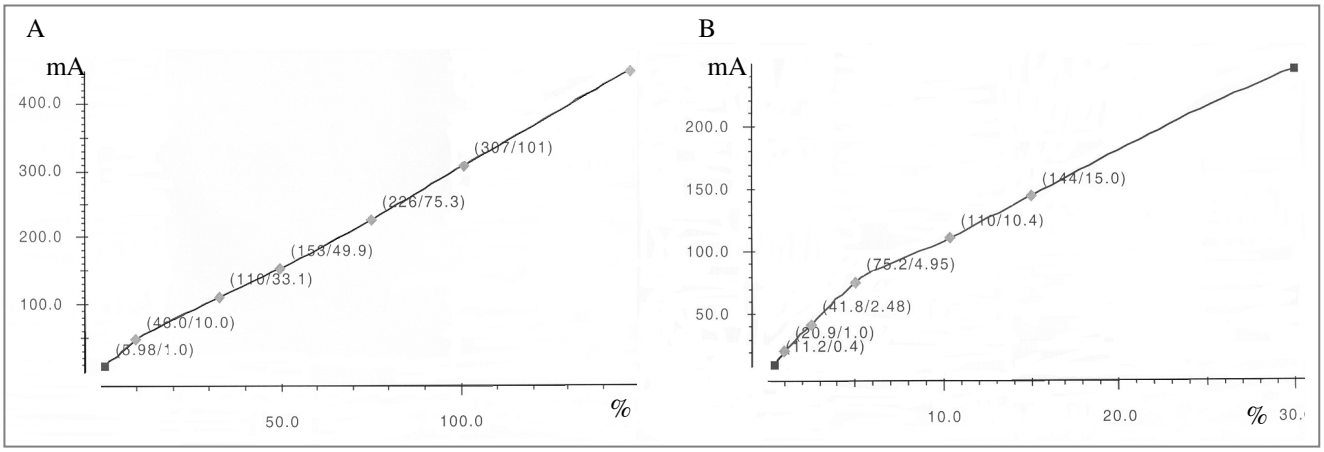
Slika 4.1 Kalibracijska krivulja za određivanje aktivnosti FVIIIkgl u jednom stupnju na analizatoru BCT. "Normalna" krivulja (A) i "niska" krivulja (B).

Za provedbu koagulacijske metode korišteni su sljedeći reagensi: reagens za APTV Actin FS, 25mM $CaCl_2$, deficijentna plazma za FVIII, imidazolski pufer, Standard Human Plasma, Control Plasma N i Control Plasma P tvrtke Siemens, Marburg, Njemačka.
Mjerenja su izvršena na analizatoru BCT (Siemens, Marburg, Njemačka)

4.2.1.2. Kromogena metoda (FVIIIch)

U kromogenoj metodi se FVIII iz uzorka aktivira dodatkom trombina iz reagensa. Nastali aktivirani FVIIIa ubrzava pretvorbu FX u aktivirani oblik FXa u prisutnosti aktiviranog FIXa, fosfolipida i kalcijevih iona. Aktivnost nastalog FXa je proporcionalna aktivnosti FVIII iz uzorka. Nakon dodatka specifičnog supstrata za FXa intenzitet nastale boje p-nitroanilina mjeri se spektrofotometrijski.

Iz prethodno priređene kalibracijske krivulje, koja predstavlja odnos intenziteta boje (mA/min) i aktivnosti FVIII (%) u razrijeđenjima standardne plazme, analizator automatski očita aktivnost FVIIIch (%) u ispitivanom uzorku (Slika 4.2). Dobivena vrijednost podijeli se sa 100 radi dobivanja aktivnosti FVIII u kIU/L. Proizvođač preporučuje izradu jedne kalibracijske krivulje (najniža točka kalibracije je 0,10 kIU/L (10%)). Zbog važnosti točnog određivanja niskih aktivnosti FVIII u ovom je radu priređena i zasebna, "niska" kalibracijska krivulja (najniža točka kalibracije 0,01 kIU/L (1%)), koja je korištena za uzorke s aktivnošću FVIII≤0,02 kIU/L (≤2%).



Slika 4.2 Kalibracijska krivulja za određivanje aktivnosti FVIIIch na analizatoru BCS: osnovna krivulja (A) i "niska" krivulja (B).

Za provedbu kromogene metode korišten je reagens Factor VIII Chromogenic Assay, Standard Human Plasma, Control Plasma N i Control Plasma P tvrtke Siemens, Marburg, Njemačka. Mjerenja su izvršena na analizatoru BCS (Siemens, Marburg, Njemačka).

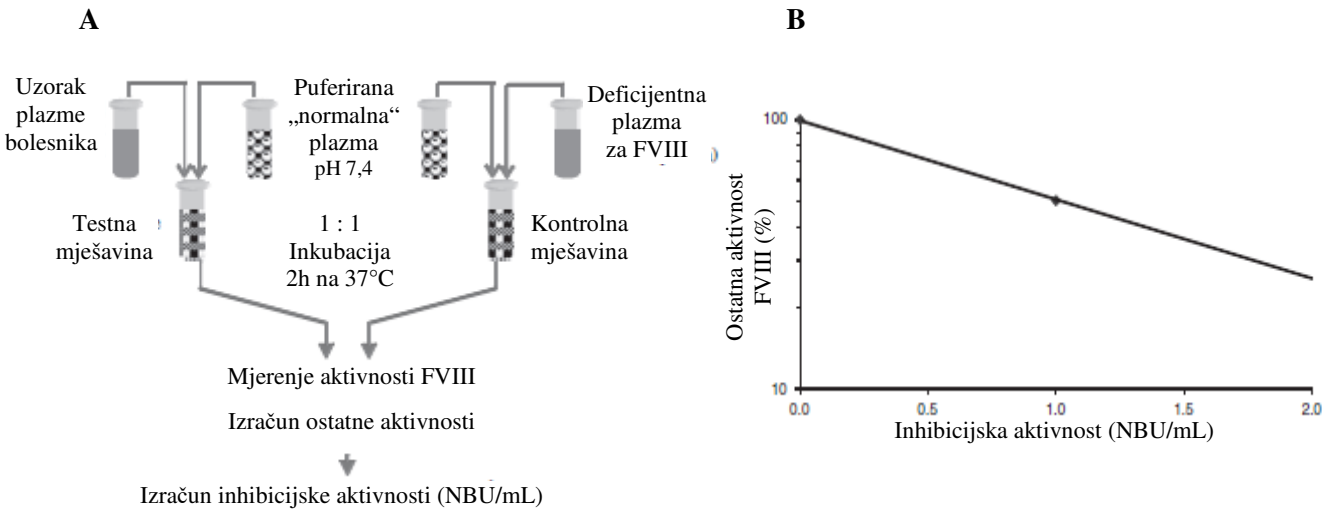
4.2.2. Dokazivanje prisutnosti inhibitora na FVIII i kvantitativno mjerenje titra inhibitora (Nijmegen modifikacija metode Bethesda)

Načelo ove metode je inhibicija aktivnog FVIII iz „normalne“ plazme djelovanjem inhibitora iz uzorka, a nakon inkubacije smjese „normalne“ plazme i ispitivanog uzorka na 37^{o}C tijekom 2 sata. Na temelju intenziteta inhibicije FVIII određuje se titar antitijela u uzorku, izražen u Nijmegen-Bethesda jedinicama. Jedna NBU je ona količina antitijela koja neutralizira 50% aktivnosti FVIII iz “normalne” plazme.

U tu se svrhu priređuju **kontrolna mješavina** (smjesa jednakih dijelova puferirane „normalne“ plazme i deficijentne plazme za FVIII) i **testne mješavine** (smjese jednakih dijelova puferirane „normalne“ plazme i različitih razrijeđenja plazme bolesnika koja se razrjeđuje deficijentnom plazmom za FVIII) (Slika 4.3A). Priređene mješavine inkubiraju se na 37^{o}C tijekom 2 sata te se nakon toga mjere ostatne aktivnosti FVIIIkgl u svakoj mješavini. Ostatna aktivnost FVIII u testnoj mješavini mjera je inhibicijske aktivnosti u uzorku, a dobije se na sljedeći način:

$$\text{Ostatna aktivnost FVIII (\%)} = \frac{\text{aktivnost FVIIIkgl u testnoj mješavini (\%)}}{\text{aktivnost FVIIIkgl u kontrolnoj mješavini (\%)}}$$

Inhibicijska aktivnost plazme bolesnika (NBU/mL) očitava se iz polu-logaritamskog dijagrama ovisnosti postotka ostatne aktivnosti FVIII (logaritamska ljestvica) i jedinica inhibicijske aktivnosti (linearna ljestvica), iz onih testnih mješavina u kojima je ostatna aktivnost FVIII između 25% i 75% (Slika 4.3B). Očitana inhibicijska aktivnost pomnoži se s razrijeđenjem uzorka u odabranoj testnoj mješavini i time dobiva rezultat titra inhibitora u NBU/mL. Pozitivnim nalazom smatra se inhibicijska aktivnost >0,8 NBU/mL.



Slika 4.3 Shematski prikaz postupka kod Nijmegen-modifikacije metode Bethesda (A). Dijagram za kvantifikaciju inhibitora na FVIII (B) (37).

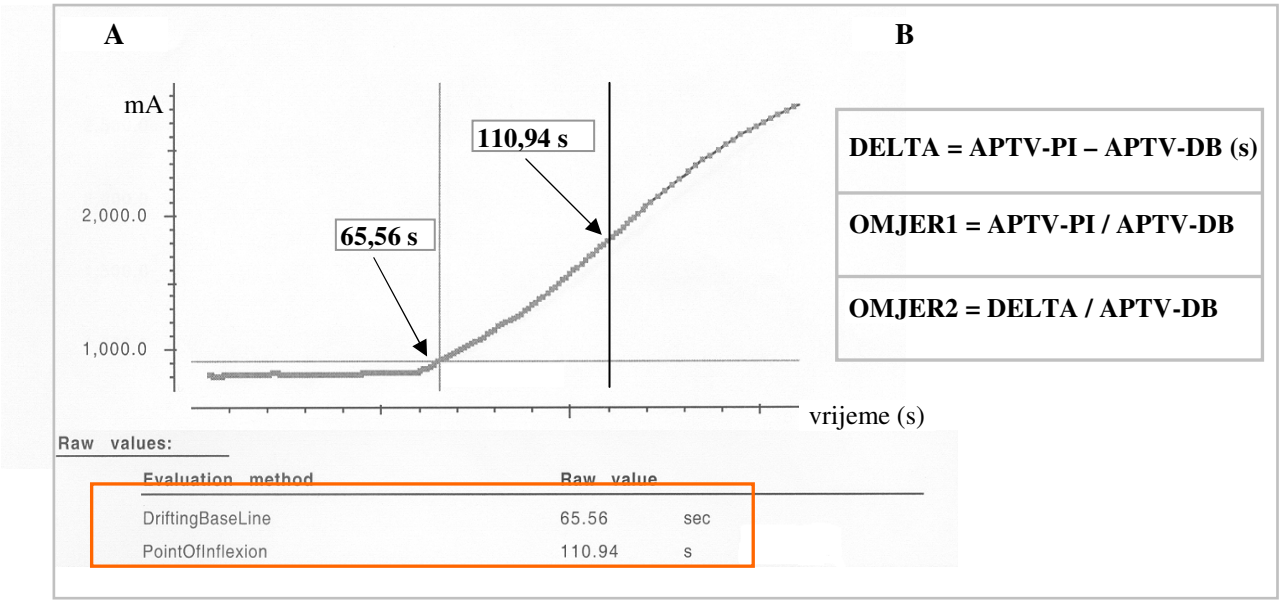
Za određivanje inhibitora na FVIII korišteni su sljedeći reagensi: reagens za APTV Actin FS, 25mM $CaCl_2$, deficijentna plazma za FVIII, imidazolski pufer i Control Plasma N tvrtke Siemens, Marburg, Njemačka. Mjerenja su izvršena na analizatoru BCT (Siemens, Marburg, Njemačka).

4.2.3. Analiza reakcijske krivulje APTV-a

Analiza reakcijske krivulje APTV-a primarno je razvijena na automatiziranom optičkom koagulacijskom analizatoru MDA-II (bioMerieux, Durham, SAD). Programska podrška analizatora MDA-II omogućava kvantitativnu analizu reakcijske krivulje računanjem prve i druge derivacije kao mjere brzine i ubrzanja koagulacijske reakcije (54,55). Metoda je podrobnije opisana u poglavlju 1.9.2.1. Uvoda ovog rada. U našem laboratoriju razvijen je alternativni način kvantitativne procjene reakcijske krivulje APTV-a na analizatoru BCT (Siemens, Marburg, Njemačka) definicijom dva kvantitativna parametra: delta APTV (DaPTT) i APTV-omjer (aPTTSR) (72). U svakom su uzorku izmjerena dva APTV-a. U prvom mjerenju APTV-a procjena reakcijske krivulje provedena je metodom zadane promjene apsorpcije (engl. *fixed absorbance*, APTV-FA). U drugom mjerenju procjena reakcijske krivulje provedena je metodom točke infleksije (engl. *point of inflexion*, APTV-PI). Procjena reakcijske krivulje zadanom promjenom apsorpcije definira vrijeme zgrušavanja u početku porasta signala, u trenutku kada se postigne prethodno definirana promjena apsorpcije. Nasuprot tome, procjena reakcijske krivulje metodom točke infleksije definira

vrijeme zgrušavanja na polovini reakcijske krivulje, u trenutku kada je brzina koagulacijske reakcije najveća. DaPTT je definiran kao razlika između APTV-PI i APTV-FA, a aPTTSR kao omjer između DaPTT i APTV-FA.

U ovom istraživanju kvantitativna analiza reakcijske krivulje APTV-a provedena je poboljšanom metodom na analizatoru BCS pomoću tri prethodno definirana kvantitativna parametra. Poboljšanje se sastoji u tome da je definiran poseban program za APTV na BCS-u (modificirani APTV, mAPTV) kojim se u istom mjerenju APTV-a simultano provodi dvostruka procjena reakcijske krivulje: metodom pomaka osnovne linije (engl. *drifting baseline*, APTV-DB) i metodom točke infleksije. Procjena reakcijske krivulje metodom pomaka osnovne linije definira vrijeme zgrušavanja u početku porasta signala (slično kao APTV-FA), uz matematičku kompenzaciju nespecifičnog porasta apsorpcije na osnovnoj mjernoj liniji. Na taj način analizator kod svakog mjerenja mAPTV-a daje dva rezultata (APTV-DB i APTV-PI), čime se štedi na reagensu i na vremenu (Slika 4.4A). Iz dobivenih rezultata izračunavaju se sljedeći parametri: DELTA (analog DaPTT), OMJER1 i OMJER2 (analog aPTTSR). DELTA je definiran kao razlika između APTV-PI i APTV-DB i izražava se u sekundama; OMJER1 kao omjer između APTV-PI i APTV-DB; OMJER2 kao omjer između DELTA i APTV-DB (Slika 4.4B). Jedinica za OMJER1 i OMJER2 je 1.



Slika 4.4 Analiza reakcijske krivulje APTV-a na BCS-u prilagođenom metodom mAPTV. Primjer reakcijske krivulje APTV-a s dva rezultata u sekundama (A), kvantitativni parametri za procjenu reakcijske krivulje (B).

Za analizu reakcijske krivulje APTV-a korišteni su sljedeći reagensi: reagens za APTV Actin FS, 25mM $CaCl_2$, Control Plasma N i Control Plasma P tvrtke Siemens, Marburg, Njemačka. Mjerenja su izvršena na analizatoru BCS (Siemens, Marburg, Njemačka).

4.2.4. Analiza stvaranja trombina

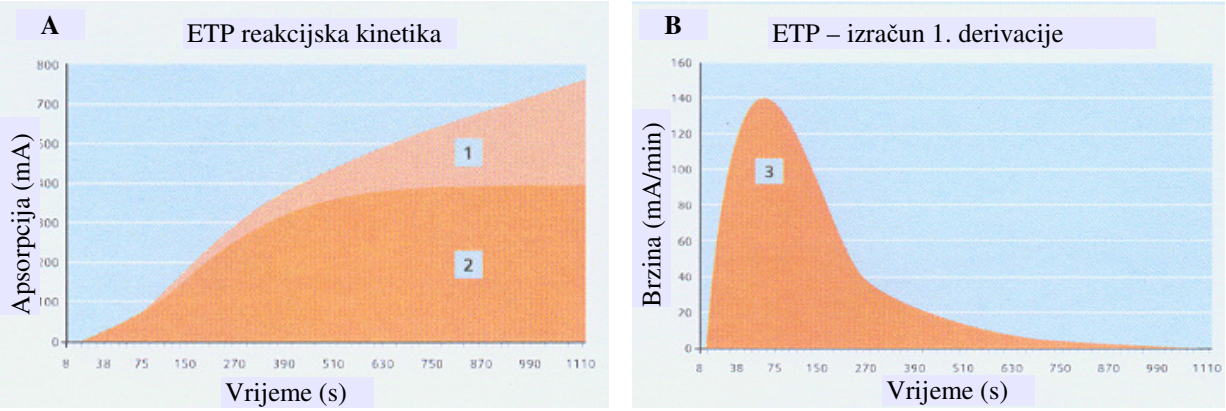
Analiza stvaranja trombina izvršena je na uređaju BCS-XP (Siemens, Marburg, Njemačka) u uzorcima plazmi siromašnih trombocitima s komercijalnim reagensom ETP (Endogenous Thrombin Potential, Siemens, Marburg, Njemačka), metodom ETP-C, prilagođenom za bolesnike s hemofilijom A i B.

Prethodno zamrznuti alikvoti citratnih plazmi centrifugirani su nakon otapanja 10 minuta na 12000 okretaja/min da bi se uklonili eventualno zaostali trombociti. Nakon dodatka reagensa u uzorak citratne plazme dolazi do aktivacije koagulacije i razvoja trombina. Reagens Activator Mix je smjesa aktivatora vanjskog puta i aktivatora unutarnjeg puta. Pripravlja se od jednog dijela reagensa Dade Innovin razrijeđenog 1:555 (rekombinantni tromboplastin i fosfolipidi, Siemens, Marburg, Njemačka) i dva dijela reagensa Dade Actin FS, razrijeđenog 1:20 (fosfolipidi i elaginska kiselina kao aktivator kontaktnog sustava, Siemens, Marburg, Njemačka). Konačna koncentracija TF u reagensu je <1 pmol/L. Reagens sadrži sporo-reagirajući, kromogeni supstrat specifičan za trombin, s niskim afinitetom za trombin (H-β-Ala-Gly-Arg-pNA), što omogućava praćenje reakcije tijekom više minuta, ali omogućava također i praćenje inhibicije trombina djelovanjem prirodnih inhibitora iz plazme. U reagens je dodan i inhibitor polimerizacije fibrina jer bi eventualno nastali fibrin zbog zamućenja reakcijske smjese ometao spektrofotometrijsko mjerenje.

Za kontrolu kvalitete korišteni su: smjesa „normalnih“ plazmi (aktivnost FVIII oko 1,00 kIU/L), priređena od plazmi zdravih dobrovoljaca, te hipokoagulabilna smjesa plazmi (aktivnost FVIII od 0,01 do 0,03 kIU/L), priređena razrijeđivanjem smjese „normalnih“ plazmi s deficijentnom plazmom za FVIII.

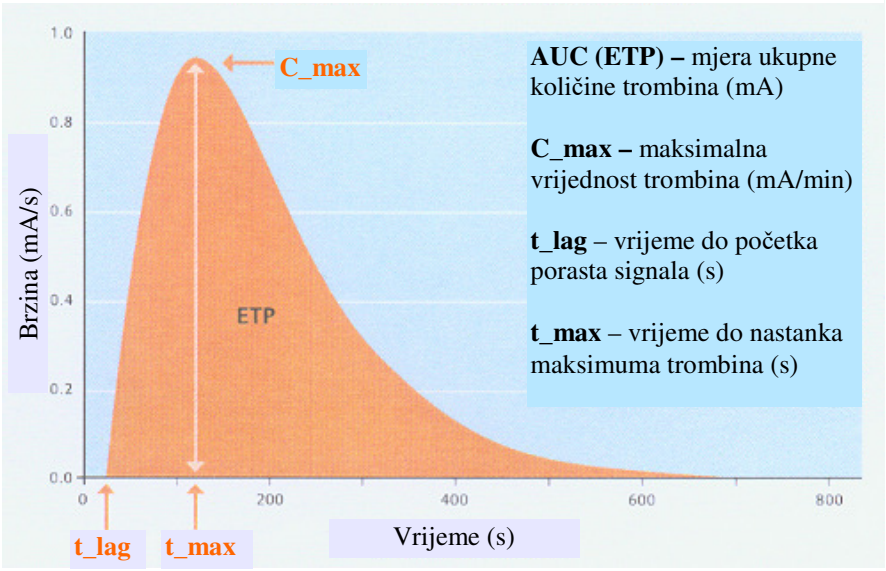
Kinetika nastajanja trombina mjeri se na uređaju BCS-XP neprekidno tijekom 1600 s nakon dodatka sintetičkoga trombinskog supstrata iz reagensa. Intenzitet boje oslobođenog kromofora na 405 nm proporcionalan je količini nastalog trombina, a dobivena krivulja odražava aktivnost ukupnog trombina (slobodni trombin i trombin vezan na α2-makroglobulin) i zove se krivulja pretvorbe supstrata (engl. *substrate conversion curve*) (Slika 4.5A, krivulja 1). Prema matematičkom algoritmu uređaj automatski od ukupne trombinske aktivnosti oduzima aktivnost trombina vezanog na α2-makroglobulin i dobivena korigirana krivulja je krivulja kinetike slobodnog trombina (engl. *thrombin curve*) (Slika 4.5A, krivulja

2). Prvom derivacijom dobivene krivulje dobije se krivulja stvaranja trombina (engl. *thrombin generation curve*) (Slika 4.5B, krivulja 3).



Slika 4.5 Analiza stvaranja trombina metodom ETP. Krivulja pretvorbe supstrata-1, krivulja kinetike slobodnog trombina-2 (A). Krivulja stvaranja trombina-3 (B).

Iz dobivene krivulje stvaranja trombina matematički se dobiju 4 kvantitativna parametra kojima se procjenjuje trombinska aktivnost plazme: površina ispod krivulje (engl. *area under the curve*, AUC, mjerna jedinica: mA) koja predstavlja vrijednost ETP, maksimalna vrijednost trombina (C_max, mjerna jedinica: mA/min), faza odgode, tj. vrijeme od početka mjerenja do početka porasta signala (t_lag, mjerna jedinica: s) i vrijeme do nastanka maksimalne količine trombina (t_max, mjerna jedinica: s) (Slika 4.6).



Slika 4.6 Krivulja stvaranja trombina i kvantitativni parametri koji se dobiju analizom krivulje.

Programska podrška analizatora BCS-XP omogućuje evaluaciju krivulje kinetike slobodnog trombina, dobivanje krivulje stvaranja trombina i dobivanje navedenih kvantitativnih parametara. Evaluacija se provodi na temelju standardnih evaluacijskih parametara za metodu ETP-C koje je preporučio proizvođač (Tablica 4.1).

Tablica 4.1 Parametri za evaluaciju krivulje kinetike slobodnog trombina metodom ETP-C.

Parametar	**Vrijednost parametra**
startlag – vrijeme pre-reakcijske faze (s)	50
mt – vrijeme u kojem se mjerenje provodi (s)	1600
min - vrijeme početka pretraživanja na linearnu fazu krivulje (s)	900
dminw - minimalna širina linearnog raspona (s)	300
epsilon – 1. kriterij za zaustavljanje matematičkih ponavljanja	0,00001
maxit – maksimalni broj ponavljanja za izračun AUC	100
maxcv – maksimalno dozvoljeni CV za vrijednosti trombina u linearnom rasponu (%)	5
smooth – broj točaka poravnavanja upotrijebljenih za prvu derivaciju krivulje	21
limit – postotak pada maksimalne brzine reakcije (%)	20

Prije prihvaćanja dobivenih kvantitativnih parametara kao valjanih, potrebna je vizualna evaluacija svake reakcijske krivulje, što je omogućeno u posebnom programu za procjenu i evaluaciju krivulja, CURVES (engl. *curve evaluation software*) (Siemens, Marburg, Njemačka). Valjanom reakcijskom krivuljom smatra se „glatka“ krivulja koja pokazuje brzi, linearni porast nakon faze odgode te spori, linearni završetak signala. Reakcijska krivulja koja ima višestruke poraste signala ili neravnomjerni linearni porast nije valjana. U tablici 4.2 prikazani su kriteriji procjene valjanosti dobivenih kvantitativnih parametara za metodu ETP-B, s obzirom da za ETP-C nema preporučenih kriterija.

Tablica 4.2 Kriteriji procjene valjanosti kvantitativnih parametara analize stvaranja trombina metodom ETP-B.

1. **t_lag** vrijednost mora biti na početku porasta signala krivulje pretvorbe supstrata
2. **AUC** ne smije pasti ispod nule
3. **C_max** vrijednost treba biti na najvišoj točki krivulje stvaranja trombina

U slučaju da automatska evaluacija nije odgovarajuća, izmjenom evaluacijskih parametara u programu CURVES postiže se optimalna kinetička evaluacija. Metoda ETP-C je zbog malih količina trombina koji se oslobađa tijekom reakcije osjetljivija na interferencije koje se pojavljuju u obliku sitnih valova („*signal noise*“, krivulja nije glatka). U tim slučajevima proizvođač preporuča povećanje vrijednosti parametara za evaluaciju „smooth“ i „startlag“.

4.2.5. Kromogena metoda za mjerenje aktivnosti FXIII

FXIII se iz uzorka aktivira u FXIIIa djelovanjem trombina. Istovremeno nastaje i fibrin iz fibrinogena, što ubrazava prvu reakciju. Prisutnost inhibitora zgrušavanja u reagensu onemogućava nastajanje ugruška te stoga nije potrebno uklanjati fibrinogen iz plazme, što bi dovelo do gubitka dijela FXIII. Nastali FXIIIa povezuje peptidni supstrat s glicil-etil-esterom iz reagensa, pri čemu se oslobađa amonijak. Oslobođeni se amonijak određuje u usporednoj enzimskoj reakciji gdje se pad koncentracije NADH (ΔA/min), koji je proporcionalan aktivnosti FXIII, mjeri na 340 nm. Iz prethodno priređene kalibracijske krivulje koja predstavlja odnos promjene intenziteta apsorbancije (mA/min) i aktivnosti FXIII (%) u razrijeđenjima standardne plazme, analizator automatski očita aktivnost FXIII (%) u ispitivanom uzorku.

Metoda se zasniva na sljedećim reakcijama:

$$\text{Fibrinogen} \xrightarrow{\text{trombin}} \text{topivi fibrin} \xrightarrow{\text{inhibitor zgrušavanja}} \text{ugrušak}$$

$$\text{FXIII} \xrightarrow[\text{fibrin}]{\text{trombin}} \text{FXIIIa}$$

$$\text{Glicil etil ester + peptidni supstrat} \xrightarrow{\text{FXIIIa}} \text{konjugat + NH3}$$

$$NH_3 + \text{NADH} + \alpha\text{-ketoglutarat} \xrightarrow{\text{GLDH}} \text{NAD + glutamat}$$

Za mjerenje aktivnosti FXIII korišten je reagens Berichrom FXIII, Standard Human Plasma, Control Plasma N i Control Plasma P tvrtke Siemens, Marburg, Njemačka. Mjerenja su obavljena na analizatoru BCS-XP (Siemens, Marburg, Njemačka).

4.2.6. Enzim-imunofluorescencijska metoda za mjerenje koncentracije antigena VWF (VWF:Ag)

Određivanje VWF:Ag provedeno je automatiziranom enzimunokemijskom metodom s fluorescentnom detekcijom (ELFA) na uređaju mini Vidas. Uređaj koristi jednokratne kasete i nastavke obložene primarnim antitijelom. U jednokratnu kasetu pipetira se 100 µL uzorka plazme nakon čega uređaj automatski razrijeđuje uzorak i miješa ga s primarnim antitijelom, mišjim monoklonskim antitijelom na VWF. Vezanje sa sekundarnim antitijelom, konjugatom mišjega monoklonskog antitijela na VWF i alkalne fosfataze, provodi se u drugom stupnju reakcije te se suvišak nevezanog antitijela i antigena ispere. U završnoj reakciji enzim iz konjugata hidrolizira supstrat 4-metil-umbeliferil fosfat, a intenzitet fluorescencije nastalog fluorescentnog proizvoda 4-metil-umbeliferona mjeri se na 450 nm i izravno je razmjeran koncentraciji VWF:Ag. Iz prethodno priređene kalibracijske krivulje koja predstavlja odnos intenziteta fluorescencije na 450 nm i koncentracije VWF:Ag (%) u kalibratoru, analizator automatski očita koncentracije VWF:Ag (%) u ispitivanom uzorku.

Za mjerenje koncentracije VWF:Ag korišten je reagens VIDAS VWF tvrtke bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francuska. Mjerenja su izvršena na analizatoru mini VIDAS (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francuska).

4.2.7. Aglutinacijska metoda za mjerenje aktivnosti VWF (VWF:RCo)

Fiksirani (stabilizirani) trombociti aglutiniraju se u prisutnosti VWF u uzorku plazme i antibiotika ristocetina u reagensu. Zamućenost suspenzije otopine reagensa smanjuje se zbog nastale aglutinacije i taloženja aglutinata na dno reakcijske kivete. Promjena apsorbancije izravno je razmjerna ristocetin-kofaktorskoj aktivnosti uzorka. Iz prethodno priređene kalibracijske krivulje koja predstavlja odnos vremena u kojem je postignuta zadana promjena apsorbancije (s) i aktivnosti VWF:RCo (%) u razrijeđenjima standardne plazme, analizator automatski očita aktivnost VWF:RCo (%) u ispitivanom uzorku.

Za mjerenje VWF:RCo korišten je reagens Berichrom VWF, Standard Human Plasma, Control Plasma N i Control Plasma P tvrtke Siemens, Marburg, Njemačka. Mjerenja su provedena na analizatoru BCS (Siemens, Marburg, Njemačka).

4.2.8. Enzim-imunokemijska metoda (ELISA) za mjerenje koncentracije protrombinskog fragmenta 1+2 (F1+2)

Mjerenje koncentracije F1+2 izvršeno je ručnom metodom ELISA. Tijekom prve inkubacije dolazi do vezanja antigena F1+2 iz uzorka s antitijelima na F1+2 koja su vezana na površinu mikrotitarske pločice. Nakon ispiranja, u drugoj reakciji u kojoj se dodaje sekundarno antitijelo obilježeno peroksidazom, dolazi do njegovog vezanja na slobodne determinante antigena F1+2. Suvišak sekundarnog antitijela se ispere, a enzimska aktivnost preostale peroksidaze određuje se nakon dodatka kromogenog supstrata i peroksida fotometrijskim mjerenjem intenziteta nastale boje. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji F1+2 u uzorku. Iz prethodno priređene kalibracijske krivulje, koja predstavlja odnos intenziteta apsorbancije na 450 nm (mA) i koncentracije F1+2 (pmol/L) u kalibratorima, očita se koncentracija F1+2 (pmol/L) u ispitivanom uzorku.

Za mjerenje koncentracije F1+2 korišten je reagens Enzygnost F1+2 monoclonal tvrtke Siemens, Marburg, Njemačka.

4.2.9. Kromogena metoda za mjerenje aktivnosti inhibitora aktivatora plazminogena 1 (**PAI-1**)

PAI-1 iz uzorka inaktivira urokinazu iz reagensa. Ostatna aktivnost urokinaze se određuje pretvorbom plazminogena u plazmin. Nastali plazmin cijepa specifični kromogeni supstrat, a inhibitor plazmina deaktivira se oksidacijom kloraminom T. Aktivnost plazmina mjeri se kinetičkim testom mjerenjem porasta apsorbancije na 405 nm. Intenzitet boje je obrnuto razmjeran aktivnosti PAI-1 u uzorku. Iz prethodno priređene kalibracijske krivulje, koja predstavlja odnos intenziteta apsorbancije (mOD/min) i aktivnosti PAI-1 (kU/L) u standardnoj plazmi, analizator automatski očita aktivnost PAI-1 (kU/L) u ispitivanom uzorku.

Metoda se zasniva na sljedećim reakcijama:

$$\text{PAI + urokinaza} \longrightarrow \text{[urokinaza-PAI] + ostatna urokinaza}$$

$$\text{Plazminogen} \xrightarrow{\text{ostatna urokinaza}} \text{plazmin}$$

$$\text{HD-Nva-CHA-lys-pNA} \xrightarrow{\text{plazmin}} \text{HD-Nva-CHA-lys-OH + p-nitroanilin}$$

Za mjerenje aktivnosti PAI-1 korišten je reagens Berichrom PAI tvrtke Siemens, Marburg, Njemačka. Mjerenja su izvršena na analizatoru BCT (Siemens, Marburg, Njemačka).

4.2.10. Kromogena metoda za mjerenje aktivnosti plazminogena

Plazminogen u uzorku stvara kompleks sa streptokinazom iz reagensa, te nastali kompleks cijepa kromogeni supstrat iz reagensa. Intenzitet oslobođene boje razmjeran je aktivnosti plazminogena u uzorku, a mjeri se kinetičkim testom, mjerenjem porasta apsorbancije na 405 nm. Iz prethodno priređene kalibracijske krivulje, koja predstavlja odnos intenziteta apsorbancije (mA/min) i aktivnosti plazminogena (%) u razrijeđenjima standardne plazme, analizator automatski očita aktivnost plazminogena (%) u ispitivanom uzorku.

Metoda se zasniva na sljedećim reakcijama:

$$\text{Plazminogen + streptokinaza} \longrightarrow \text{[plazminogen-streptokinaza]}$$

$$\text{HD-Nva-CHA-lys-pNA} \xrightarrow{\text{[plazminogen-streptokinaza]}} \text{HD-Nva-CHA-lys-OH + p-nitroanilin}$$

Za mjerenje aktivnosti plazminogena korišten je reagens Berichrom Plasminogen, Standard Human Plasma, Control Plasma N i Control Plasma P tvrtke Siemens, Marburg, Njemačka. Mjerenja su izvršena na analizatoru BCS (Siemens, Marburg, Njemačka).

4.2.11. Kromogena metoda za mjerenje aktivnosti inhibitora plazmina

Inhibitor plazmina (α_2-antiplazmin) iz uzorka inaktivira plazmin iz reagensa u kojem se nalazi u suvišku. Ostatna aktivnost plazmina određuje se kinetičkim testom, koji uključuje mjerenje porasta apsorbancije na 405 nm nakon što plazmin hidrolizira kromogeni supstrat iz reagensa i nastane obojeni p-nitroanilin. Intenzitet nastale boje obrnuto je razmjeran aktivnosti inhibitora plazmina u uzorku. Iz prethodno priređene kalibracijske krivulje, koja predstavlja odnos intenziteta apsorbancije (mA/min) i aktivnosti inhibitora plazmina (%) u razrijeđenjima standardne plazme, analizator automatski očita aktivnost inhibitora plazmina (%) u ispitivanom uzorku.

Metoda se zasniva na sljedećim reakcijama:

$$\alpha_2\text{-antiplazmin}_{\text{uzorak}} + \text{plazmin}_{\text{u suvišku}} \longrightarrow [\alpha_2\text{-antiplazmin-plazmin}] + \text{plazmin}_{\text{ostatni}}$$

$$\text{HD-Nva-CHA-lys-pNA} \xrightarrow{\text{plazmin}_{\text{ostatni}}} \text{HD-Nva-CHA-lys-OH + p-nitroanilin}$$

Za mjerenje aktivnosti inhibitora plazmina korišten je reagens Berichrom Antiplasmin, Standard Human Plasma, Control Plasma N i Control Plasma P tvrtke Siemens, Marburg, Njemačka. Mjerenja su provedena na analizatoru BCS (Siemens, Marburg, Njemačka).

4.2.12. Kromogena metoda za mjerenje aktivnosti trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize (TAFI)

Djelovanjem kompleksa trombin-trombomodulin iz reagensa dolazi do aktivacije TAFI u aktivirani oblik TAFIa koji djelomično cijepa specifični kromogeni supstrat iz reagensa, pri čemu reakcijska smjesa ostaje obojena. Djelovanjem karboksipeptidaze A iz reagensa dolazi do konačnog cijepanja djelomično hidroliziranog supstrata u bezbojni spoj, a promjena boje je proporcionalna aktivnosti TAFI iz uzorka. Iz prethodno priređene kalibracijske krivulje, koja predstavlja odnos intenziteta apsorbancije (mA/min) i aktivnosti TAFI (%) u razrijeđenjima kalibratora, analizator automatski očita aktivnost TAFI (%) u ispitivanom uzorku.

Za mjerenje aktivnosti TAFI korišten je reagens Stachrom TAFI tvrtke Diagnostica Stago, Asnieres, Francuska. Mjerenja su izvršena na analizatoru BCS (Siemens, Marburg, Njemačka).

4.2.13. Enzim-imunokemijska metoda (ELISA) za mjerenje koncentracije aktivnog i inaktiviranog oblika trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize (TAFIa/TAFIai)

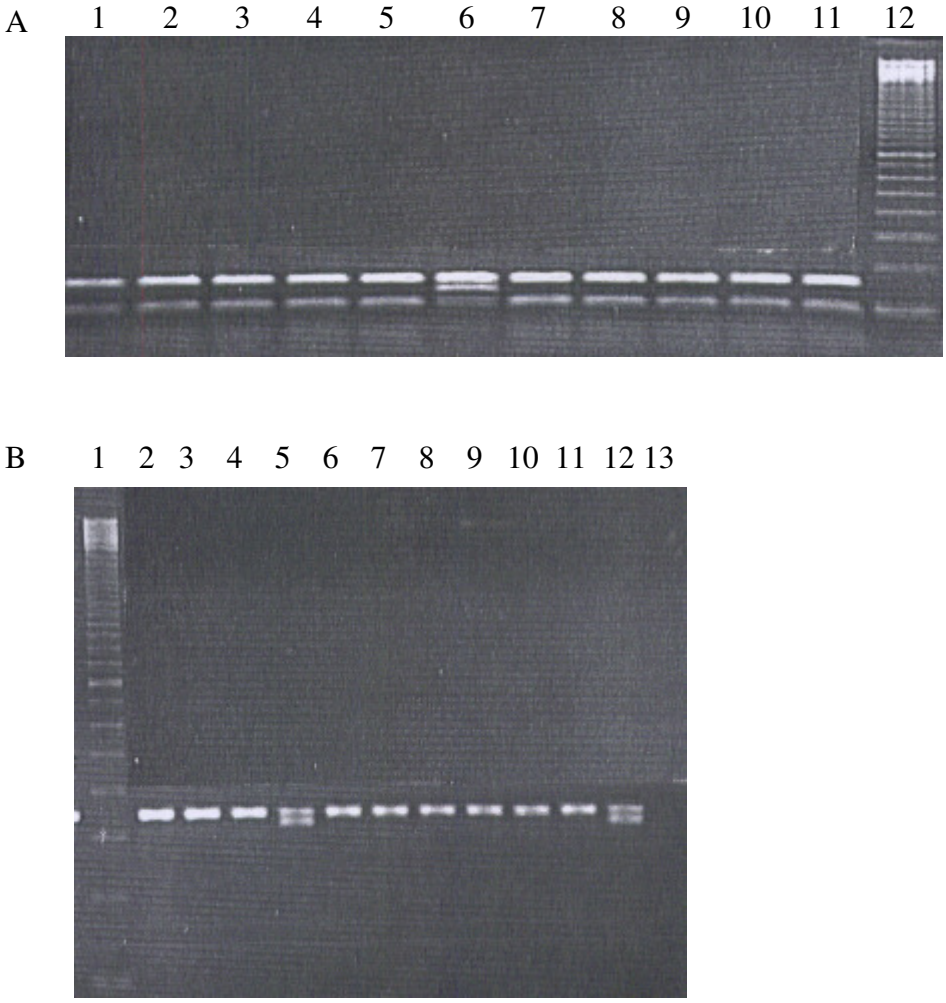
Mjerenje koncentracije TAFIa/TAFIai provedeno je ručnom metodom ELISA. Tijekom prve inkubacije dolazi do vezanja antigena TAFIa i TAFIai iz uzorka s antitijelima na TAFIa/TAFIai koja su vezana na površini mikrotitarske pločice. Nakon ispiranja, u drugoj reakciji u kojoj se dodaje sekundarno antitijelo obilježeno peroksidazom, dolazi do njegovog vezanja na slobodne determinante antigena TAFIa/TAFIai. Suvišak sekundarnog antitijela se ispere, a enzimska aktivnost preostale peroksidaze određuje se nakon dodatka kromogenog supstrata (tetrametilbenzidin, TMB) i peroksida fotometrijskim mjerenjem intenziteta nastale boje. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji TAFIa/TAFIai u uzorku. Iz prethodno priređene kalibracijske krivulje, koja predstavlja odnos intenziteta apsorbancije na 450 nm (mA) i koncentracije TAFIa/TAFIai (µg/L) u kalibratorima, očita se koncentracija TAFIa/TAFIai (µg/L) u ispitivanom uzorku.

Za mjerenje koncentracije TAFIa/TAFIai korišten je reagens Asserachrom® TAFIa/TAFIai tvrtke Diagnostica Stago, Asnières, Francuska.

4.2.14. Dokazivanje polimorfizama FVG1691A i FIIG20210A

Dokazivanje polimorfizama FVG1691A i FIIG20210A provedeno je u uzorcima bolesnika s hemofilijom A, ali ne i u kontrolnoj skupini s obzirom da postoje literaturni podaci o prevalenciji polimorfizama u zdravoj populaciji (73).

Za dokazivanje polimorfizama korištena je analiza DNA metodom lančane reakcije polimerazom - polimorfizam duljine restrikcijskih ulomaka (engl. *polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism*, PCR – RFLP) gdje se najprije selektivno umnoži dio izdvojene DNA iz leukocita periferne krvi a nakon toga umnoženi ulomci cijepaju restrikcijskim endonukleazama. Za svaku seriju ispitivanih uzoraka koristi se uzorak DNA poznatog genotipa kao pozitivna kontrola te voda kao negativna kontrola. Za umnažanje ulomaka korišten je automatizirani sustav Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems, SAD). Digestija umnoženih proizvoda provedena je tijekom 12 sati na 37°C restrikcijskim enzimom *Mnl*I (New England BioLabs, Hitchin, Velika Britanija) za FVG1691A i restrikcijskim enzimom *Hind*III (New England BioLabs, Hitchin, Velika Britanija) za FIIG20210A. Nakon elektroforetskog razdvajanja za FVG1691A ukazuju se ulomci od 93 i 157 pb (divlji tip, GG), ulomci od 93, 130 i 157 pb (heterozigot, GA) i ulomci od 130 i 157 pb (homozigot, AA). Primjer određivanja polimorfizama FVG1691A prikazan je na slici 4.7A. Rezultati očitavanja razdvojenih umnoženih ulomaka za FII20210A ukazuju na divlji tip GG (ulomak od 345 pb), heterozigot GA (ulomcii od 345 i 322 pb) i homozigot AA (ulomci od 322 i 23 pb). Primjer određivanja polimorfizama FIIG20210A prikazan je na slici 4.7B.



Slika 4.7 Utvrđivanje točkastih mutacija metodom PCR-RFLP nakon elektroforetskog odjeljivanja na agaroznom gelu i bojenja etidijevim bromidom. Za FVG1691A: vrpce od 1-5 i 7-11 - divlji tip (GG), vrpca 6 - heterozigot (GA), vrpca 12 - molekularni biljeg od 100 pb (A). Za FII20210A: vrpce od 2-4 i 6-11 - divlji tip (GG), vrpce 5 i 12 - heterozigot (GA), vrpca 1 - molekularni biljeg od 100 pb, vrpca 13 prikazuje negativnu kontrolu (B).

4.3. Statistička analiza

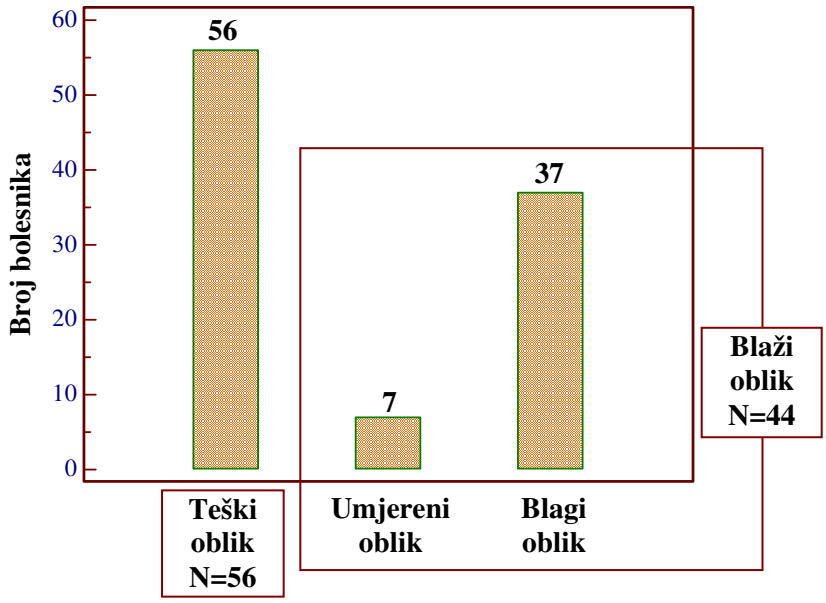
Za statističku analizu upotrijebljen je statistički program MedCalc® Statistical Software, verzija 9.3.2.0 (Mariakerke, Belgija). Za ispitivanje tipa razdiobe kvantitativnih varijabli upotrijebljen je Kolmogorov-Smirnovljev test. Podaci s normalnom raspodjelom prikazani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a podaci s asimetričnom raspodjelom medijanom i rasponom. Statistička značajnost razlike u vrijednostima ispitivanih parametara između skupina ispitana je, ovisno o tipu razdiobe, Studentovim t-testom ili Mann-Whitney testom za nezavisne uzorke. Za kvalitativne podatke, razlika u učestalosti pojavljivanja

između skupina ispitana je hi-kvadrat (χ^2) testom ili Fisherovim egzaktnim testom. Korelacija između dobivenih rezultata ispitana je računanjem Pearsonova korelacijskog koeficijenta ili Spearmanovom korelacijom ranga, ovisno o tipu razdiobe. Povezanost i mogući utjecaj prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika na endogeni trombinski potencijal i na pojedinačne kliničke pokazatelje ispitana je višestrukom regresijskom analizom. Logističkom regresijskom analizom ispitana je povezanost i utjecaj prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika na klinički fenotip. Usporedba ispitivanih metoda provedena je regresijskom analizom po Passing-Babloku, Wilcoxonovim testom za parne uzorke i grafičkim prikazom prema Bland-Altmanu. Za procjenu dijagnostičkih mogućnosti ispitivanih metoda upotrijebljena je analiza ROC (engl. *Receiver Operating Characteristic*) te ispitivanje korelacije dobivenih rezultata s pokazateljima kliničkog fenotipa. Kod svih bolesnika utvrđena je distribucija genotipova za FVG1691A i FIIG20210A te su izračunate učestalosti genotipova i alela. U svim upotrijebljenim testovima statistički značajnim rezultatima smatrani su rezultati s vrijednošću $P<0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Klinička obilježja bolesnika s hemofilijom A

U ispitivanje je uključeno 100 bolesnika koji boluju od hemofilije A, starosne dobi ≥16 godina, koji se liječe u Centru za hemofiliju Zavoda za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb. Na temelju dobivenih podataka Centra za hemofiliju, od 100 bolesnika uključenih u ovo ispitivanje 56 bolesnika (56%) bilo je iz skupine s teškim oblikom hemofilije A, 7 bolesnika (7%) s umjerenim oblikom hemofilije A i 37 bolesnika (37%) s blagim oblikom hemofilije A. S obzirom na mali broj bolesnika u skupini s umjerenim oblikom bolesti, te zbog slične kliničke slike s bolesnicima s blagim oblikom bolesti, ove su dvije skupine u daljnjem tekstu, statističkoj analizi i tumačenju dobivenih rezultata promatrane zajedno, kao jedna skupina (blaži oblik) (Slika 5.1).



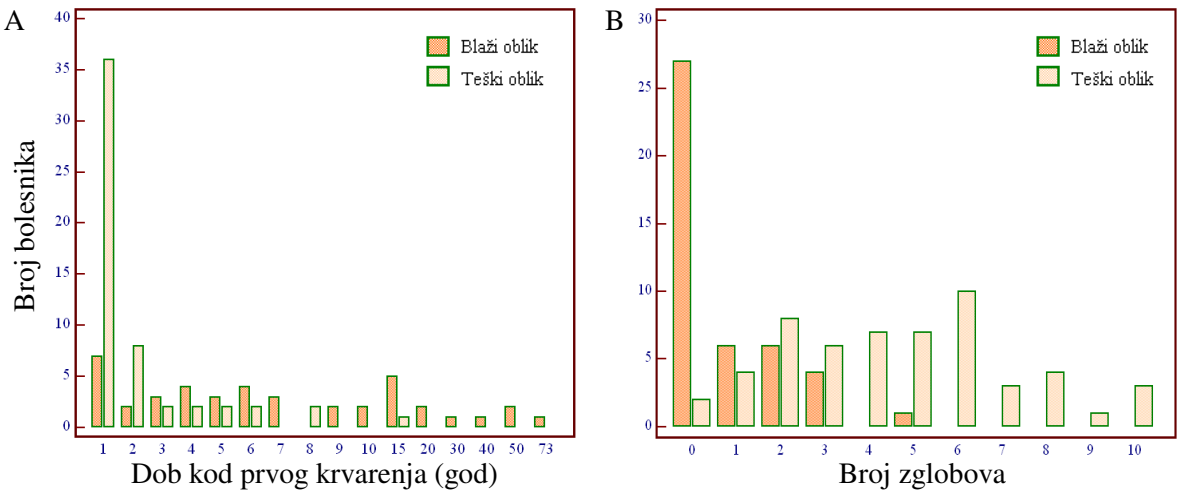
Slika 5.1 Raspodjela bolesnika s hemofilijom A s obzirom na težinu bolesti i podjela u dvije skupine (teški oblik i blaži oblik).

Na temelju pregleda medicinske dokumentacije prikupljeni su demografski i klinički podaci o bolesnicima (Tablica 5.1). U slučaju normalne razdiobe podaci su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom, te medijan s rasponom vrijednosti (minimalna i maksimalna vrijednost). U slučaju neparametrijske razdiobe podaci su prikazani kao medijan s rasponom vrijednosti.

Tablica 5.1 Demografski i klinički podaci o bolesnicima s hemofilijom A

	HEMOFILIJA A			
	Ukupno N=100	**Teški oblik N=56**	**Blaži oblik N=44**	**P**
Starosna dob				
N	100	56	44	
X ± SD (god)	38 ± 16	36,5 ± 13	40 ± 18,5	0,343
Medijan (raspon) (god)	37 (16-84)	36,5 (16-70)	39 (16-84)	
Dob kod prvog krvarenja				
N	97	55	42	
Medijan (raspon) (god)	1,9 (0,1-73)	1 (0,1-14)	6 (0,1-73)	<0,001
Broj zglobova zahvaćenih artropatijom				
N	99	55	44	
X ± SD		4,6 ± 2,6		
Medijan (raspon)	2 (0-10)	5 (0-10)	0 (0-5)	<0,001
Prosječan godišnji broj krvarenja				
N	94	51	43	
Medijan (raspon)	3 (0-180)	24 (0-180)	0 (0-54)	<0,001
Prosječna godišnja potrošnja FVIII				
N	87	45	42	
X ± SD ($IUkg^{-1}$)		2910 ± 1513		
Medijan (raspon) ($IUkg^{-1}$)	1029 (0-5829)	3086 (214-5829)	0 (0-2743)	<0,001
Krvna grupa N (%)				
A	39 (41)	25 (46)	14 (33)	0,283
B	13 (13)	9 (17)	4 (10)	0,378
AB	5 (5)	3 (5)	2 (5)	1,000
0	39 (41)	17 (32)	22 (52)	0,063
RhD+ N (%)	82 (85)	46 (85)	36 (86)	0,827
RhD- N (%)	14 (15)	8 (15)	6 (14)	0,827

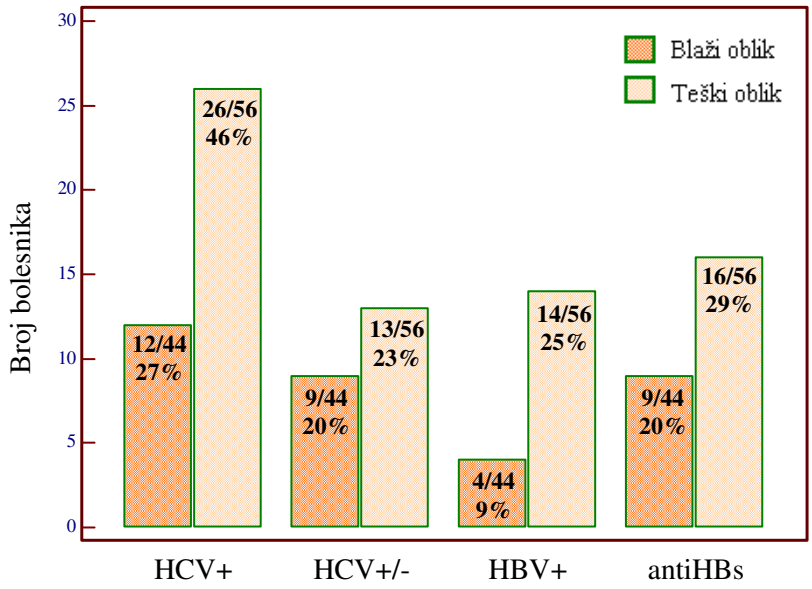
Na slici 5.2 prikazana je raspodjela dobi kod pojave prvog krvarenja u životu (A) i broja zglobova zahvaćenih hemofiličnom artropatijom (B), kod bolesnika s teškim i blažim oblikom bolesti.



Slika 5.2 Dob kod prvog krvarenja (A) i broj zglobova zahvaćenih hemofiličnom artropatijom (B) kod teškog i blažeg oblika hemofilije A.

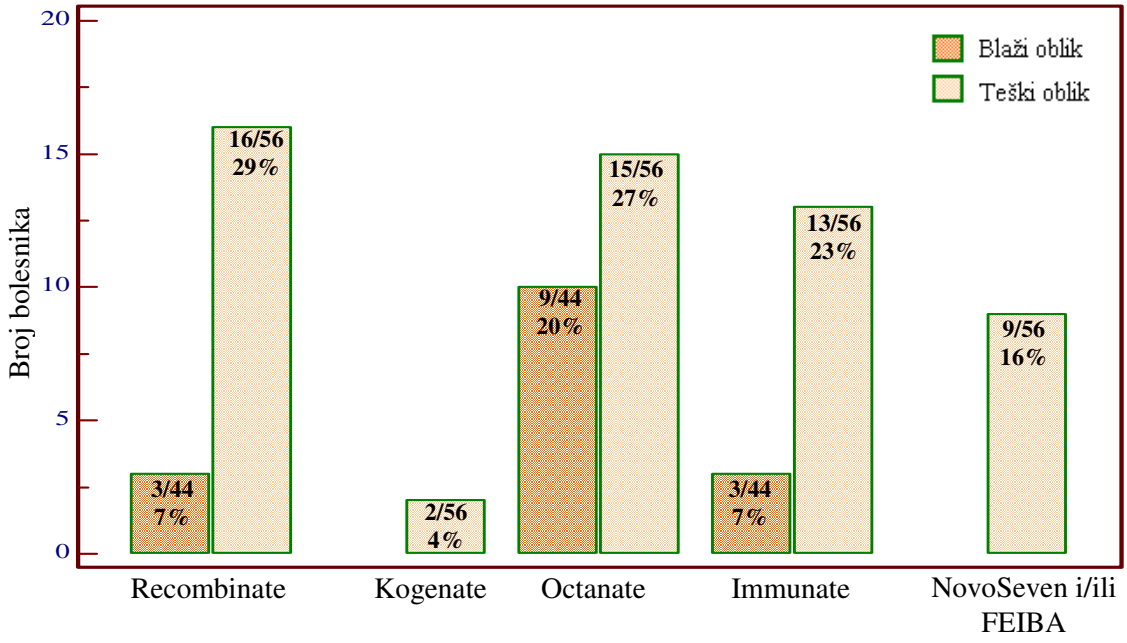
Kod ukupno 10 bolesnika (10%) nađeni su pozitivni anamnestički podaci o razvoju inhibitora na FVIII: 9 bolesnika iz skupine s teškim oblikom bolesti i 1 bolesnik iz skupine s blažim oblikom bolesti. Prema anamnestičkim podacima 3 bolesnika (3%) su imala inhibitore s niskim odgovorom, dok je 7 bolesnika (7%) imalo inhibitore s visokim odgovorom.

Kod 38/100 bolesnika (38%) nađen je pozitivan nalaz na HCV, dok je kod 22/100 bolesnika (22%) nakon liječenja antivirusnom terapijom prethodni pozitivan nalaz HCV bio negativan. Kod 18/100 bolesnika (18%) nađen je pozitivan nalaz na HBV, a pozitivna antitijela na virus hepatitisa B kod 25/100 bolesnika (25%). Antitijela su posljedica preboljelog hepatitisa B, ili, obično kod mlađih bolesnika, cijepljenja protiv hepatitisa B. Niti jedan bolesnik nije imao pozitivan nalaz na virus HIV-a. Raspodjela biljega hepatitisa u dvije skupine bolesnika s hemofilijom A prikazana je na slici 5.3.



Slika 5.3 Raspodjela biljega hepatitisa B i C između teškog i blažeg oblika hemofilije A.

Svi bolesnici iz skupine s teškim oblikom bolesti redovito su liječeni nadomjesnom terapijom (Recombinate, Kogenate, Octanate, Immunate) ili premošćivajućom terapijom (NovoSeven, FEIBA). Manji dio bolesnika s blažim oblikom bolesti (15/44, 34%) liječeno je samo povremeno, dok većina nije niti povremeno primala nadomjesnu terapiju. Na slici 5.4 prikazana je učestalost korištenja pojedinih pripravaka FVIII i premošćivajuće terapije u dvije skupine bolesnika s hemofilijom A.



Slika 5.4 Učestalost primjene pojedinih pripravaka FVIII i premošćivajuće terapije u dvije skupine bolesnika s hemofilijom A.

S obzirom na različit fenotipski izražaj bolesti, bolesnici s teškim oblikom hemofilije A su podijeljeni u 2 podskupine: podskupinu s težom kliničkom slikom (N=32) i podskupinu s blažom kliničkom slikom (N=23). Podjela je izvršena na temelju sljedećih podataka: broj zglobova zahvaćenih hemofiličnom artropatijom, prosječan godišnji broj krvarenja i prosječna godišnja potrošnja FVIII, a kao vrijednosti za razlučivanje korištene su vrijednosti medijana ovih parametara za cjelokupnu skupinu (Tablica 5.1). Bolesnici koji su za dva ili tri parametra imali vrijednost veću od medijana svrstani su u podskupinu s težom kliničkom slikom. Ostali su svrstani u podskupinu s blažom kliničkom slikom. Za jednog bolesnika nisu nađeni podaci na temelju kojih bi taj bolesnik bio svrstan u jednu od dviju podskupina. Dobivene vrijednosti kliničkih parametara za svaku podskupinu prikazane su u tablici 5.2. U slučaju normalne razdiobe podaci su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom, te medijan s rasponom vrijednosti (minimalna i maksimalna vrijednost). U slučaju neparametrijske razdiobe podaci su prikazani kao medijan s rasponom vrijednosti.

Tablica 5.2 Klinički pokazatelji u 2 podskupine bolesnika unutar skupine s teškim oblikom hemofilije A.

	HEMOFILIJA A - teški oblik N=56		**P**
	Teža klinička slika	**Blaža klinička slika**	
Starosna dob N X ± SD (god) Medijan (raspon) (god)	 32 40 ± 12 40 (16-70)	 23 32 ± 14 25 (18-65)	**0,015**
Dob kod prvog krvarenja N X ± SD (god) Medijan (raspon) (god)	 32 0,8 (0,1-14)	 23 2 ± 2 1 (0,1-8)	0,111
Broj zglobova zahvaćenih artropatijom N X ± SD Medijan (raspon)	 32 6 ± 2 6 (2-10)	 23 2 ± 1 2 (0-5)	**<0,001**
Prosječan godišnji broj krvarenja N X ± SD Medijan (raspon)	 30 57 ± 51 42 (0-180)	 21 16 ± 26 5 (0-108)	**<0,001**
Prosječna godišnja potrošnja FVIII N X ± SD ($IUkg^{-1}$) Medijan (raspon) ($IUkg^{-1}$)	 25 3573 ± 1234 4114 (1029-5829)	 20 2081 ± 1442 1971 (214-5486)	**<0,001**

5.2. Prokoagulacijski i fibrinolitički čimbenici

U tablici 5.3 prikazani su rezultati mjerenja APTV-a, prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika (FVIIIkgl, FVIIIch, aktivnost FXIII, inhibitora plazmina, PAI-1, plazminogena, TAFI, i VWF, te antigene koncentracije F1+2, TAFIa/ai i VWF) kod bolesnika s hemofilijom A i u kontrolnoj skupini. Statistički značajno više vrijednosti APTV-a, niža aktivnost FVIIIkgl, FVIIIch i plazminogena, te niža koncentracija TAFIa/ai nađene su u skupini bolesnika s hemofilijom A u odnosu na kontrolnu skupinu.

Tablica 5.3 Rezultati mjerenja APTV-a, prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika u bolesnika s hemofilijom A i u kontrolnoj skupini.

	Hemofilija A N=100	**Kontrolna skupina N=101**	**P**
APTV (s)	45,0 (25,9-105,5)†	26,0 ± 1,9*	**<0,001**
FVIIIch (kIU/L)‡	0,05 (0,004-1,73)†	1,10 ± 0,41*	**<0,001**
FVIIIkgl (kIU/L)§	0,09 (0,009-0,96)†	1,28 ± 0,38*	**<0,001**
FXIII (%)	96,5 ± 23,8*	101,1 ± 21,4*	0,151
F1+2 (pmol/L)	171,6 (78,3-1270,5)†	198,0 (60,2-1482,2)†	0,051
Inhibitor plazmina (%)	95,4 ± 10,1*	94,6 ± 9,6*	0,563
PAI-1 (kU/L)	3,27 ± 1,04*	3,38 ± 1,22*	0,511
Plazminogen (%)	102,7 ± 21,2*	108,9 ± 18,5*	**0,028**
TAFI (%) **TAFI-t (%)**	110,9 ± 24,2* N=81 110,5 ± 23,3*	112,9 (59,3-245,6)†	0,158 0,082
TAFIa/ai (µg/L) **TAFIa/ai-t (µg/L)**	23,5 ± 6,1* N=81 23,7 ± 6,3*	24,5 (14,7-55,1)†	**0,002** **0,010**
VWF:RCo (%)	127,0 ± 52,8*	133,8 ± 50,3*	0,349
VWF:Ag (%)	140,0 ± 60,4*	130,9 ± 43,0*	0,222

*srednja vrijednost ± standardna devijacija. †medijan (raspon). §vrijednosti za aktivnost FVIIIkgl<0,01 kIU/L uzete su kao 0,009 kIU/L. ‡Vrijednosti za aktivnost FVIIIch<0,004 kIU/L uzete kao 0,004 kIU/L.

Zbog nadomjesne terapije koja se kod bolesnika provodila i tijekom ovog istraživanja, aktivnost FVIII koja je izmjerena u krvi nije kod svih bolesnika odgovarala stvarnoj aktivnosti endogenog FVIII. Da bi se izbjegao utjecaj nadomjesne terapije na dobivene rezultate, statistički je posebno analizirana skupina bolesnika unutar skupine s teškim oblikom bolesti, koji nisu bili na nadomjesnoj terapiji (bolesnici čija je aktivnost FVIIIkgl bila <0,05 kIU/L,

dobivena je skupina od 36 bolesnika). Rezultati analiza unutar te skupine označeni su slovom „t“. Za parametre kod kojih je statističkom obradom utvrđena razlika u rezultatima nakon isključenja bolesnika koji su bili na nadomjesnoj terapiji, dobiveni rezultati su prikazani odvojeno (npr. TAFI i TAFI-t).

Rezultati mjerenja APTV-a, aktivnosti i koncentracije prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika, u dvije skupine bolesnika (teški i blaži oblik bolesti) prikazani su u tablici 5.4. Statistički značajno više vrijednosti APTV-a, PAI-1 i VWF:Ag, te niže aktivnosti FVIIIkgl, FVIIIch i FXIII, nađene su u skupini s teškim oblikom hemofilije A u odnosu na skupinu bolesnika s blažim oblikom bolesti.

Tablica 5.4 Rezultati mjerenja APTV-a, prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika u dvije skupine bolesnika s hemofilijom A.

	Teški oblik N=56	**Blaži oblik N=44**	**P**
APTV (s)	55,9 ± 15,4*	41,8 ± 4,9*	**<0,001**
FVIIIch (kIU/L)‡	0,008 (0,004-1,74)†	0,06 (0,008-0,94)†	**<0,001**
FVIIIkgl (kIU/L)§	0,02 (0,009-0,96)†	0,17 ± 0,14*	**<0,001**
FXIII (%)	90,8 ± 19,2*	103,8 ± 27,2*	**0,009**
F1+2 (pmol/L)	168,9 (80,6-1081,0)†	174,7 (78,3-1270,5)†	0,808
Inhibitor plazmina (%)	96,0 ± 10,9*	94,6 ± 9,2*	0,482
PAI-1 (kU/L)	3,46 ± 1,14*	3,04 ± 0,85*	**0,043**
Plazminogen (%)	105,4 ± 18,6*	99,2 ± 23,9*	0,151
TAFI (%) **TAFI-t (%)**	107,7 ± 23,1* N=37 105,1 ± 19,8*	115,0 ± 25,1*	0,135 0,055
TAFIa/ai (µg/L)	23,7 ± 7,1*	23,2 ± 4,7*	0,667
VWF:RCo (%)	135,1 ± 54,1*	116,6 ± 49,7*	0,082
VWF:Ag (%)	150,3 ± 67,9*	126,8 ± 46,9*	**0,043**

*srednja vrijednost ± standardna devijacija. †medijan (raspon). §vrijednosti za aktivnost FVIIIkgl<0,01 kIU/L uzete su kao 0,009 kIU/L. ‡Vrijednosti za aktivnost FVIIIch<0,004 kIU/L uzete kao 0,004 kIU/L.

Rezultati mjerenja APTV-a, prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika u dvije podskupine bolesnika s teškim oblikom bolesti (podskupine s težom i blažom kliničkom slikom) prikazani su u tablici 5.5. Statistički značajna razlika u rezultatima između bolesnika s težom i blažom kliničkom slikom dobivena je za APTV-t, VWF:Ag i plazminogen.

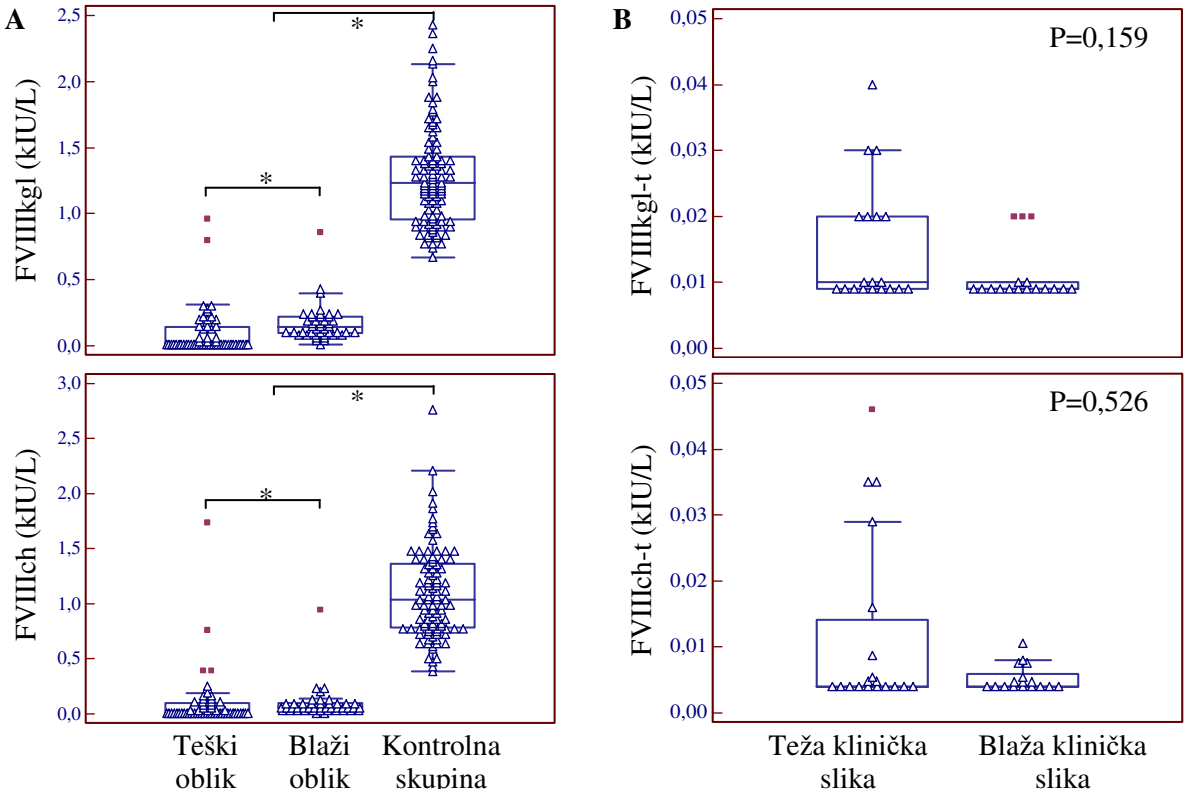
Tablica 5.5 Rezultati mjerenja APTV-a, prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika u dvije podskupine bolesnika s teškim oblikom hemofilije A.

	HEMOFILIJA A - teški oblik		**P**
	Teža klinička slika N=32	**Blaža klinička slika N=23**	
APTV (s) **APTV-t (s)**	55,4 ± 17,3* N=19 65,8 ± 13,1*	56,5 ± 12,9* N=17 63,1 ± 7,4*	0,799 **0,026**
FVIIIkgl (kIU/L)§	0,03 (0,01-0,96)†	0,01 (0,01-0,31)†	0,095
FVIIIch (kIU/L)‡	0,03 (0,004-1,74)†	0,005 (0,004-0,40)†	0,164
VWF:RCo (%)	145,6 ± 51,9*	121,3 ± 56,2*	0,104
VWF:Ag (%)	168,7 ± 72,2*	126,3 ± 54,8*	**0,022**
F1+2 (pmol/L)	165,3 (80,6-1081,0)†	185,5 ± 64,0*	0,959
FXIII (%)	93,6 ± 20,6*	89,5 ± 14,8*	0,434
Plazminogen (%)	110,7 ± 20,5*	99,9 ± 12,2*	**0,019**
PAI-1 (kU/L)	3,41 ± 1,13*	3,56 ± 1,19*	0,759
Inhibitor plazmina (%)	95,5 ± 12,1*	96,6 ± 9,4*	0,726
TAFI (%)	106,7 ± 22,0*	109,5 ± 25,4*	0,662
TAFIa/ai (µg/L)	25,1 ± 7,9*	22,2 ± 5,6*	0,133

*srednja vrijednost ± standardna devijacija. †medijan (raspon). §vrijednosti za aktivnost FVIIIkgl<0,01 kIU/L uzete su kao 0,009 kIU/L. ‡Vrijednosti za aktivnost FVIIIch<0,004 kIU/L uzete kao 0,004 kIU/L.

5.3. Usporedba mjerenja aktivnosti FVIII koagulacijskom i kromogenom metodom

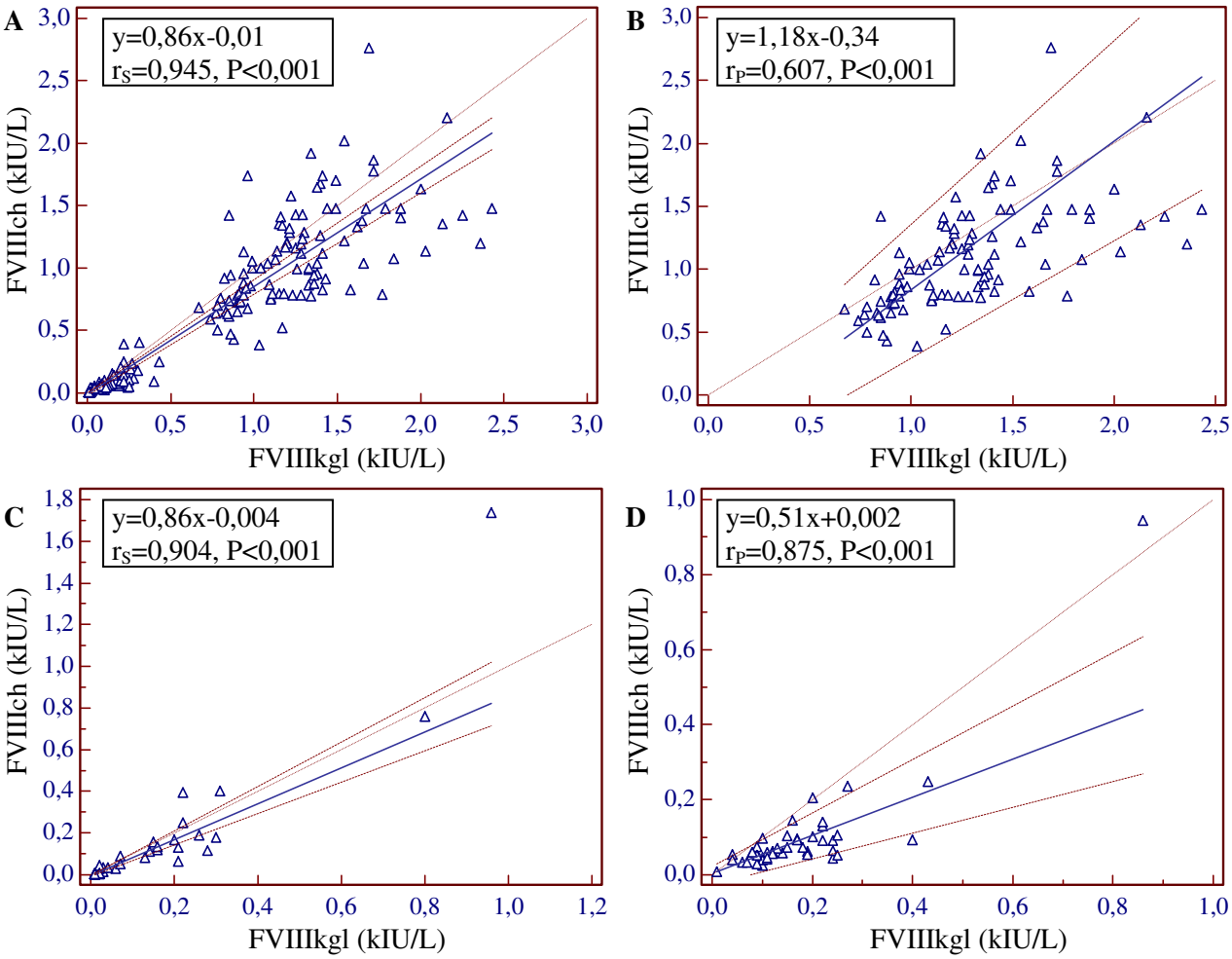
U svrhu usporedbe mjerenja aktivnosti FVIII koagulacijskom i kromogenom metodom, rezultati FVIIIkgl i FVIIIch prikazani su u tablicama 5.3, 5.4 i 5.5, a grafički su prikazani na slici 5.5. Nađena je statistički značajna razlika u vrijednostima FVIIIkgl i FVIIIch između dvije skupine bolesnika, kao i između skupine svih bolesnika i kontrolne skupine (A), dok razlika nije bila statistički značajna između podskupina s težom i blažom kliničkom slikom unutar teškog oblika bolesti (B).



Slika 5.5 Grafički prikaz („Box & Whisker“) rezultata mjerenja FVIIIkgl i FVIIIch u kontrolnoj skupini i u skupinama bolesnika s hemofilijom A (A), te u dvije podskupine bolesnika unutar skupine s teškim oblikom bolesti (B). (Prikazani su medijani s interkvartilnim rasponom, raspon, te vanjske i ekstremne vrijednosti).

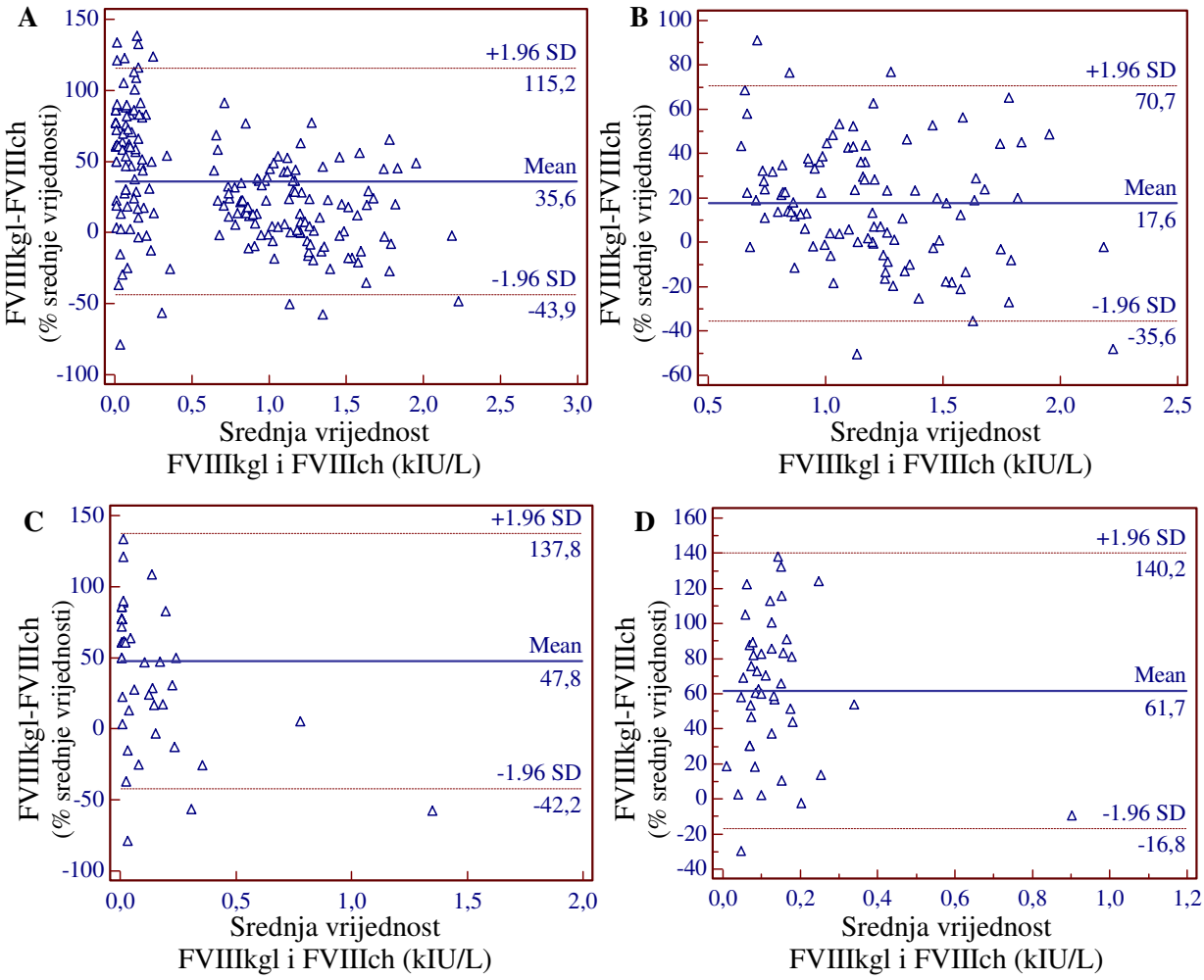
*- statistički značajna razlika, P<0,001

Korelacija dobivenih rezultata FVIIIkgl i FVIIIch i regresijska analiza po Passing-Babloku, u ukupnom broju uzoraka, kao i u pojedinačnim skupinama ispitanika prikazana je na slici 5.6. Usporedba dviju metoda prema Bland-Altmanu u ukupnom broju uzoraka kao i u pojedinačnim skupinama ispitanika prikazana je na slici 5.7.



Slika 5.6 Regresijska analiza po Passing-Babloku dviju metoda za mjerenje aktivnosti FVIII: u ukupnom broju uzoraka (A), kontrolnoj skupini (B) skupini bolesnika s teškim (C) i blažim oblikom bolesti (D).

(r_P – Pearsonov koeficijent korelacije; r_S – Spearmanov koeficijent korelacije)



Slika 5.7 Grafički prikaz prema Bland-Altmanu za usporedbu koagulacijske i kromogene metode za mjerenje aktivnosti FVIII, u ukupnom broju uzoraka (A), kontrolnoj skupini (B) skupini bolesnika s teškim (C) i blažim oblikom bolesti (D).

Wilcoxon testom za parne uzorke pokazana je statistički značajna razlika (P<0,001) između FVIIIkgl i FVIIIch u ukupnom broju uzoraka, kao i u pojedinačnim skupinama ispitanika. Napravljena je i korelacija rezultata APTV-a, FVIIIkgl i FVIIIch s kliničkim pokazateljima u skupinama bolesnika s hemofilijom A. Rezultati su prikazani u tablici 5.6.

Tablica 5.6 Korelacija rezultata APTV-a, FVIIIkgl i FVIIIch s kliničkim pokazateljima.

	Dob kod prvog krvarenja r_S (P)	**Broj zglobova zahvaćenih artropatijom r_S (P)**	**Prosječan godišnji broj krvarenja r_S (P)**	**Prosječna godišnja potrošnja FVIII r_S (P)**
APTV	**N=97**	**N=99**	**N=94**	N=87
	-0,266 (0,009)	**0,318 (0,002)**	**0,346 (<0,001)**	0,182 (0,091)
APTV-t	**N=78**	**N=80**	**N=75**	**N=26**
	-0,530 (<0,001)	**0,656 (<0,001)**	**0,649 (<0,001)**	**0,680 (<0,001)**
FVIIIkgl	**N=97**	**N=99**	**N=94**	N=87
	0,297 (0,004)	**-0,261 (0,010)**	**-0,328 (0,002)**	-0,209 (0,052)
FVIIIkgl-t	**N=78**	**N=80**	**N=75**	**N=68**
	0,568 (<0,001)	**-0,581 (<0,001)**	**-0,604 (<0,001)**	**-0,688 (<0,001)**
FVIIIch	N=97	N=99	N=94	N=87
	0,193 (0,058)	-0,199 (0,049)	-0,218 (0,036)	-0,084 (0,438)
FVIIIch-t	**N=78**	**N=80**	**N=75**	**N=68**
	0,521 (<0,001)	**-0,597 (<0,001)**	**-0,568 (<0,001)**	**-0,619 (<0,001)**

r_S - Spearmanov koeficijent korelacije

5.4. Rezultati dokazivanja prisutnosti inhibitora na FVIII i kvantitativnog mjerenja titra inhibitora

U tablici 5.7 prikazani su rezultati dokazivanja prisutnosti i kvantitativnog mjerenja titra inhibitora kod bolesnika s hemofilijom A.

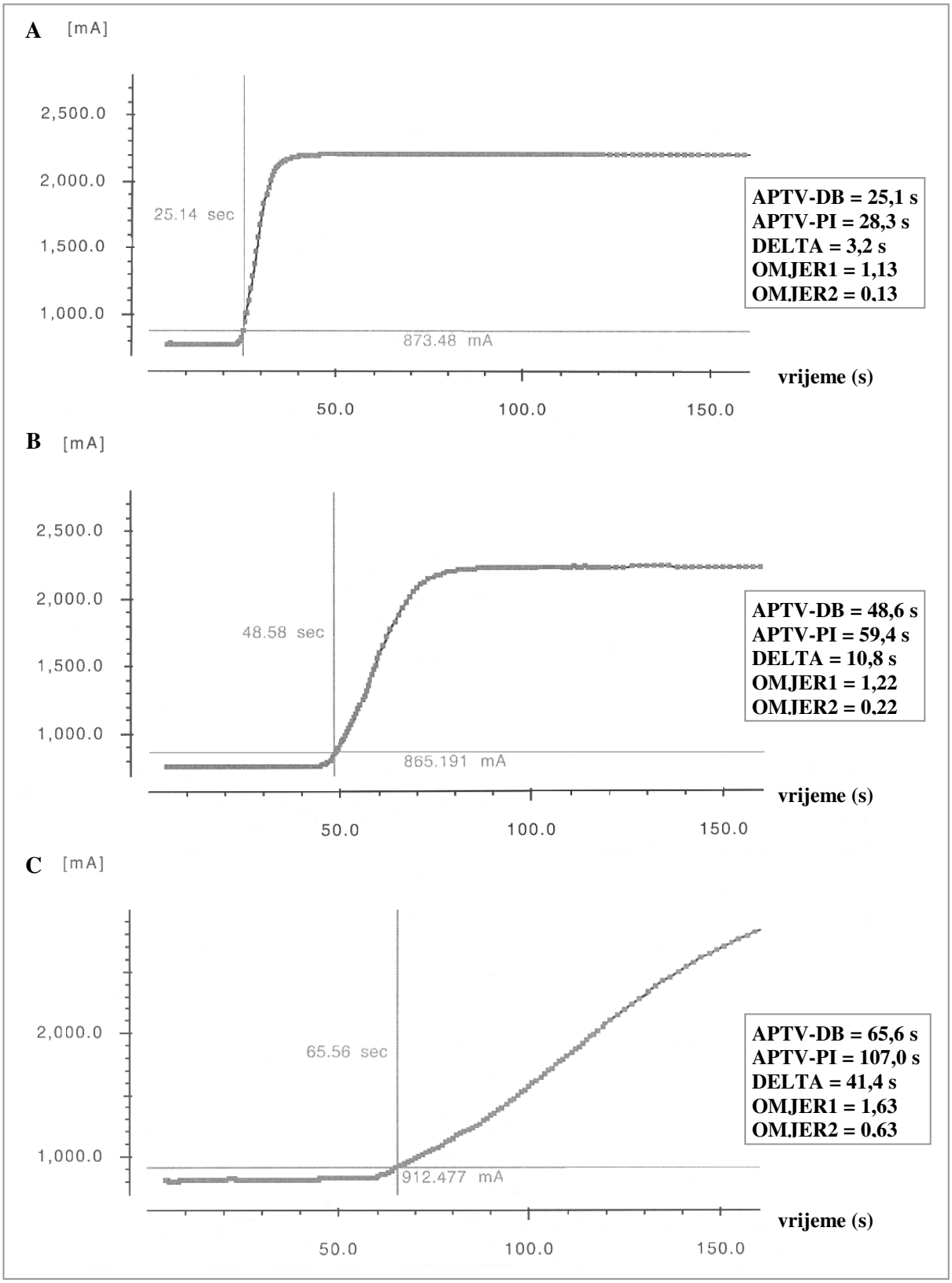
Tablica 5.7 Dokazivanje prisutnosti i kvantitativno mjerenje titra inhibitora na FVIII u dvije skupine bolesnika s hemofilijom A

Inhibitori na FVIII	**Teški oblik N=56**	**Blaži oblik N=44**	**Ukupno N=100**
Negativni, N (%)	50 (89,3)	43 (9,7)	93 (93)
Pozitivni, N (%)	6 (10,7)	1 (2,3)	7 (7)
Titar (NBU/mL)	22,5 ± 45,4	0,74	19,4 ± 42,2
Inhibitori s niskim odgovorom / inhibitori s visokim odgovorom, N/N	2/4	0/1	2/5

*srednja vrijednost ± standardna devijacija.

5.5. Rezultati analize reakcijske krivulje APTV-a

Analiza reakcijske krivulje prilagođenom metodom mAPTV izvršena je u svim uzorcima bolesnika i kontrolne skupine, a tipičan izgled krivulja kod zdravog ispitanika, bolesnika s blažim i teškim oblikom hemofilije A prikazan je na slici 5.8. Rezultati APTV-a, te izračunati kvantitativni parametri DELTA, OMJER1 i OMJER2 prikazani su u tablici 5.8.



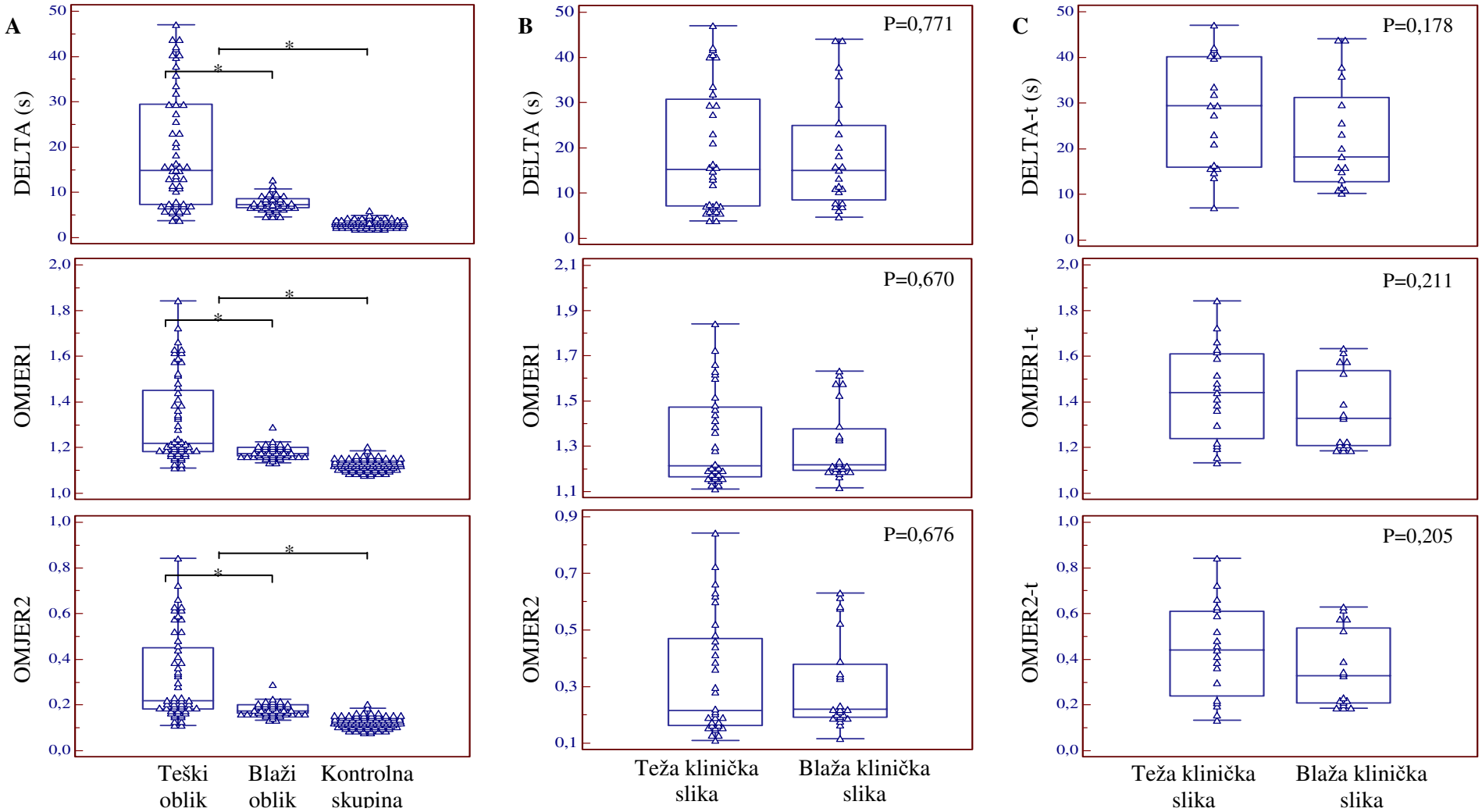
Slika 5.8 Analiza reakcijske krivulje APTV-a prilagođenom metodom mAPTV. Tipičan izgled krivulje kod zdravog ispitanika (A), bolesnika s blažim oblikom hemofilije A (B) i bolesnika s teškim oblikom hemofilije A (C), s pripadajućim rezultatima APTV-a i kvantitativnim parametrima DELTA, OMJER1 i OMJER2.

Tablica 5.8 Rezultati analize reakcijske krivulje APTV-a u kontrolnoj skupini, te u skupinama i podskupinama ispitanika s hemofilijom A.

	Kontrolna skupina N=101	**Hemofilija A ukupno N=100**	**Hemofilija A N=100**		**Hemofilija A teški oblik N=56**	
			Teški oblik N=56	**Blaži oblik N=44**	**Teža klinička slika N=32**	**Blaža klinička slika N=23**
APTV-DB (s)	26,0 ± 1,9*	45,0 (25,9-105,5)†	55,9 ± 15,4*	41,8 ± 4,9*	55,4 ± 17,3*	56,5 ± 12,9*
APTV-PI (s)	29,3 ± 2,3*	53,5 (29,7-121,9)†	74,7 ± 25,2*	49,5 ± 6,3*	74,8 ± 27,5*	74,9 ± 23,0*
DELTA (s)	3,3 ± 0,7*	8,3 (3,8-47,0)†	14,9 (3,8-47,0)†	7,6 ± 1,7*	19,4 ± 14,0*	18,4 ± 12,2*
OMJER1	1,13 ± 0,02*	1,19 (1,11-1,84)†	1,22 (1,11-1,84)†	1,18 ± 0,03*	1,21 (1,11-1,84)†	1,22 (1,12-1,63)†
OMJER2	0,13 ± 0,02*	0,19 (0,11-0,84)†	0,22 (0,11-0,84)†	0,18 ± 0,03*	0,21 (0,11-0,84)†	0,22 (0,12-0,63)†

*srednja vrijednost ± standardna devijacija. †medijan (raspon).

Dobivena je statistički značajna razlika u vrijednostima kvantitativnih parametara DELTA, OMJER1 i OMJER2 između kontrolne skupine i skupine svih bolesnika s hemofilijom A, kao i između skupina bolesnika s teškim i blažim oblikom hemofilije A (Slika 5.9A). Usporedbom dobivenih vrijednosti DELTA, OMJER1 i OMJER2 između dvije podskupine bolesnika unutar skupine s teškim oblikom bolesti (skupina s težom i blažom kliničkom slikom), nije dobivena statistički značajna razlika (Slika 5.9B). Isključivanjem bolesnika koji su bili na nadomjesnoj terapiji dobivene su više vrijednosti parametara DELTA-t, OMJER1-t i OMJER2-t u skupini s težom kliničkom slikom u odnosu na skupinu s blažom kliničkom slikom (npr. za DELTA-t dobivene su 1,6x više vrijednosti), ali ta razlika također nije bila statistički značajna (Slika 5.9C).



Slika 5.9 Grafički prikaz („Box & Whisker“) raspodjele kvantitativnih parametara DELTA, OMJER1 i OMJER2 između kontrolne skupine i dvije skupine bolesnika s hemofilijom A (A), i između podskupina s težom i blažom kliničkom slikom (B). Grafički prikaz („Box & Whisker“) raspodjele kvantitativnih parametara DELTA-t, OMJER1-t i OMJER2-t između podskupina s težom i blažom kliničkom slikom (C). (Prikazani su medijani s interkvartilnim rasponom, raspon, te ekstremne i vanjske vrijednosti). *- statistički značajna razlika (P<0,001)

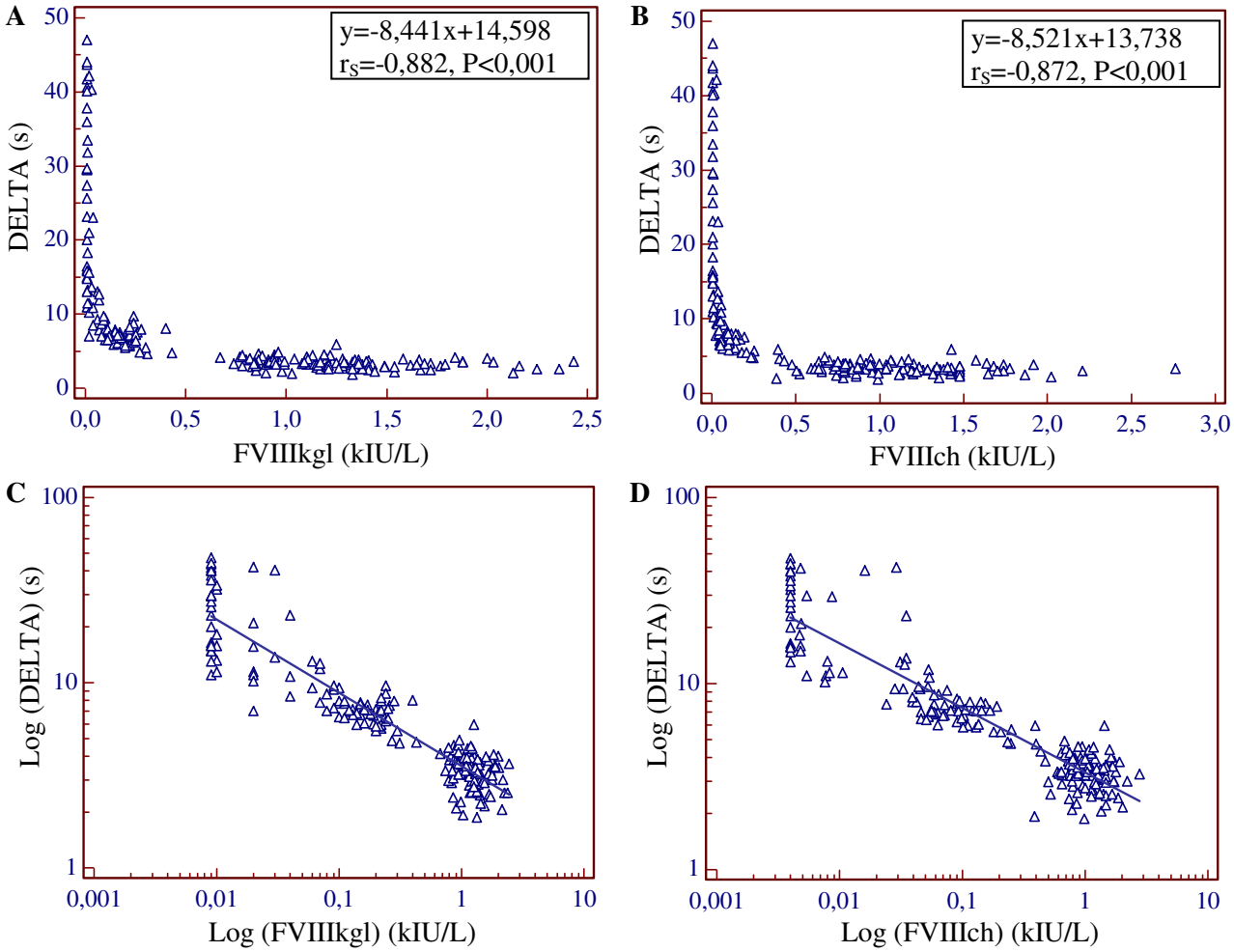
Rezultati metode analize reakcijske krivulje APTV-a uspoređeni su s rezultatima FVIIIkgl i FVIIIch. Tablica 5.9 prikazuje koeficijente korelacije u ukupnom broju uzoraka, kao i u pojedinačnim skupinama ispitanika. U skupinama gdje je logaritamskom transformacijom podataka dobivena bolja povezanost, dodatno su prikazani i koeficijenti korelacije nakon logaritamske transformacije. U ukupnom broju uzoraka nađena je vrlo dobra do izvrsna povezanost rezultata FVIIIkgl i FVIIIch sa sva tri parametra analize reakcijske krivulje. U skupini svih bolesnika s hemofilijom kao i u skupini bolesnika s teškim oblikom bolesti nađena je također vrlo dobra do izvrsna povezanost rezultata FVIIIkgl i FVIIIch s parametrom DELTA, dok je povezanost s OMJER1 i OMJER2 bila umjerena do dobra. U skupini bolesnika s blažim oblikom bolesti povezanost rezultata FVIIIkgl i FVIIIch s parametrom DELTA bila je umjerena do dobra, dok je povezanost s OMJER1 i OMJER2 bila slaba. U kontrolnoj skupini nije nađena statistički značajna povezanost rezultata FVIIIkgl i FVIIIch s parametrima DELTA, OMJER1 i OMJER2.

Tablica 5.9 Korelacija rezultata analize reakcijske krivulje s FVIIIkgl i FVIIIch.

		N	DELTA r (P)	OMJER1 r (P)	OMJER2 r (P)
Ispitanici ukupno	FVIIIkgl	201	**-0,882 (<0,001)**†	**-0,795 (<0,001)**†	**-0,795 (<0,001)**†
	FVIIIch		**-0,872 (<0,001)**†	**-0,793 (<0,001)**†	**-0,793 (<0,001)**†
Hemofilija A ukupno	FVIIIkgl	100	**-0,852 (<0,001)**†	**-0,682 (<0,001)**†	**-0,682 (<0,001)**†
	FVIIIch		**-0,871 (<0,001)**†	**-0,712 (<0,001)**†	**-0,712 (<0,001)**†
Hemofilija A teški oblik	FVIIIkgl	56	**-0,793 (<0,001)**† **-0,827 (<0,001)***‡	**-0,671 (<0,001)**†	**-0,674 (<0,001)**†
	FVIIIch		**-0,804 (<0,001)**† **-0,819 (<0,001)***‡	**-0,683 (<0,001)**†	**-0,684 (<0,001)**†
Hemofilija A blaži oblik	FVIIIkgl	44	**-0,537 (<0,001)*** **-0,676 (<0,001)***‡	-0,277 (0,069)* **-0,342 (0,023)***‡	-0,273 (0,073)* **-0,341 (0,024)***‡
	FVIIIch		**-0,473 (0,001)*** **-0,725 (<0,001)***‡	-0,267 (0,080)* **-0,395 (0,008)***‡	-0,264 (0,080)* **-0,408 (0,006)***‡
Kontrolna skupina	FVIIIkgl	101	-0,227 (0,023)*	-0,111 (0,269)*	-0,111 (0,269)*
	FVIIIch		-0,152 (0,128)*	-0,152 (0,128)*	-0,072 (0,477)*

r – koeficijent korelacije; P – statistička značajnost; *Pearsonov koeficijent korelacije; †Spearmanov koeficijent korelacije; ‡logaritamska transformacija podataka

Na slici 5.10 prikazana je linearna regresijska analiza ovisnosti parametra DELTA o FVIIIkgl (A) i FVIIIch (B) u skupini svih ispitanika. Nije dobivena potpuno linearna ovisnost, a jasniji linearni odnos postiže se logaritamskom transformacijom rezultata (slika 5.10 C i D).



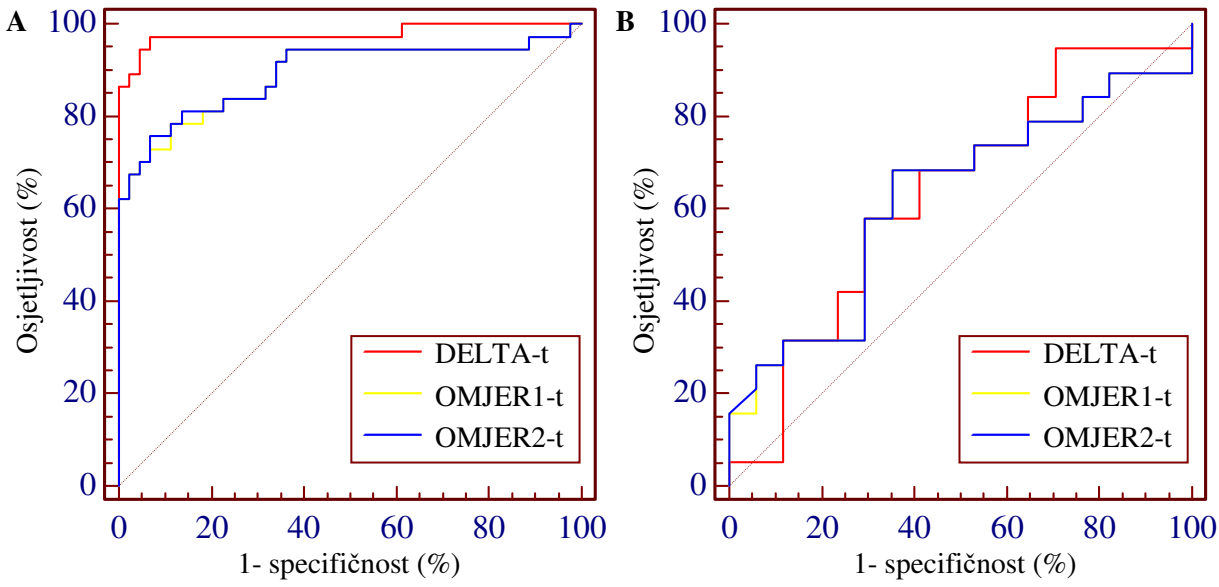
Slika 5.10 Linearna regresijska analiza ovisnosti parametra DELTA o FVIIIkgl (A) i FVIIIch (B) u ukupnom broju uzoraka. Utjecaj logaritamske transformacije rezultata DELTA i FVIIIkgl (C), te DELTA i FVIIIch (D).

U svrhu procjene dijagnostičkih mogućnosti metode analize reakcijske krivulje APTV-a u razlikovanju stupnja bolesti i fenotipskog izražaja kod teškog oblika hemofilije A, napravljena je ROC analiza. Rezultati su prikazani u tablici 5.10. Za sva tri parametra prikazane su dobivene površine ispod krivulje (AUC) s pripadajućim 95%-tnim intervalima pouzdanosti, optimalne granične vrijednosti, te vrijednosti za dijagnostičku osjetljivost i specifičnost.
Dobivene vrijednosti AUC pokazuju da je DELTA-t izvrstan, a OMJER1-t i OMJER2-t dobri parametri za razlikovanje stupnja bolesti hemofilije A, dok u razlikovanju podskupina na

temelju težine kliničke slike nemaju uspjeha (P>0,05). ROC krivulje su prikazane na slici 5.11.

Tablica 5.10 Rezultati ROC analize za metodu analize reakcijske krivulje APTV-a.

Parametar	AUC (95%CI)	P	Granična vrijednost	Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
Razlikovanje teškog i blažeg oblika hemofilije A					
DELTA (s)	0,768 (0,673-0,847)	<0,001	>10,8	66,1	95,5
DELTA-t (s)	0,979 (0,918-0,997)	<0,001	**>9,7**	97,3	93,2
OMJER1	0,731 (0,633-0,815)	<0,001	>1,22	46,4	97,7
OMJER1-t	0,891 (0,802-0,949)	<0,001	**>1,21**	78,4	88,6
OMJER2	0,733 (0,635-0,816)	<0,001	>0,22	51,8	93,2
OMJER2-t	0,894 (0,805-0,951)	<0,001	**>0,22**	75,7	93,2
Razlikovanje podskupina s težom i blažom kliničkom slikom					
DELTA-t (s)	0,632 (0,455-0,786)	0,158	>25,6	57,9	70,6
OMJER1-t	0,622 (0,446-0,778)	0,192	>1,34	68,4	64,7
OMJER2-t	0,624 (0,447-0,779)	0,186	>0,34	68,4	64,7



Slika 5.11 ROC krivulje za razlikovanje stupnja bolesti hemofilije A (A) i podskupina unutar teškog oblika hemofilije A (B) na temelju parametara analize reakcijske krivulje APTV-a (DELTA-t, OMJER1-t i OMJER2-t).

Napravljena je korelacija rezultata DELTA, OMJER1 i OMJER2 s kliničkim pokazateljima kod bolesnika s hemofilijom A. Nađena je slaba povezanost navedenih parametara s brojem zglobova zahvaćenih artropatijom, te slaba povezanost DELTA s prosječnim godišnjim brojem krvarenja. Isključivanjem bolesnika koji su na terapiji pripravcima FVIII dobivena je bolja povezanost sa svim kliničkim pokazateljima (Tablica 5.11).

Tablica 5.11 Korelacija rezultata DELTA, OMJER1 i OMJER2 s kliničkim pokazateljima.

	Dob kod prvog krvarenja r_S (P)	**Broj zglobova zahvaćenih artropatijom r_S (P)**	**Prosječan godišnji broj krvarenja r_S (P)**	**Prosječna godišnja potrošnja FVIII r_S (P)**
DELTA	N=97 -0,206 (0,043)	N=99 **0,336 (<0,001)**	N=94 **0,295 (0,004)**	N=87 0,212 (0,049)
DELTA-t	N=78 **-0,467 (<0,001)**	N=80 **0,689 (<0,001)**	N=75 **0,585 (<0,001)**	N=68 **0,667 (<0,001)**
OMJER1	N=97 -0,150 (0,143)	N=99 **0,297 (0,003)**	N=94 0,226 (0,029)	N=87 0,199 (0,064)
OMJER1-t	N=78 **-0,349 (0,002)**	N=80 **0,595 (<0,001)**	N=75 **0,456 (<0,001)**	N=68 **0,550 (<0,001)**
OMJER2	N=97 -0,151 (0,140)	N=99 **0,299 (0,003)**	N=94 0,227 (0,028)	N=87 0,201 (0,062)
OMJER2-t	N=78 **-0,351 (0,002)**	N=80 **0,597 (<0,001)**	N=75 **0,458 (<0,001)**	N=68 **0,553 (<0,001)**

r_S - Spearmanov koeficijent korelacije

Tablica 5.12 prikazuje kliničke pokazatelje kod bolesnika podijeljenih u dvije grupe na temelju rezultata analize reakcijske krivulje APTV-a. Kao granična vrijednost upotrijebljene su vrijednosti dobivene ROC analizom za parametre DELTA-t, OMJER1-t i OMJER2-t (Tablica 5.10). U slučaju normalne razdiobe podaci su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom, te medijan s rasponom vrijednosti (minimalna i maksimalna vrijednost). U slučaju neparametrijske razdiobe podaci su prikazani kao medijan s rasponom vrijednosti. Pokazana je statistički značajna razlika u svim kliničkim pokazateljima između dvije grupe bolesnika podijeljene na temelju rezultata DELTA, OMJER1 i OMJER2.

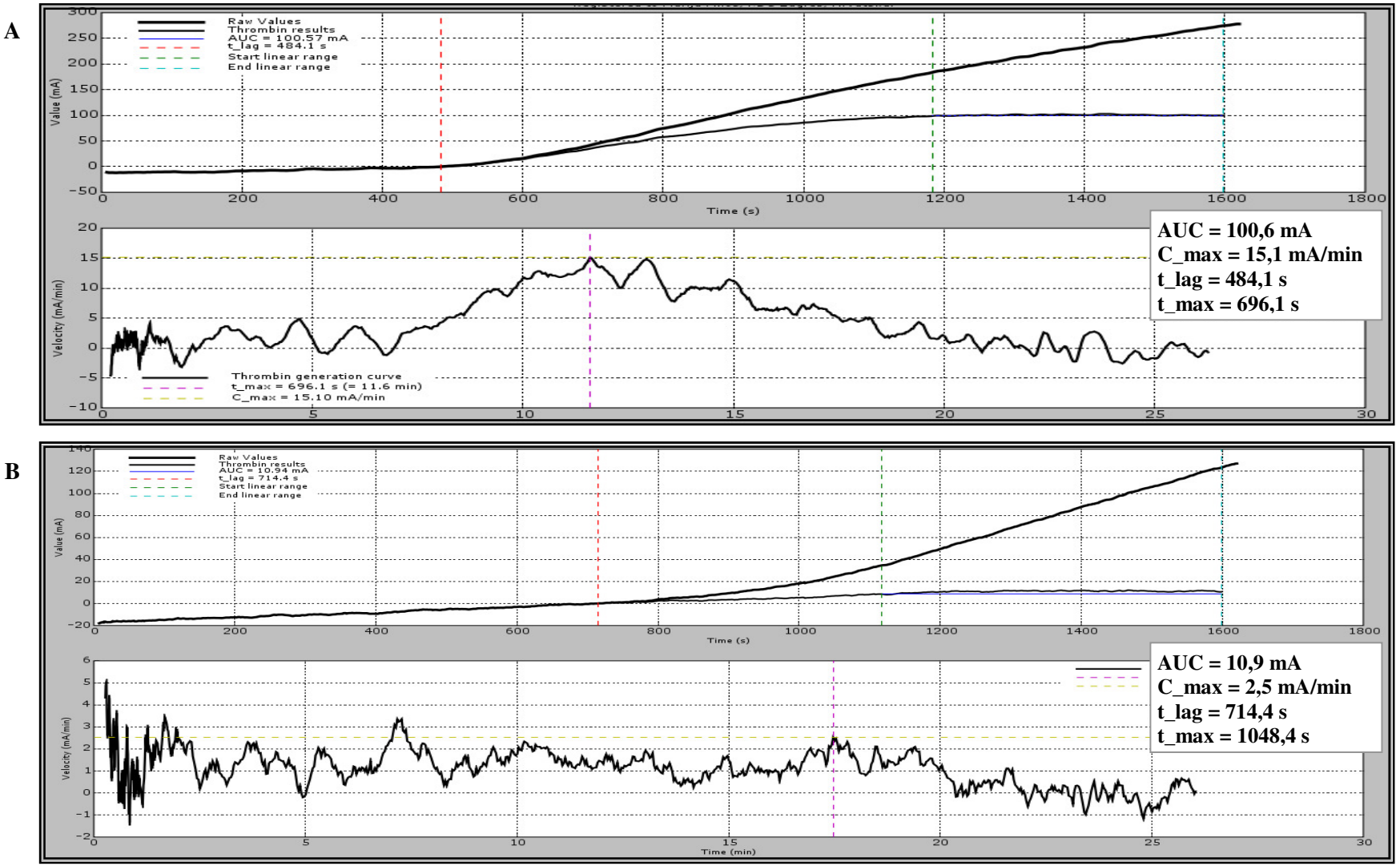
Tablica 5.12 Klinički pokazatelji u skupinama bolesnika s hemofilijom A dobivenima na temelju rezultata DELTA, OMJER1 i OMJER2.

	Dob kod prvog krvarenja (god)	**Broj zglobova zahvaćenih artropatijom**	**Prosječan godišnji broj krvarenja**	**Prosječna godišnja potrošnja FVIII ($IUkg^{-1}$)**
Grupa I DELTA>9,7	N=39 1 (0,1-15)	N=40 4,2 ±2,8 4 (0-10)	N=35 18 (0-180)	N=29 2316 ± 1470 2571 (0-5143)
Grupa II DELTA≤9,7	N=58 4 (0,1-73,0)	N=59 1 (0-10)	N=59 0 (0-180)	N=54 75 (0-5829)
P	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**0,001**
Grupa I OMJER1>1,21	N=33 1 (0,1-45)	N=34 4,0 ±2,7 3,5 (0-10)	N=30 18 (0-180)	N=26 2284 ± 1606 2400 (0-5143)
Grupa II OMJER1≤**1**,21	N=64 3 (0,1-73)	N=65 1 (0-10)	N=64 0 (0-180)	N=61 171 (0-5829)
P	**0,013**	**0,001**	**0,004**	**0,004**
Grupa I OMJER2>0,22	N=27 1 (0,1-14)	N=27 4,7 ±2,5 5,0 (1-10)	N=25 45 ± 52 24 (0-180)	N=22 2569 ± 1556 2743 (214-5143)
Grupa II OMJER2≤**0**,22	N=70 3 (0,1-73)	N=72 1 (0-10)	N=69 0 (0-180)	N=65 171 (0-5829)
P	**0,002**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**

5.6. Rezultati analize stvaranja trombina

Analiza stvaranja trombina metodom ETP-C izvršena je u uzorcima plazmi siromašnih trombocitima u kontrolnoj skupini i u skupini bolesnika s hemofilijom A, a tipičan izgled krivulje pretvorbe supstrata, krivulje kinetike slobodnog trombina i krivulje stvaranja trombina za ispitanika iz kontrolne skupine i bolesnika s teškim oblikom hemofilije A prikazan je na slici 5.12. Kinetičkom evaluacijom krivulja stvaranja trombina dobiveni su karakteristični kvantitativni parametri AUC, C_max, t_lag i t_max, i prikazani su u tablici 5.13.

Za parametre AUC i C_max dobivena je statistički značajna razlika između kontrolne skupine i skupine svih bolesnika, dok između skupina s teškim i blažim oblikom bolesti i između podskupina s težom i blažom kliničkom slikom nije nađena statistički značajna razlika. Isključivanjem bolesnika koji su bili na nadomjesnoj terapiji dobivena je statistički značajna razlika za AUC-t i C_max-t između kontrolne skupine i skupine svih bolesnika s hemofilijom A kao i između skupina bolesnika s teškim i blažim oblikom bolesti (Slika 5.13A). U podskupini s težom kliničkom slikom u odnosu na podskupinu s blažom kliničkom slikom dobivene su niže vrijednosti parametra C_max-t, te više vrijednosti t_lag-t i t_max-t, ali je razlika bila statistički značajna samo za t_max-t (Slika 5.13B).

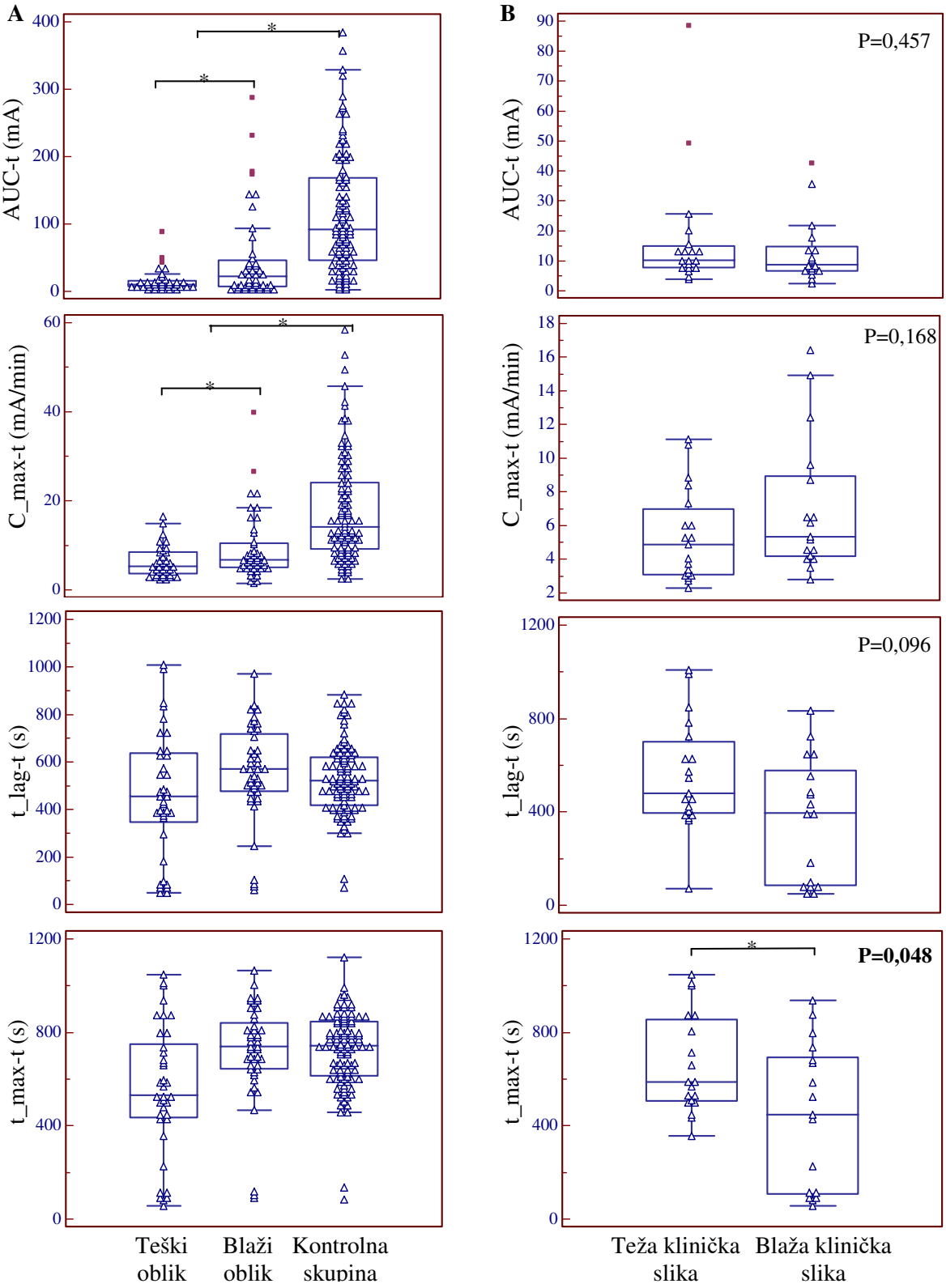


Slika 5.12 Analiza stvaranja trombina. Tipičan izgled krivulja dobivenih metodom ETP-C kod zdravog ispitanika (A) i bolesnika s teškim oblikom hemofilije (B) s pripadajućim kvantitativnim parametrima AUC, C_max, t_lag i t_max.

Tablica 5.13 Rezultati analize stvaranja trombina metodom ETP-C u kontrolnoj skupini, te u skupinama i podskupinama ispitanika s hemofilijom A.

	Kontrolna skupina N=101	**Hemofilija A ukupno N=100**	**Hemofilija A N=100**		**Hemofilija A teški oblik N=56**	
			Teški oblik N=56	**Blaži oblik N=44**	**Teža klinička slika N=32**	**Blaža klinička slika N=23**
AUC **AUC-t** (mA)	114,7 ± 87,7* 	16,4 (2,2-293,5)† N=81 13,1 (2,2-287,7)†	13,6 (2,4-293,5)† N=37 10,2 (2,4-88,5)†	22,3 (2,2-287,7)†	14,5 (3,9-293,5)† N=19 10,2 (3,9-88,5)†	13,5 (2,4-166,4)† N=17 13,1 ± 11,02*
C_max **C_max-t** (mA/min)	14,1 (2,4-58,4)† 	6,6 (1,4-45,7)† N=81 6,2 (1,4-39,9)†	6,5 (2,3-45,7)† N=37 6,2 ± 3,5*	6,8 (1,4-39,9)†	11,5 ± 11,6* N=19 5,4 ± 2,7*	8,7 ±5,5* N=17 7,0 ± 4,1*
t_lag **t_lag-t** (s)	530,5 ± 148,4* 	513,3 ± 219,5* N=81 512,9 ± 237,0*	479,3 ± 224,8* N=37 460,9 ± 261,7*	556,6 ± 207,1*	532,1 ± 197,5* N=19 555,0 ± 235,3*	413,8 ± 247,7* N=17 365,7 ± 264,5*
t_max **t_max-t** (s)	723,5 ± 161,6* 	662,6 ± 244,9* N=81 642,6 ± 257,8*	620,0 ± 261,2* N=37 554,1 ± 280,3*	717,0 ± 213,2*	687,1 ± 197,1* N=19 660,9 ± 231,2*	532,7 ± 316,9* N=17 439,1 ± 312,6*

*srednja vrijednost ± standardna devijacija. †medijan (raspon).



Slika 5.13 Grafički prikaz („Box & Whisker“) raspodjele kvantitativnih parametara AUC-t, C_max-t, t_lag-t i t_max-t između kontrolne skupine i dvije skupine bolesnika s hemofilijom A (A) i između dvije podskupine unutar teškog oblika bolesti (B) (Prikazani su medijani s interkvartilnim rasponom, raspon, te vanjske i ekstremne vrijednosti).

*- statistički značajna razlika

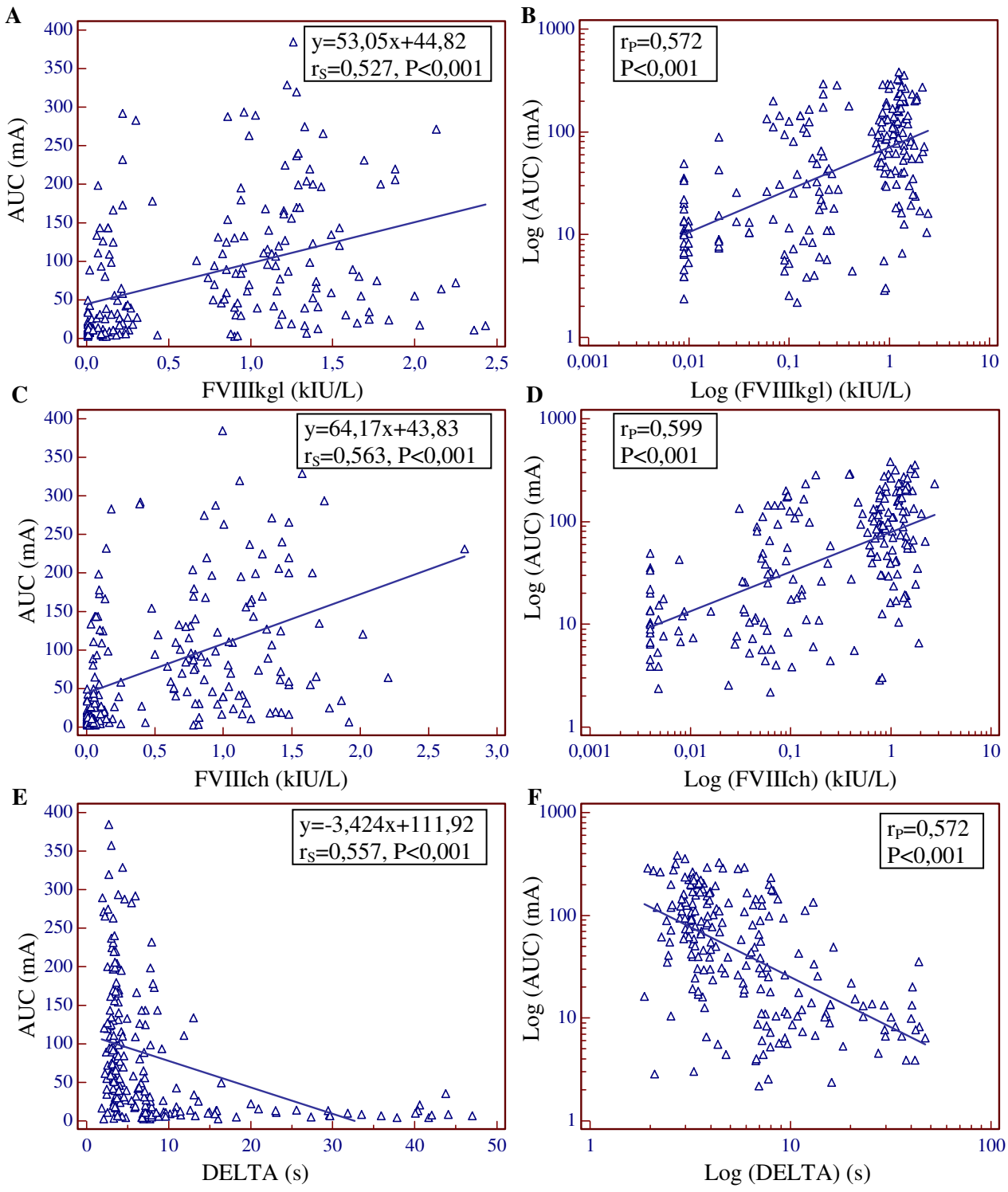
Metoda analize stvaranja trombina uspoređena je s FVIIIkgl i FVIIIch i metodom analize reakcijske krivulje APTV-a. U tu svrhu je napravljena korelacija dobivenih rezultata AUC, C_max, t_lag i t_max s FVIIIkgl i FVIIIch, te s parametrima DELTA, OMJER1 i OMJER2, u ukupnom broju uzoraka, kao i u pojedinačnim skupinama ispitanika. Tablica 5.14 prikazuje dobivene koeficijente korelacije u navedenim skupinama. U skupinama gdje je logaritamskom transformacijom podataka dobivena bolja povezanost, dodatno su prikazani i koeficijenti korelacije nakon logaritamske transformacije.

Na slici 5.14 prikazana je linearna regresijska analiza ovisnosti parametra AUC o FVIIIkgl (A), FVIIIch (C) i DELTA (E) u skupini svih ispitanika. Na slici su prikazani i grafovi linearne regresije nakon logaritamske transformacije rezultata (Slika 5.14 B,D i F).

Tablica 5.14 Korelacija rezultata analize stvaranja trombina (AUC, C_max, t_lag i t_max) s FVIIIkgl, FVIIIch te s DELTA, OMJER1 i OMJER2.

		AUC r (P)	**C_max r (P)**	**t_lag r (P)**	**t_max r (P)**
Ispitanici ukupno N=201	**FVIIIkgl**	**0,527 (<0,001)**† **0,572 (<0,001)***‡	**0,472 (<0,001)**† **0,496 (<0,001)***‡	0,083 (0,242)*	0,157 (0,026)*
	FVIIIch	**0,563 (<0,001)**† **0,599 (<0,001)***‡	**0,517 (<0,001)**† **0,529 (<0,001)***‡	0,008 (0,915)*	0,080 (0,257)*
	DELTA	**-0,557 (<0,001)**† **-0,571 (<0,001)***‡	**-0,500 (<0,001)**†	-0,091 (0,201)*	-0,241 (<0,001)*
	OMJER1	**-0,482 (<0,001)**†	**-0,420 (<0,001)**†	-0,076 (0,286)*	-0,205 (0,004)*
	OMJER2	**-0,482 (<0,001)**† **-0,492 (<0,001)***‡	**-0,420 (<0,001)**†	-0,076 (0,284)*	-0,205 (0,004)*
Hemofilija A ukupno N=100	**FVIIIkgl**	**0,406 (<0,001)**† **0,452 (<0,001)***‡	**0,327 (0,001)**† **0,378 (0,001)***‡	0,102 (0,314)*	0,229 (0,022)* **0,360 (<0,001)**†‡
	FVIIIch	**0,467 (<0,001)**† **0,515 (<0,001)***‡	**0,416 (<0,001)**† **0,453 (<0,001)***‡	-0,006 (0,949)*	0,075 (0,455)* **0,300 (0,003)**†‡
	DELTA	**-0,445 (<0,001)**†	**-0,395 (<0,001)**†	-0,099 (0,329)*	-0,238 (0,017)* **-0,255 (0,011)**†‡
	OMJER1	**-0,367 (<0,001)**†	**-0,369 (<0,001)**†	-0,081 (0,426)*	-0,192 (0,056)*
	OMJER2	**-0,370 (<0,001)**† **-0,371 (<0,001)***‡	**-0,371 (<0,001)**†	-0,081 (0,423)*	-0,193 (0,055)*
Hemofilija A teški oblik N=56	**FVIIIkgl**	**0,591 (<0,001)**† **0,683 (<0,001)***‡	**0,440 (0,001)**† **0,547 (<0,001)***‡	0,075 (0,585)*	0,230 (0,090)* **0,304 (0,024)**†‡
	FVIIIch	**0,573 (<0,001)**† **0,702 (<0,001)***‡	**0,504 (<0,001)**† **0,591 (<0,001)***‡	0,008 (0,954)*	0,106 (0,437)* **0,351 (0,009)**†‡
	DELTA	**-0,662 (<0,001)**† **-0,683 (<0,001)***‡	**-0,498 (<0,001)**† **-0,525 (<0,001)***‡	-0,028 (0,839)*	-0,207 (0,125)* **-0,304 (0,023)**†‡
	OMJER1	**-0,616 (<0,001)**†	**-0,459 (<0,001)**†	-0,027 (0,845)*	-0,168 (0,215)*
	OMJER2	**-0,618 (<0,001)**†	**-0,459 (<0,001)**†	-0,027 (0,842)*	0,169 (0,213)*
Hemofilija A blaži oblik N=44	**FVIIIkgl**	**0,549 (<0,001)***	**0,596 (<0,001)***	0,046 (0,768)*	0,116 (0,453)*
	FVIIIch	**0,311 (0,041)**† **0,371 (0,013)***‡	**0,304 (0,046)**† **0,388 (0,009)***‡	-0,045 (0,770)*	-0,003 (0,987)*
	DELTA	-0,199 (0,196)*	-0,236 (0,124)*	0,116 (0,454)*	0,042 (0,787)*
	OMJER1	-0,006 (0,970)*	-0,070 (0,654)*	0,196 (0,202)*	0,197 (0,200)*
	OMJER2	-0,004 (0,981)*	-0,068 (0,661)*	0,198 (0,198)*	0,201 (0,192)*
Kontrolna skupina N=101	**FVIIIkgl**	0,014 (0,886)*	0,013 (0,900)*	0,115 (0,252)*	-0,029 (0,775)*
	FVIIIch	0,133 (0,186)*	0,152 (0,129)*	-0,109 (0,276)*	-0,217 (0,029)*
	DELTA	-0,201 (0,044)*	-0,088 (0,379)*	0,094 (0,348)*	0,110 (0,274)*
	OMJER1	-0,055 (0,585)*	0,044 (0,664)*	0,064 (0,527)*	0,066 (0,510)*
	OMJER2	-0,055 (0,585)*	0,044 (0,664)*	0,064 (0,527)*	0,066 (0,510)*

r – koeficijent korelacije; P – statistička značajnost; *Pearsonov koeficijent korelacije; †Spearmanov koeficijent korelacije; ‡logaritamska transformacija podataka



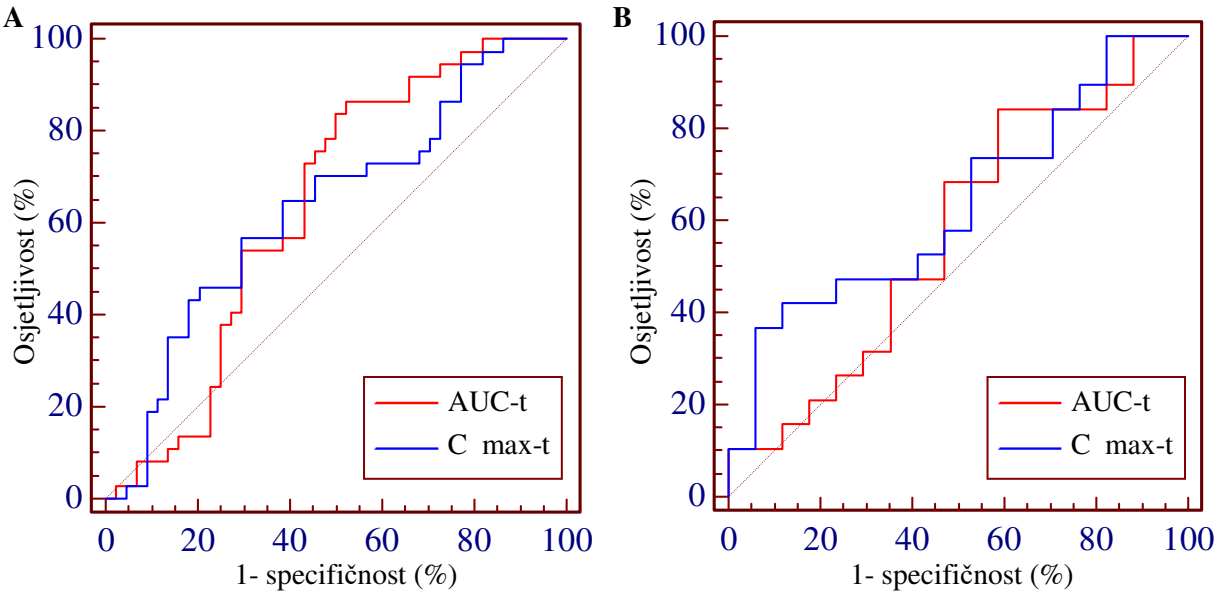
Slika 5.14 Linearna regresijska analiza ovisnosti parametra AUC o FVIIIkgl (A), FVIIIch (C) i DELTA (E). Linearna regresijska analiza nakon logaritamske transformacije rezultata AUC i FVIIIkgl (B), AUC i FVIIIch (D) te AUC i DELTA (F).

r_P-Pearsonov koeficijent korelacije; r_S-Spearmanov koeficijent korelacije

U svrhu procjene dijagnostičkih mogućnosti analize stvaranja trombina u razlikovanju stupnja bolesti i intenziteta kliničkog izražaja kod teškog oblika hemofilije A, napravljena je ROC analiza za parametre AUC i C_max (Tablica 5.15). Prikazane su dobivene površine ispod krivulje (AUC) s pripadajućim 95%-tnim intervalima pouzdanosti, optimalne granične vrijednosti, te vrijednosti za dijagnostičku osjetljivost i specifičnost. Rezultati pokazuju da su AUC-t i C_max-t slabiji parametri za razlikovanje stupnja bolesti hemofilije A, dok u razlikovanju podskupina na temelju težine kliničke slike parametri analize stvaranja trombina nemaju uspjeha (P>0,05). ROC krivulje su prikazane na slici 5.15.

Tablica 5.15 Rezultati ROC analize za parametre analize stvaranja trombina AUC i C_max.

Parametar	**AUC (95%CI)**	**P**	**Granična vrijednost**	**Osjetljivost (%)**	**Specifičnost (%)**
Razlikovanje teškog i blažeg oblika hemofilije A					
AUC (mA)	0,500 (0,399-0,602)	0,995	≤22,0	62,5	50,0
AUC-t (mA)	**0,637 (0,523-0,741)**	**0,026**	**≤25,6**	**86,5**	**47,7**
C_max (mA/min)	0,509 (0,407-0,610)	0,884	≤4,6	32,1	81,8
C_max-t (mA/min)	**0,635 (0,520-0,739)**	**0,029**	**≤5,3**	**56,8**	**70,5**
Razlikovanje podskupina s težom i blažom kliničkom slikom					
AUC-t (mA)	0,573 (0,397-0,736)	0,450	>7,4	84,2	41,2
C_max-t (mA/min)	0,635 (0,458-0,788)	0,151	≤3,4	36,8	94,1



Slika 5.15 ROC krivulje za razlikovanje stupnja bolesti hemofilije A (A) i podskupina unutar teškog oblika hemofilije A (B) na temelju parametara analize stvaranja trombina AUC-t i C_max-t.

Napravljena je korelacija rezultata AUC i C_max s kliničkim pokazateljima kod bolesnika s hemofilijom A. Nije nađena povezanost navedenih parametara s kliničkim pokazateljima. Isključivanjem bolesnika koji su na terapiji pripravcima FVIII nađena je slaba povezanost C_max-t s dobi kod prvog krvarenja (Tablica 5.16).

Tablica 5.16 Korelacija rezultata AUC i C_max s kliničkim pokazateljima.

	Dob kod prvog krvarenja r (P)	**Broj zglobova zahvaćenih artropatijom r (P)**	**Prosječan godišnji broj krvarenja r (P)**	**Prosječna godišnja potrošnja FVIII r (P)**
AUC	N=97 0,032 (0,758)†	N=99 0,052 (0,0,608)†	N=94 0,088 (0,395)†	N=87 0,163 (0,130)†
AUC-t	N=78 0,248 (0,029)†	N=80 -0,170 (0,130)†	N=75 -0,095 (0,415)†	N=68 -0,099 (0,419)†
C_max	N=97 0,084 (0,413)†	N=99 0,047 (0,638)†	N=94 0,056 (0,592)†	N=87 0,105 (0,330)†
C_max-t	N=78 **0,291 (0,011)**†	N=80 -0,173 (0,124)†	N=75 -0,129 (0,266)†	N=68 -0,112 (0,361)†

r – koeficijent korelacije; P – statistička značajnost; †Spearmanov koeficijent korelacije

Tablica 5.17 prikazuje kliničke pokazatelje kod bolesnika podijeljenih u dvije grupe na temelju rezultata analize stvaranja trombina. Kao granična vrijednost upotrijebljene su vrijednosti dobivene ROC analizom za parametre AUC-t i C_max-t (Tablica 5.15). U slučaju normalne razdiobe podaci su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom, te medijan s rasponom vrijednosti (minimalna i maksimalna vrijednost). U slučaju neparametrijske razdiobe podaci su prikazani kao medijan s rasponom vrijednosti. Nađena je statistički značajna razlika u kliničkim pokazateljima između dvije grupe bolesnika podijeljene na temelju rezultata AUC-t, ali ne i na temelju rezultata C_max-t.

Tablica 5.17 Klinički pokazatelji u skupinama bolesnika s hemofilijom A ovisno o rezultatima analize stvaranja trombina.

	Dob kod prvog krvarenja (god)	**Broj zglobova zahvaćenih artropatijom**	**Prosječan godišnji broj krvarenja**	**Prosječna godišnja potrošnja FVIII** ($IUkg^{-1}$)
Grupa I AUC-t≤25,6	N=54 1,5 (0,1-45)	N=55 3,0 ± 2,9 2,0 (0-10)	N=51 4 (0-180)	N=44 514 (0-5143)
Grupa II AUC-t>25,6	N=24 6,5 (0,5-73,0)	N=25 0 (0-6)	N=24 0 (0-180)	N=24 0 (0-5829)
P	**0,001**	**0,007**	**0,050**	**0,023**
Grupa I C_max-t≤5,3	N=32 1,5 (0,1-45)	N=32 3,0 ± 2,8 2,0 (0-9)	N=29 3,5 (0-180)	N=26 1314 ± 1556 471 (0-4114)
Grupa II C_max-t>5,3	N=46 4,5 (0,1-73,0)	N=48 1,0 (0-10)	N=46 0,5 (0-180)	N=42 171 (0-5829)
P	0,172	0,080	0,253	0,570

5.7. Povezanost prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika s endogenim trombinskim potencijalom

Povezanost prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika s endogenim trombinskim potencijalom ispitana je mjerenjem korelacije s parametrom AUC (Tablica 5.18).

Tablica 5.18 Korelacija rezultata prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika s endogenim trombinskim potencijalom AUC, r (P).

APTV (s)	FVIIIch (kIU/L)	FVIIIkgl (kIU/L)	FXIII (%)	F1+2 (pmol/L)	Inhibitor plazmina (%)	PAI-1 (kU/L)	Plazminogen (%)	TAFI (%)	TAFIa/ai (µg/L)	VWF:RCo (%)	VWF:Ag (%)
Ispitanici ukupno, N=201											
-0,600† **(<0,001)**	**0,563†** **(<0,001)**	**0,527†** **(<0,001)**	0,098* (0,167)	-0,083† (0,240)	0,015* (0,834)	-0,043* (0,539)	-0,002* (0,981)	0,126† (0,092)	<0,001† (0,997)	0,026* (0,711)	-0,030† (0,667)
Hemofilija A ukupno, N=100											
-0,461† **(<0,001)**	**0,467†** **(<0,001)**	**0,406†** **(<0,001)**	-0,022* (0,825)	-0,202† (0,044)	0,040* (0,689)	-0,011* (0,911)	-0,061* (0,546)	0,175* (0,082)	-0,074* (0,464)	0,059* (0,561)	0,067* (0,508)
Hemofilija A teški oblik, N=56											
-0,579* **(<0,001)**	**0,573†** **(<0,001)**	**0,591†** **(<0,001)**	0,078* (0,569)	-0,238† (0,078)	-0,012* (0,931)	-0,089* (0,513)	-0,041* (0,766)	0,089* (0,514)	-0,037* (0,785)	0,092* (0,502)	0,064* (0,641)
Hemofilija A blaži oblik, N=44											
-0,371* **(0,013)**	**0,311†** **(0,041)**	**0,549*** **(<0,001)**	-0,113* (0,466)	-0,157† (0,304)	0,125* (0,417)	0,124* (0,421)	-0,095* (0,540)	**0,303*** **(0,045)**	-0,160* (0,299)	<-0,001* (0,997)	0,065* (0,675)
Kontrolna skupina, N=101											
-0,411* **(<0,001)**	0,133* (0,186)	0,014* (0,886)	0,143* (0,154)	-0,125* (0,214)	0,027* (0,788)	-0,103* (0,303)	-0,073* (0,470)	0,084* (0,459)	-0,110* (0,275)	-0,047* (0,640)	-0,049* (0,628)

r – koeficijent korelacije; P – statistička značajnost; *Pearsonov koeficijent korelacije; †Spearmanov koeficijent korelacije

Napravljena je višestruka regresijska analiza kojom je ispitana povezanost više čimbenika (prokoagulacijskih i fibrinolitičkih) s AUC, te mogućnost predviđanja AUC, kao zavisne varijable, pomoću prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika, kao nezavisnih varijabli (Tablica 5.19). Od prokoagulacijskih čimbenika, kao značajan nezavisan prediktor AUC pokazan je FVIIIch, a od fibrinolitičkih čimbenika aktivnost TAFI. Druge varijable nisu bile značajni prediktori u ova 2 modela.

Tablica 5.19 Višestruka regresijska analiza između AUC i prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika.

	B±SE	**t**	**P**
Prokoagulacijski čimbenici			
APTV (s)	-1,15±0,62	-1,86	0,067
FVIIIkgl (kIU/L)	-0,32±94,53	<-0,01	0,997
FVIIIch (kIU/L)	**156,90±61,86**	**2,54**	**0,013**
F1+2 (pmol/L)	-0,02±0,04	-0,62	0,535
VWF:RCo (%)	0,12±0,22	0,54	0,592
VWF:Ag (%)	-0,06±0,19	-0,31	0,759
FVG1691A	-20,51±27,63	-0,74	0,460
Fibrinolitički čimbenici			
FXIII (%)	-0,09±0,34	-0,27	0,784
Inhibitor plazmina (%)	-0,03±0,75	-0,04	0,967
PAI-1 (kU/L)	-2,58±7,71	-0,33	0,739
Plazminogen (%)	-0,27±0,38	-0,71	0,477
TAFI (%)	**0,71±0,33**	**2,13**	**0,036**
TAFIa/ai (µg/L)	-1,15±1,25	-0,92	0,360

B – koeficijent beta, SE – standardna greška od B

5.8. Povezanost prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika s kliničkim izražajem kod hemofilije A

Povezanost prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika s kliničkim izražajem bolesti ispitana je mjerenjem korelacije s kliničkim parametrima (Tablica 5.20 i 5.21).

Tablica 5.20 Korelacija rezultata prokoagulacijskih čimbenika s kliničkim parametrima, r (P).

	APTV (s)	**FVIIIch (kIU/L)**	**FVIIIkgl (kIU/L)**	**F1+2 (pmol/L)**	**VWF:RCo (%)**	**VWF:Ag (%)**
Hemofilija A ukupno, N=100						
Dob kod prvog krvarenja (god)	**-0,266**† **(0,008)**	0,193† (0,058)	**0,297**† **(0,003)**	0,193† (0,058)	0,024* (0,812)	0,079* (0,443)
Broj zglobova zahvaćenih artropatijom	**0,318**† **(0,001)**	-0,199† (0,048)	**-0,261**† **(0,009)**	0,074† (0,469)	**0,285*** **(0,004)**	**0,319*** **(0,001)**
Prosječan godišnji broj krvarenja	**0,346**† **(<0,001)**	-0,218† (0,035)	**-0,328**† **(0,001)**	-0,027† (0,794)	0,063* (0,548)	0,087* (0,404)
Prosječna godišnja potrošnja FVIII ($IUkg^{-1}$)	0,182† (0,091)	-0,084† (0,441)	-0,209† (0,052)	-0,122† (0,259)	0,160* (0,140)	0,177* (0,102)
Hemofilija A teški oblik, N=56						
Dob kod prvog krvarenja (god)	0,119* (0,385)	-0,190† (0,164)	-0,125† (0,365)	**0,314**† **(0,020)**	**0,305*** **(0,023)**	**0,349*** **(0,009)**
Broj zglobova zahvaćenih artropatijom	0,058* (0,674)	0,071* (0,606)	0,086* (0,532)	0,026* (0,849)	0,237* (0,081)	**0,267*** **(0,049)**
Prosječan godišnji broj krvarenja	-0,062* (0,664)	0,101† (0,479)	0,096† (0,504)	-0,072† (0,614)	-0,013* (0,929)	-0,009* (0,949)
Prosječna godišnja potrošnja FVIII ($IUkg^{-1}$)	**-0,422*** **(0,004)**	**0,320*** **(0,032)**	**0,376*** **(0,011)**	0,006* (0,968)	0,066* (0,667)	0,131* (0,391)
Hemofilija A blaži oblik, N=44						
Dob kod prvog krvarenja (god)	-0,042* (0,793)	**0,308**† **(0,048)**	0,264* (0,091)	0,173† (0,274)	0,104* (0,512)	0,250* (0,110)
Broj zglobova zahvaćenih artropatijom	0,070* (0,654)	-0,061† (0,696)	0,086* (0,581)	0,171† (0,268)	0,239* (0,118)	0,227* (0,138)
Prosječan godišnji broj krvarenja	-0,089* (0,571)	-0,119† (0,446)	0,198* (0,202)	0,130† (0,405)	-0,139* (0,374)	-0,062* (0,691)
Prosječna godišnja potrošnja FVIII ($IUkg^{-1}$)	0,012* (0,938)	-0,142† (0,369)	0,004* (0,979)	-0,097† (0,543)	0,069* (0,666)	-0,187* (0,235)

Tablica 5.21 Korelacija rezultata fibrinolitičkih čimbenika s kliničkim parametrima, r (P).

	FXIII (%)	**Inhibitor plazmina (%)**	**PAI-1 (kU/L)**	**Plazminogen (%)**	**TAFI (%)**	**TAFIa/ai (µg/L)**
Hemofilija A ukupno, N=100						
Dob kod prvog krvarenja (god)	0,213* (0,036)	-0,068* (0,506)	0,002* (0,988)	0,070* (0,496)	**0,259* (0,010)**	0,202* (0,048)
Broj zglobova zahvaćenih artropatijom	-0,108* (0,286)	0,033* (0,749)	0,162* (0,109)	0,193* (0,055)	-0,218* (0,030)	0,132* (0,193)
Prosječan godišnji broj krvarenja	-0,063* (0,546)	0,033* (0,753)	0,020* (0,852)	0,198* (0,056)	-0,026* (0,804)	0,102* (0,328)
Prosječna godišnja potrošnja FVIII ($IUkg^{-1}$)	-0,166* (0,124)	0,014* (0,899)	0,077* (0,480)	0,158* (0,143)	-0,065* (0,550)	-0,046* (0,670)
Hemofilija A teški oblik, N=56						
Dob kod prvog krvarenja (god)	**0,294* (0,029)**	-0,021* (0,881)	0,153* (0,263)	0,179* (0,191)	0,018* (0,894)	**0,559* (<0,001)**
Broj zglobova zahvaćenih artropatijom	0,146* (0,289)	0,035* (0,797)	-0,001* (0,995)	0,118* (0,393)	-0,172* (0,210)	0,186* (0,175)
Prosječan godišnji broj krvarenja	0,160* (0,263)	-0,008* (0,953)	-0,146* (0,307)	0,203* (0,153)	0,045* (0,755)	0,096* (0,502)
Prosječna godišnja potrošnja FVIII ($IUkg^{-1}$)	0,103* (0,499)	-0,016* (0,918)	-0,089* (0,563)	0,177* (0,246)	0,078* (0,608)	-0,150* (0,326)
Hemofilija A blaži oblik, N=44						
Dob kod prvog krvarenja (god)	0,096* (0,547)	-0,078* (0,621)	0,141* (0,374)	0,166* (0,293)	**0,337* (0,029)**	**0,319* (0,039)**
Broj zglobova zahvaćenih artropatijom	0,091* (0,557)	-0,198* (0,198)	0,136* (0,377)	0,180* (0,243)	-0,180* (0,243)	-0,084* (0,589)
Prosječan godišnji broj krvarenja	-0,069* (0,658)	0,023* (0,886)	0,125* (0,423)	0,068* (0,667)	0,059* (0,709)	-0,014* (0,928)
Prosječna godišnja potrošnja FVIII ($IUkg^{-1}$)	0,010* (0,949)	-0,254* (0,105)	-0,276* (0,077)	-0,128* (0,418)	-0,063* (0,693)	-0,057* (0,721)

r – koeficijent korelacije; P – statistička značajnost; *Pearsonov koeficijent korelacije; †Spearmanov koeficijent korelacije

Napravljena je višestruka regresijska analiza kojom je ispitana povezanost prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika s kliničkim pokazateljima, te mogućnost predviđanja kliničkog pokazatelja, kao zavisne varijable, pomoću prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika, kao nezavisnih varijabli (Tablica 5.22).

Unutar skupine s teškim oblikom bolesti multiplom logističkom regresijskom analizom pokazano je da je od fibrinolitičkih parametara plazminogen značajan prediktor teškog kliničkog fenotipa (OR (95% CI) = 1,08 (1,017–1,147); P 0,012). Od prokoagulacijskih čimbenika niti jedan parametar nije potvrđen kao nezavisan prediktor teškog kliničkog fenotipa.

Tablica 5.22 Višestruka regresijska analiza između kliničkih pokazatelja i prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika.

	Dob kod prvog krvarenja (god)			**Broj zglobova zahvaćenih artropatijom**			**Prosječan godišnji broj krvarenja**			**Prosječna godišnja potrošnja FVIII** ($IUkg^{-1}$)		
	B±SE	**t**	**P**	**B±SE**	**t**	**P**	**B±SE**	**t**	**P**	**B±SE**	**t**	**P**
Prokoagulacijski čimbenici												
APTV (s)	0,04±0,10	0,37	0,712	**0,09±0,03**	**3,26**	**0,002**	0,71±0,49	1,43	0,156	21,25±24,36	0,87	0,386
FVIIIkgl (kIU/L)	**70,81±15,90**	**4,45**	**<0,001**	-3,00±4,06	-0,74	0,463	-59,17±67,57	-0,88	0,384	-4932,47±2966,35	-1,66	0,101
FVIIIch (kIU/L)	**-48,55±10,38**	**-4,68**	**<0,001**	4,72±2,65	1,78	0,079	74,07±42,96	1,72	0,088	**5280,86±1847,25**	**2,86**	**0,005**
F1+2 (pmol/L)	0,004±0,01	0,57	0,569	-0,0003±0,01	-0,17	0,863	0,01±0,03	0,21	0,831	-0,85±1,32	-0,64	0,523
VWF:RCo (%)	-0,0003±0,04	-0,01	0,993	-0,005±0,01	-0,54	0,591	-0,06±0,15	-0,39	0,695	-1,89±6,78	-0,28	0,781
VWF:Ag (%)	0,02±0,03	0,65	0,514	0,01±0,01	1,68	0,097	0,05±0,13	0,36	0,718	4,31±6,11	0,70	0,483
FVG1691A	6,56±4,63	1,42	0,160	-0,75±1,18	-0,63	0,528	-18,24±21,04	-0,87	0,389	123,46±903,25	0,14	0,892
Fibrinolitički čimbenici												
FXIII (%)	0,06±0,05	1,21	0,231	-0,02±0,01	-1,60	0,114	-0,32±0,20	-1,61	0,111	**-19,69±9,36**	**-2,10**	**0,039**
Inhibitor plazmina (%)	-0,14±0,11	-1,22	0,227	0,02±0,03	0,64	0,524	0,25±0,45	0,54	0,589	-2,36±19,78	-0,12	0,905
PAI-1 (kU/L)	-0,59±1,14	-0,52	0,603	0,39±0,28	1,37	0,175	-2,79±4,32	-0,64	0,520	68,74±195,90	0,35	0,727
Plazminogen (%)	-0,03±0,06	-0,50	0,618	**0,03±0,01**	**2,48**	**0,015**	**0,51±0,21**	**2,36**	**0,020**	**22,16±9,77**	**2,27**	**0,026**
TAFI (%)	**0,12±0,05**	**2,29**	**0,024**	**-0,04±0,01**	**-3,26**	**0,002**	-0,12±0,19	-0,63	0,530	-5,73±8,38	-0,68	0,496
TAFIa/ai (µg/L)	0,21±0,19	1,14	0,256	0,08±0,05	1,75	0,083	0,83±0,71	1,17	0,246	-12,47±37,85	-0,33	0,743

B – koeficijent beta, SE – standardna greška od B

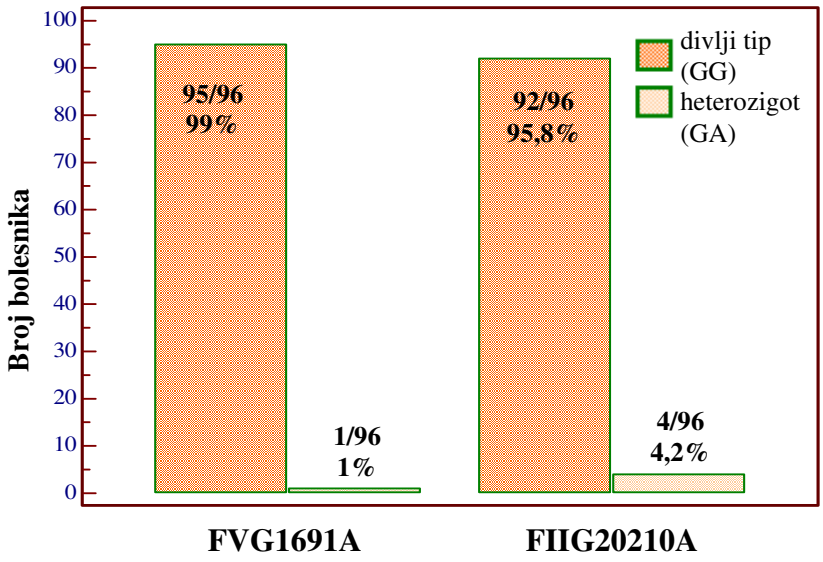
5.9. Utjecaj polimorfizama FVG1691A i FIIG20210A na endogeni trombinski potencijal i klinički izražaj kod hemofilije A

U uzorcima bolesnika s hemofilijom A ispitani su polimorfizmi FVG1691A i FIIG20210A. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 5.23 i na slici 5.16.

Tablica 5.23 Učestalost genotipova i alela za polimorfizme FVG1691A i FIIG20210A u skupinama bolesnika s hemofilijom A.

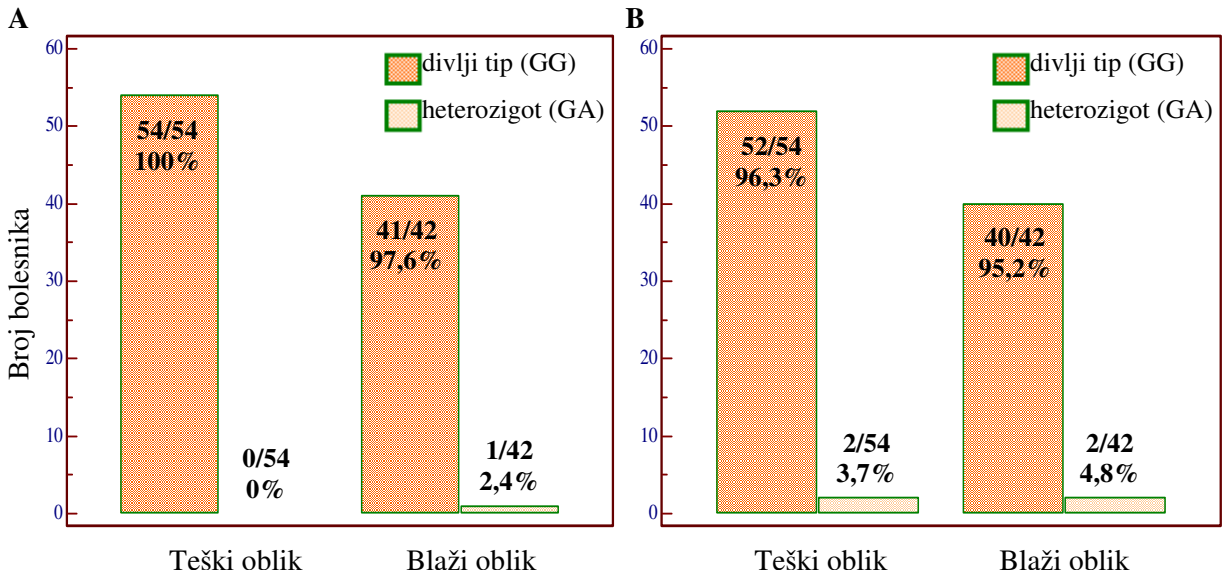
Polimorfizam	**N (%)**		
	Ukupno hemofilija A N=96	**Teški oblik N=54**	**Blaži oblik N=42**
Faktor VG1691A Genotip*			
GG	95 (99)	54 (100)	41 (97,6)
GA	1 (1)	0 (0)	1 (2,4)
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Aleli			
G	191 (99,5)	108 (100)	83 (98,8)
A	1 (0,5)	0 (0)	1 (1,2)
Faktor IIG20210A Genotip*			
GG	92 (95,8)	52 (96,3)	40 (95,2)
GA	4 (4,2)	2 (3,7)	2 (4,8)
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Aleli			
G	188 (97,9)	106 (98,1)	82 (97,6)
A	4 (2,1)	2 (1,9)	2 (2,4)

*GG – divlji tip, GA – heterozigot, AA – homozigot



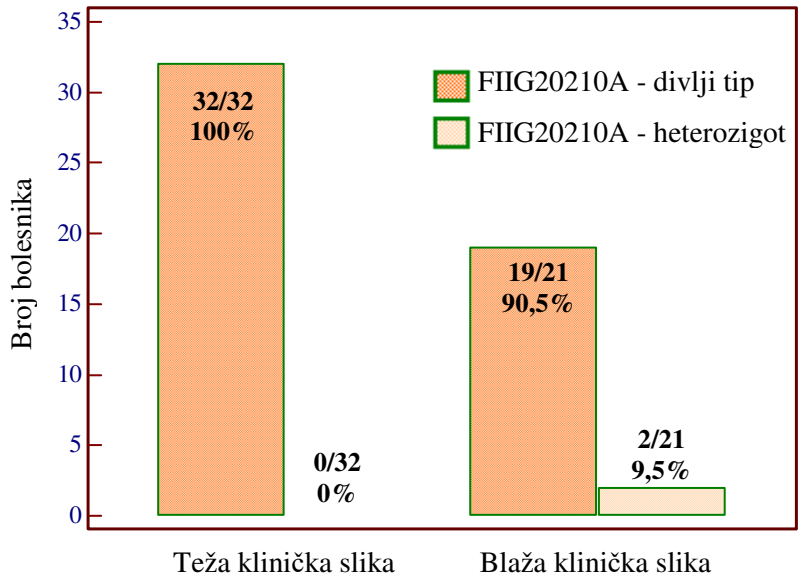
Slika 5.16 Rezultati ispitivanja polimorfizama FVG1691A i FIIG20210A kod bolesnika s hemofilijom A (N=96).

Niti kod jednog bolesnika s hemofilijom A nije nađen homozigotni oblik FVG1691A ili FIIG20210A, kao niti udružena mutacija na oba gena. Slika 5.17 prikazuje rezultate ispitivanja polimorfizama FVG1691A i FIIG20210A u dvije skupine bolesnika.



Slika 5.17 Rezultati ispitivanja polimorfizama FVG1691A (A) i FIIG20210A (B) u dvije skupine bolesnika s hemofilijom A.

U skupini bolesnika s teškim oblikom bolesti nije nađena mutacija FVG1691A, a od 2 bolesnika s mutacijom FIIG20210A, oba su bila iz podskupine s blažom kliničkom slikom. Razlika u učestalosti polimorfizma FIIG20210A između podskupina s težom i blažom kliničkom slikom nije bila statistički značajna (P=0,152) (Slika 5.18)



Slika 5.18 Učestalost polimorfizma FIIG20210A u dvije podskupine bolesnika unutar teškog oblika bolesti (Fisherov egzaktni test: P=0,152).

Tablica 5.24 prikazuje parametre analize stvaranja trombina i kliničke pokazatelje u skupinama bolesnika sa i bez FVG1691A i FIIG20210A. T-testom i Mann-Whitney testom za neovisne uzorke nije pokazana statistički značajna razlika u vrijednostima navedenih parametara između dvije skupine bolesnika.

Tablica 5.24 Vrijednosti parametara analize stvaranja trombina i klinički pokazatelji u skupinama bolesnika sa i bez FVG1691A i FIIG20210A.

	HEMOFILIJA A N=96		**P**
	Heterozigot N=5	**Divlji tip N=91**	
ETP-AUC (mA)	13,7 (6,6-31,3)†	15,5 (2,2-293,5)†	0,786
ETP-C_max (mA/min)	6,3 (4,0-8,7)†	6,7 (1,4-45,7)†	0,443
ETP-t_lag (s)	495,1 ± 282,8*	510,9 ± 219,7*	0,878
ETP-t_max (s)	638,2 ± 328,7*	663,6 ± 245,5*	0,826
Dob kod prvog krvarenja Medijan (raspon) (god)	N=5 2 (1-45)	N=88 1,7 (0,1-73)	0,319
Broj zglobova zahvaćenih artropatijom Medijan (raspon)	N=5 1 (0-3)	N=90 2 (0-10)	0,377
Prosječan godišnji broj krvarenja Medijan (raspon)	N=4 1 (0-3)	N=86 4 (0-180)	0,264
Prosječna godišnja potrošnja FVIII Medijan (raspon) ($IUkg^{-1}$)	N=4 707 (0-4114)	N=80 1286 (0-5829)	0,809

*srednja vrijednost ± standardna devijacija. †medijan (raspon).

5.10. Utjecaj krvne grupe na endogeni trombinski potencijal i klinički izražaj kod hemofilije A

U svrhu ispitivanja mogućeg utjecaja krvne grupe 0 na endogeni trombinski potencijal i klinički izražaj kod hemofilije A, skupina svih bolesnika podijeljena je u dvije skupine: skupinu bolesnika s krvnom grupom 0 (N=39) i skupinu bolesnika s ostalim krvnim grupama (N=57). Između dobivenih skupina napravljena je statistička analiza parametara analize stvaranja trombina i kliničkih pokazatelja, kao i aktivnosti FVIII, te aktivnosti i antigena VWF. Dobivena je statistički značajna razlika u vrijednostima FVIIIch, te VWF:RCo i VWF:Ag između dvije skupine, dok za parametre analize stvaranja trombina i kliničke pokazatelje razlika nije bila statistički značajna. Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 5.25.

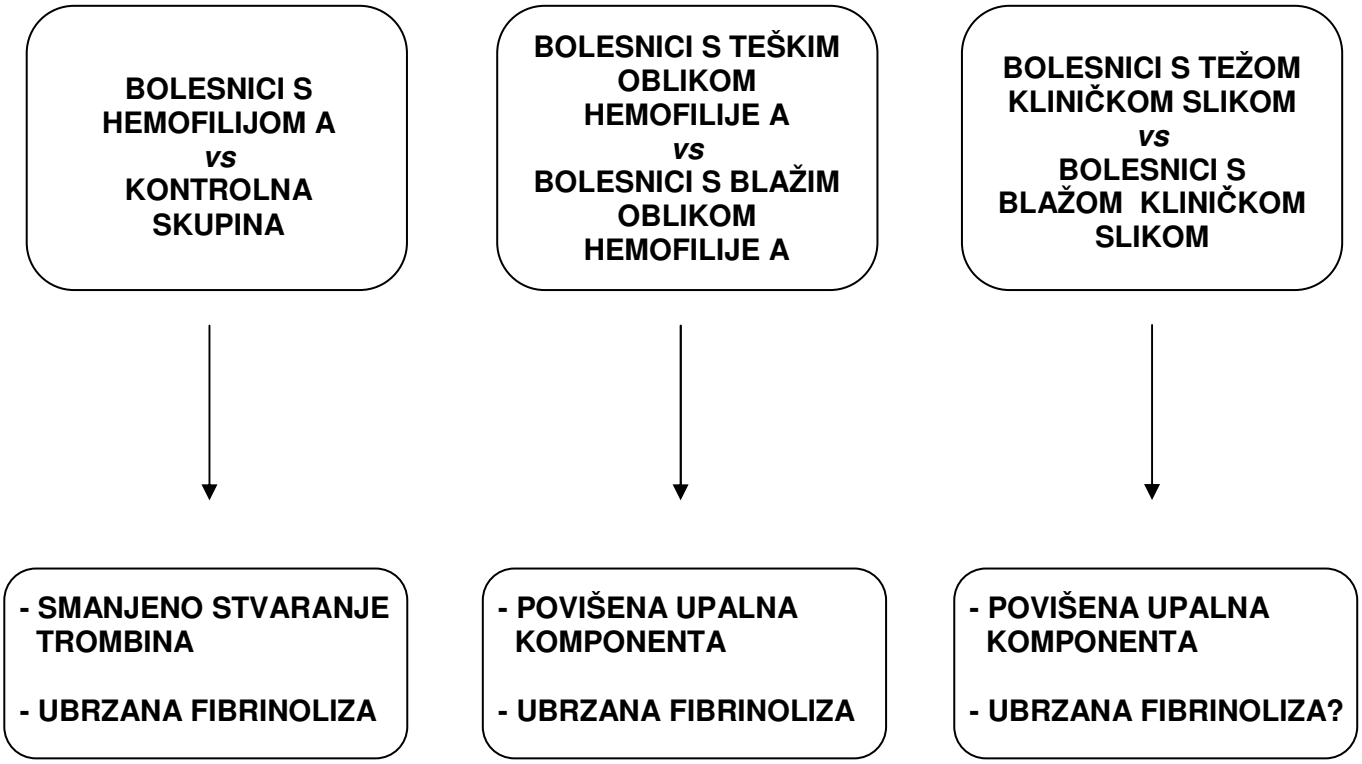
Tablica 5.25 Vrijednosti parametara analize stvaranja trombina i kliničkih pokazatelja, te FVIIIkgl, FVIIIch, VWF:RCo i VWF:Ag u skupinama bolesnika podijeljenih na temelju krvnih grupa.

	HEMOFILIJA A N=96		**P**
	Krvna grupa 0 N=39	**Ostale krvne grupe N=57**	
ETP-AUC (mA)	21,7 (2,2-291,5)†	13,5 (2,4-293,5)†	0,436
ETP-C_max (mA/min)	10,5 ± 9,5*	6,5 (2,4-40,8)†	0,763
ETP-t_lag (s)	537,3 ± 205,7*	504,9 ± 233,3*	0,486
ETP-t_max (s)	685,1 ± 217,6*	648,8 ± 268,6*	0,485
Dob kod prvog krvarenja Medijan (raspon) (god)	N=38 2,0 (0,1-73)†	N=55 1,5 (0,1-45)†	0,851
Broj zglobova zahvaćenih artropatijom Medijan (raspon)	N=39 1 (0-8)†	N=56 3,5 ± 2,9*	0,200
Prosječan godišnji broj krvarenja Medijan (raspon)	N=37 1,5 (0-180)†	N=53 4 (0-180)†	0,303
Prosječna godišnja potrošnja FVIII Medijan (raspon) ($IUkg^{-1}$)	N=35 257 (0-5829)†	N=48 2010 ± 1851*	0,145
VWF:RCo (%)	103,8 ± 30,5*	144,5 ± 59,5*	**<0,001**
VWF:Ag (%)	116,6 ± 34,8*	156,8 ± 69,4*	**<0,001**

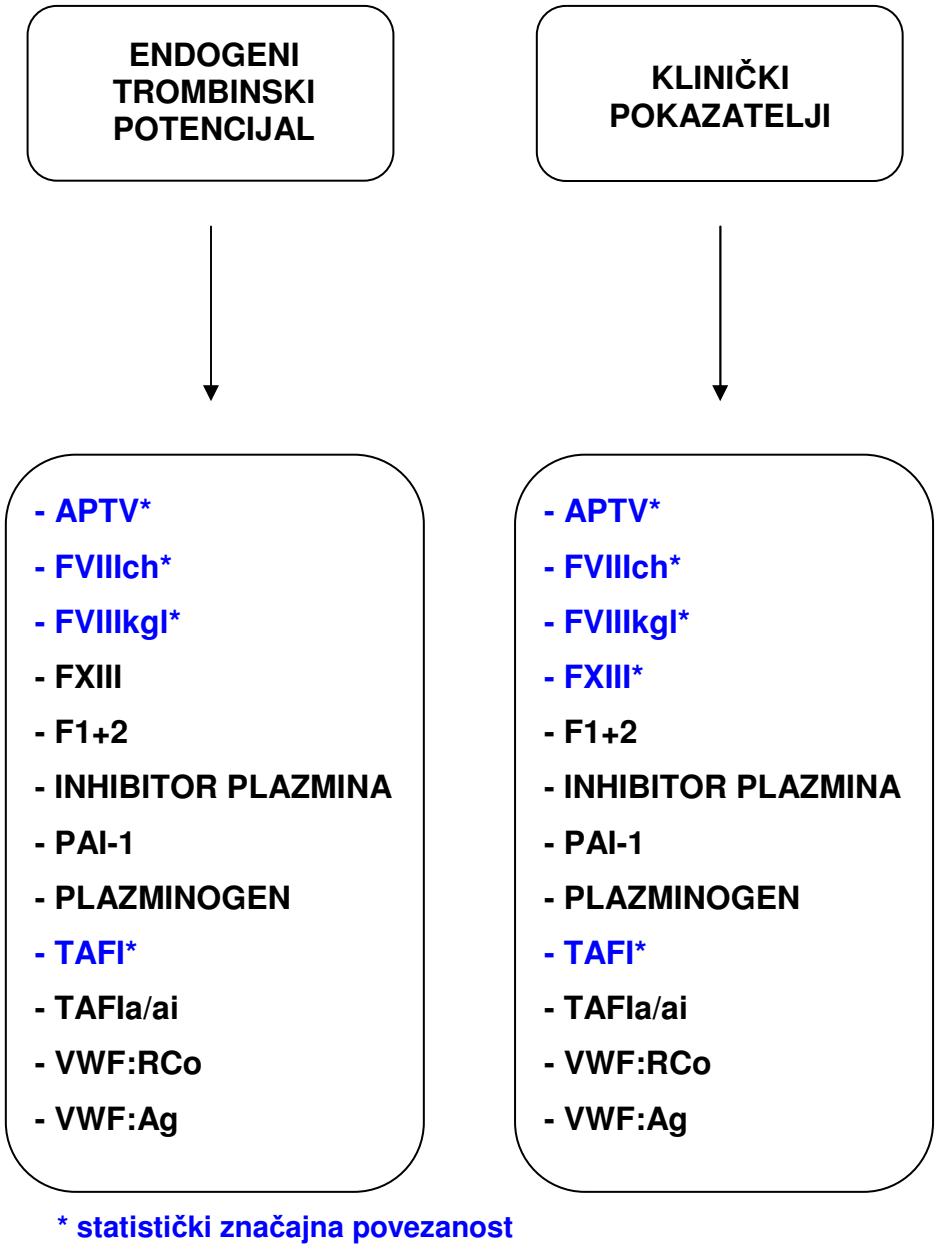
*srednja vrijednost ± standardna devijacija. †medijan (raspon). §vrijednosti za aktivnost FVIIIkgl<0,01 kIU/L uzete su kao 0,009 kIU/L. ‡Vrijednosti za aktivnost FVIIIch<0,004 kIU/L uzete kao 0,004 kIU/L.

Na sljedećim slikama zbirno su prikazani glavni rezultati ovog istraživanja.

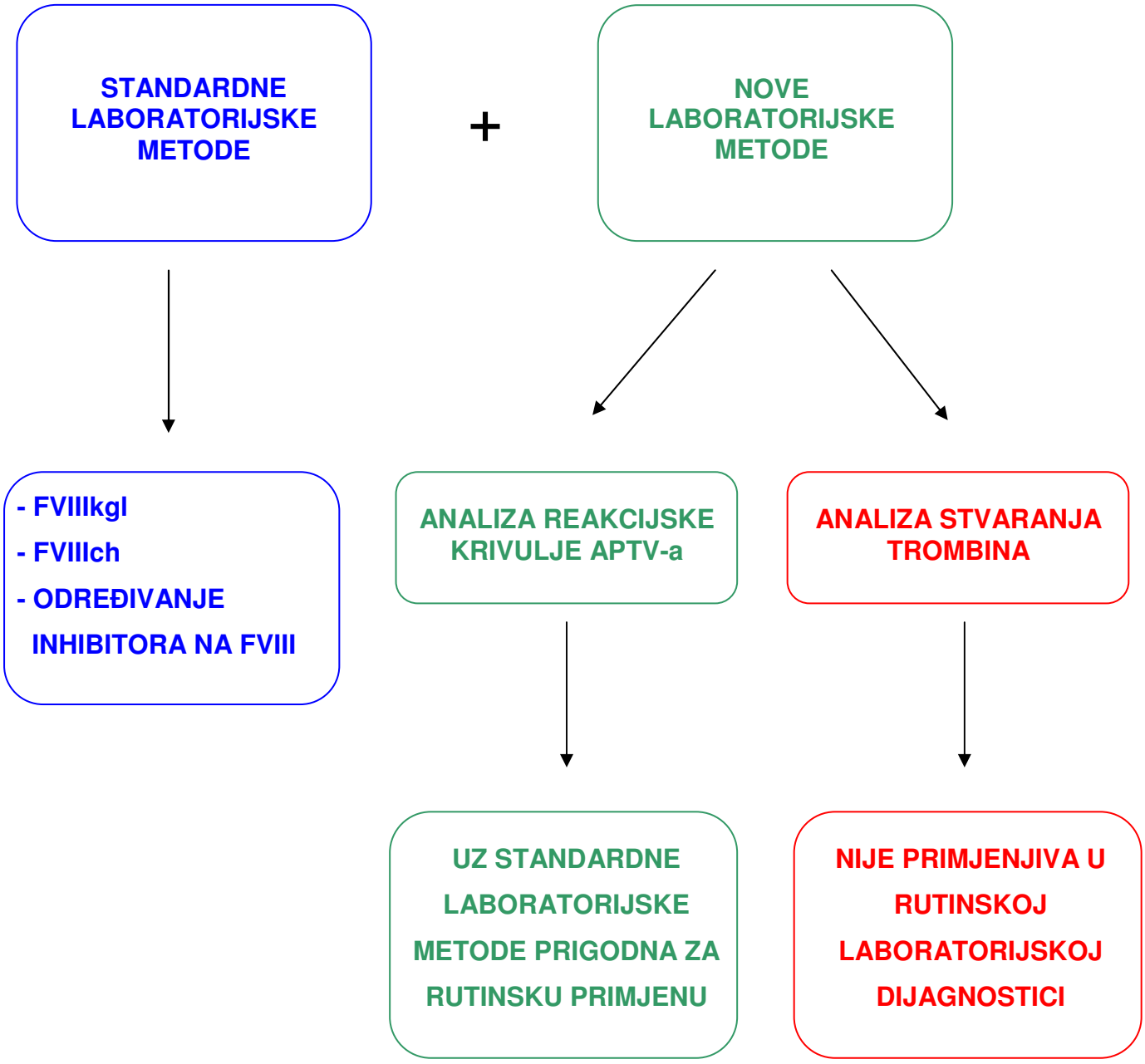
Slika 5.19 Shematski prikaz usporedbi skupina bolesnika i kontrolne skupine s obzirom na aktivnost koagulacijskog i fibrinolitičkog sustava te upalnu komponentu (temeljem aktivnosti i/ili koncentracije 11 prokoagulacijskih i fibrinolitičkih parametara).



Slika 5.20 Shematski prikaz povezanosti prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika s endogenim trombinskim potencijalom i kliničkim pokazateljima.



Slika 5.21 Shematski prikaz laboratorijske dijagnostike hemofilije A



6. RASPRAVA

Hemofilija A je rijedak, nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi koji nastaje kao posljedica potpunog ili djelomičnog manjka aktivnosti FVIII u cirkulaciji i očituje se povećanom sklonošću krvarenjima. Podjela hemofilije A na temelju ostatne aktivnosti FVIII u krvi najčešće i u kliničkom smislu dijeli bolesnike u homogene skupine, tj. po intenzitetu i učestalosti krvarenja, te razvoju kliničkih posljedica krvarenja. Tako većina bolesnika s teškim oblikom bolesti, usprkos redovitoj nadomjesnoj terapiji, ima učestala spontana krvarenja, najčešće u zglobove. Nasuprot tome, bolesnici s umjerenim oblikom hemofilije A krvare povremeno, rijetko spontano, obično nakon manje ili veće traume, dok bolesnici s blagim oblikom bolesti krvare vrlo rijetko, kod kirurških zahvata ili težih trauma. Kod manjeg broja bolesnika s hemofilijom A nema korelacije između izmjerene aktivnosti FVIII u krvi i kliničkog izražaja bolesti, pa bolesnici s teškim oblikom bolesti nemaju očekivana spontana krvarenja, ili bolesnici s mjerljivom aktivnošću FVIII imaju veći intenzitet i učestalost krvarenja od očekivanog. Navedena heterogenost fenotipskog izražaja kod hemofilije A upućuje na zaključak da ostatna aktivnost FVIII u krvi nije jedina odrednica kliničkog fenotipa te da postoje drugi čimbenici koji utječu na fenotipski izražaj bolesti.

Za istraživanje moguće povezanosti i utjecaja drugih čimbenika na fenotipski izražaj bolesti te na ukupni trombinski potencijal u ovom su radu mjerene aktivnosti i/ili koncentracije 11 prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika u plazmi 100 bolesnika s hemofilijom A (56 bolesnika s teškim oblikom bolesti i 44 bolesnika s blažim oblikom bolesti). Dobiveni su rezultati uspoređeni između kontrolne skupine i skupine svih bolesnika, između skupina bolesnika s teškim i blažim oblikom bolesti i na kraju između podskupina s težom i blažom kliničkom slikom. Između dvije skupine bolesnika nije bilo razlike u starosnoj dobi, ali je razlika u kliničkim pokazateljima bila statistički značajna. Bolesnici iz skupine s teškim oblikom bolesti imali su značajno nižu dob kod pojave prvog krvarenja u životu te viši broj zglobova zahvaćenih hemofiličnom artropatijom, veći prosječan godišnji broj krvarenja i veću prosječnu godišnju potrošnju pripravka FVIII. Između dvije skupine nije bilo statistički značajne razlike u raspodjeli krvnih grupa. Na temelju kliničkih pokazatelja bolesnici iz skupine s teškim oblikom podijeljeni su na podskupinu s težom (N=32) i blažom kliničkom slikom (N=23). U podskupini s težom kliničkom slikom zabilježen je statistički značajno veći broj zglobova zahvaćenih hemofiličnom artropatijom, veći prosječan broj krvarenja i veća prosječna godišnja potrošnja pripravka FVIII. Dob kod pojave prvog krvarenja u životu nije

se statistički značajno razlikovala između dvije podskupine. Bolesnici iz podskupine s težom kliničkom slikom imali su statistički značajno višu starosnu dob, što se može objasniti činjenicom da su mlađi bolesnici, zbog boljih životnih uvjeta i uvjeta liječenja, bili rjeđe izloženi obilnim krvarenjima i razvijali hemofiličnu artropatiju.

Ispitivanjem prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika kod bolesnika s hemofilijom A u odnosu na kontrolnu skupinu dobivene su statistički značajno više vrijednosti APTV-a, niža aktivnost FVIIIkgl, FVIIIch i plazminogena, te niža koncentracija TAFIa/ai. Aktivnost TAFI i koncentracija F1+2 u skupini bolesnika također su bile bitno snižene, ali je statistička značajnost bila granična (P=0,082 i 0,051). Rezultati su dijelom u skladu s rezultatima Grünewald i sur. koji su dobili sniženu aktivnost plazminogena i koncentraciju F1+2, ali i više aktivnosti TAFI, t-PA i PAI-1, te koncentraciju VWF:Ag i kompleksa TPA-PAI-1 u skupini bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu (49). Antovic i sur. su, kao što je dobiveno i u ovom istraživanju, utvrdili statistički značajno nižu aktivnost TAFI, ali za razliku od ovog istraživanja višu koncentraciju TAFIa/ai u skupini bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu (50,74). Višu koncentraciju TAFIa/ai tumače pojačanom aktivacijom TAFI djelovanjem plazmina koji je zbog fibrinolize povišen. Analizom dobivenih rezultata mogu se izdvojiti dvije karakteristike koje obilježavaju skupinu svih bolesnika u odnosu na zdravu populaciju: niža koncentracija F1+2 upućuje na smanjenu sposobnost stvaranja trombina; snižene vrijednosti TAFIa/ai i TAFI upućuju na smanjenu inhibiciju fibrinolize, tj. na pojačanu fibrinolizu. Antigen TAFIa/ai predstavlja frakciju aktiviranog i inaktiviranog TAFI, za čiji je nastanak potrebna visoka koncentracija trombina koja se kod hemofilije usporeno stvara zbog smanjene funkcije unutarnjeg puta zgrušavanja. Suprotno navedenom, snižena aktivnost plazminogena kod bolesnika s hemofilijom A može upućivati na smanjenu fibrinolizu. Ipak, snižena aktivnost plazminogena ne ukazuje na smanjenu aktivaciju plazminogena do plazmina, nego govori o količini plazminogena prisutnog u krvi koji se može aktivirati do plazmina. U tom se smislu dobivena smanjena aktivnost plazminogena može objasniti i smanjenom sintezom proteina u jetri zbog poremećene sintetske funkcije jetre koja je česta kod bolesnika s hemofilijom A, ili kompenzacijskom reakcijom organizma na moguću pojačanu fibrinolizu.

Ispitivanjem prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika u skupini s teškim oblikom hemofilije A u odnosu na skupinu s blažim oblikom bolesti dobivene su statistički značajno više vrijednosti APTV-a, niža aktivnost FVIIIkgl, FVIIIch i FXIII, viša aktivnost PAI-1, te

viša koncentracija VWF:Ag. U skupini s teškim oblikom bolesti dobivene su i bitno niže aktivnosti TAFI te povišene aktivnosti VWF:RCo, ali je statistička značajnost bila granična (P=0,055 i 0,082). Antovic i sur. su uspoređivali aktivnost TAFI i koncentraciju TAFIa/ai između dvije skupine bolesnika, ali nisu dobili statistički značajnu razliku (50). Povišene vrijednosti proteina akutne faze VWF i PAI-1 naglašavaju upalnu komponentu kod bolesnika s teškim oblikom bolesti u odnosu na one s blažim oblikom. Posljedica su učestalih i intenzivnih krvarenja koja obilježavaju bolesnike s teškim oblikom bolesti te dovode do razvoja hemofilične artropatije, što je kod bolesnika s blažim oblikom bolesti rjeđa pojava. Snižene aktivnosti FXIII i TAFI upućuju na pojačanu fibrinolizu kod bolesnika s teškim oblikom bolesti, a zbog smanjene stabilnosti ugruška i smanjene inhibicije fibrinolize. Suprotno tome, statistički značajno veća aktivnost PAI-1 mogla bi upućivati na smanjenje fibrinolize, ali s obzirom da se radi o proteinu akutne faze u stanju s naglašenom upalnom komponentom povećanje aktivnosti može biti posljedica upalnih reakcija.

Ispitivanjem prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika u podskupini s težom kliničkom slikom u odnosu na blažu kliničku sliku dobivene su statistički značajno više vrijednosti APTV-a, više aktivnosti plazminogena, te viša koncentracija VWF:Ag. Statistički značajno više rezultate VWF:Ag u podskupini s težim fenotipom dobili su i Grünewald i sur. (49). U većini radova nije nađena statistički značajna razlika u prokoagulacijskim čimbenicima (48,49,51), dok rezultati vezani uz fibrinolitičke parametre nisu tako ujednačeni. Shetty i sur. našli su statistički značajno sniženu koncentraciju TAFI u skupini s težom kliničkom slikom (51). Grünewald i sur. našli su statistički značajno više vrijednosti antigena tPA i aktivnosti TAFI u podskupini s težim fenotipskim karakteristikama, što tumače kao pojačanu fibrinolizu koja nastaje kao posljedica stalnih podražaja nedjelotvornoga koagulacijskog sustava i aktivacije fibrinolitičkog sustava koji je potpuno funkcionalan (49). Na temelju navedenih rezultata može se zaključiti da bolesnike s težom kliničkom slikom u odnosu na bolesnike s blažom kliničkom slikom obilježava izraženija upalna komponenta. S obzirom na dvojbene rezultate dobivene u različitim studijama, pojačana fibrinoliza kod ovih bolesnika nije sa sigurnošću potvrđena.

U zaključku, rezultati ovog istraživanja potvrđuju pretpostavke o povećanoj aktivnosti fibrinolitičkog sustava kod hemofilije A u odnosu na zdravu populaciju, koja je izraženija kod težeg oblika bolesti. Iako rezultati ovog i nekih drugih istraživanja (49,51) upućuju na mogućnost pojačane fibrinolize kod bolesnika s težom kliničkom slikom, potrebna su dodatna

ispitivanja s obzirom na dvojbene rezultate dobivene u različitim studijama. Razlozi dvojbenih rezultata vjerojatno su višestruki: neke su studije rađene s izrazito malim brojem bolesnika gdje male promjene u izmjerenim vrijednostima mogu dovesti do značajnih promjena (48-50,74); u nekim studijama skupine bolesnika nisu bile potpuno homogene (hemofilija A i B) (48,49,51); teško je uspoređivati rezultate mjerenja različitih frakcija proteina (npr. TAFI) mjerenih različitim metodama (49-51,74); u ovom se istraživanju kontrolna skupina sastojala od zdravih muških dobrovoljaca, u nekim studijama od zdravih dobrovoljaca oba spola (49,50,74), dok u nekim istraživanjima kontrolna skupina nije korištena (48,51). Većina istraživača ipak se slaže da hemofilija predstavlja ne samo poremećaj sustava zgrušavanja, s rezultirajućim usporenim nastajanjem ugruška, nego istovremeno i poremećaj fibrinolitičkog sustava u smislu smanjene inhibicije, što rezultira ubrzanom fibrinolizom stvorenog ugruška (50,75-79). Razlog vjerojatno treba tražiti u inhibitoru fibrinolize TAFI, molekuli koja povezuje koagulacijski i fibrinolitički sustav. Poremećaj unutarnjeg puta zgrušavanja rezultira ne samo smanjenom sposobnošću stvaranja trombina i nastanka ugruška, nego i smanjenom aktivacijom inhibitora fibrinolize TAFI, što u konačnici rezultira ubrzanom fibrinolizom.

Polimorfizam FVG1691A jedan je od glavnih uzroka rezistencije na aktivirani protein C (APC), a zajedno s polimorfizmom FIIG20210A, koji je povezan s povećanom koncentracijom protrombina, najčešći je nasljedni rizični faktor za vensku trombozu. Pretpostavlja se da prokoagulacijski učinak navedenih polimorfizama može kod hemofilije djelovati kao zaštitni faktor od krvarenja. Slijedom ove pretpostavke mnogi su istraživači ispitivali mogući utjecaj protrombotičkih mutacija na heterogenost fenotipskog izražaja hemofilije A. Nakon što su Nichols i sur. 1996. prvi put pokazali moguću povezanost i utjecaj FVG1691A na klinički izražaj kod hemofilije A (80), idućih su godina objavljene mnoge studije čiji su rezultati bili u skladu s njihovima (46,81-84), te one u kojima nije potvrđen utjecaj protrombotičkih mutacija na fenotipski izražaj hemofilije A (66,85-88). U preglednom članku objavljenom 2010. god. Franchini i Lippi daju pregled gore navedenih i drugih radova u kojima su ispitivanjem navedene problematike dobiveni različiti rezultati, te navode da su literaturni podaci ipak ograničeni i da su studije uglavnom nekontrolirane i s malim brojem ispitanika (89). U ovom istraživanju ispitani su polimorfizmi FVG1691A i FIIG20210A kod svih bolesnika, dok u kontrolnoj skupini nisu ispitivani s obzirom da postoje literaturni podaci o prevalenciji u zdravoj populaciji. Učestalost u hrvatskoj populaciji za oba polimorfizma iznosi 4% (73). Podjelom 96 bolesnika s hemofilijom A na skupinu zdravih homozigota i

skupinu heterozigota ispitana je razlika u parametrima TGT-a i kliničkim pokazateljima. Iako je u skupini heterozigota nađena viša dob kod prvog krvarenja, manji broj zglobova zahvaćenih hemofiličnom artropatijom, manji prosječan godišnji broj krvarenja i manja prosječna godišnja potrošnja FVIII, univarijantnom analizom nisu dobivene statistički značajne razlike. Za parametre TGT razlika između dvije skupine također nije bila statistički značajna. Navedeni rezultati u skladu su s istraživanjima u kojima je zaključeno da se blaža klinička slika bolesnika s teškim oblikom hemofilije A ne može objasniti prisutnošću protrombotičkih mutacija FVG1691A ili FIIG20210A. Ipak, s obzirom na mali broj ispitanika s dokazanom mutacijom, teško je donositi konačne zaključke. Kako je u značajnom broju studija potvrđen utjecaj navedenih mutacija na fenotipski izražaj hemofilije A, zaključno se može reći, a kako su zaključili i Franchini i Lippi, da su potrebne multicentrične studije s velikim brojem ispitanika kako bi se rasvijetlila uloga protrombotičkih mutacija u kliničkom izražaju hemofilije A (89).

S obzirom na heterogenost kliničkog izražaja hemofilije A i činjenicu da aktivnost FVIII nije jedina odrednica kliničkog fenotipa, mjerenje ostatne aktivnosti FVIII kao jedina metoda za dijagnozu i praćenje hemofilije A nije dovoljno. Standardnim koagulacijskim metodama mjeri se samo početak procesa nastajanja trombina (oko 3% ukupnog trombina) i prelaska fibrinogena u fibrin, dok glavnina trombina koji nastaje u jednoj reakciji (oko 97%) ostaje „neprocijenjena“ jer nastaje nakon što mjerenje završi (56,63,65,90,91). Posljednjih se godina intenzivno radi na razvoju novih metoda za laboratorijsko praćenje bolesnika s hemofilijom A (analiza reakcijske krivulje APTV-a, analiza stvaranja trombina i tromboelastografija). Analiza stvaranja trombina i tromboelastografija su metode poznate već dugi niz godina, ali nisu doživjele širu uporabu zbog dugotrajnosti, kompliciranе izvedbe i nereproducibilnosti. Zbog tehničkih prilagodbi danas je povećana njihova pouzdanost i reproducibilnost, što pruža mogućnost za rutinsku primjenu u laboratoriju (63). Poseban naglasak je na mogućnosti unaprjeđenja laboratorijske dijagnostike u praćenju terapije premošćivajućim lijekovima kod bolesnika koji su razvili inhibitore na FVIII s obzirom da mjerenje aktivnosti FVIII kod njih nije svrsishodno (56,63,65,69). Do sada još uvijek nema službenih preporuka za terapiju i laboratorijsko praćenje terapije kod ovih bolesnika iako imaju izrazito veliki rizik krvarenja i razvoj hemofilične artropatije (54,56,92).

Analiza reakcijske krivulje APTV-a je metoda koja koristi mogućnost modernih optičkih koagulacijskih analizatora da neprekidno prate promjenu apsorpcije ili transmisije svjetla u reakcijskoj smjesi u kojoj se provodi koagulacijska reakcija i nastaje fibrin. Metoda je

primarno razvijena na optičkom koagulacijskom analizatoru MDA-II gdje programska podrška analizatora omogućava kvantitativnu analizu reakcijske krivulje, računanjem prve i druge derivacije, kao mjere brzine i ubrzanja koagulacijske reakcije (55,55). Mnogi su autori ispitivali mogućnost korištenja analize reakcijske krivulje APTV-a kod hemofilije (56,63,64). Barrowcliffe i sur. navode mogućnost praćenja niskih aktivnosti FVIII (<0,01 kIU/L) ovom metodom, gdje standardna metoda u jednom stupnju nema dovoljnu osjetljivost, kao i praćenje hemostatskog odgovora na terapiju pripravcima FVIII (63). U literaturi je do danas opisana jedna metoda analize reakcijske krivulje APTV-a koja je razvijena na drugom analizatoru kao alternativa metodi uspostavljenoj na uređaju MDA-II. Kod tzv. APTT Clot Curve Analysis (CCA) foto-optički podaci dobiveni mjerenjem APTV-a na analizatoru ACL 10000 (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, SAD) preneseni su i matematički analizirani u programu Microsoft Excel, u svrhu dobivanja prve i druge derivacije kao mjere brzine i ubrzanja koagulacijske reakcije (64). Autori naglašavaju da je potrebno ispitivanje korelacije s kliničkom slikom kako bi se metoda mogla koristiti za ispitivanje fenotipskih heterogenosti kod hemofilije.

Za potrebe ovog istraživanja razvijena je metoda kvantitativne analize reakcijske krivulje APTV-a na analizatoru BCS primjenom dva različita načina evaluacije na istoj reakcijskoj krivulji APTV-a. Na taj su način u istom mjerenju dobivene dvije vrijednosti za APTV u sekundama na temelju kojih su izračunati kvantitativni parametri DELTA, OMJER1 i OMJER2. U ovom je radu ispitana dijagnostička vrijednost ovih parametara u laboratorijskoj dijagnostici hemofilije A. Već vizualnim pregledom reakcijske krivulje APTV-a može se uočiti razlika između ispitanika iz kontrolne skupine i bolesnika s hemofilijom A. Bolesnici s hemofilijom A, zbog smanjene aktivnosti FVIII, sporije stvaraju trombin, sporije se provodi pretvorba fibrinogena u fibrin i reakcijska krivulja ima blaži nagib. Kod zdravih ispitanika krivulja je značajno strmija te ima veći nagib jer je stvaranje trombina i pretvorba fibrinogena u fibrin brže. Kvantitativnim mjerenjem kod bolesnika su dobivene više vrijednosti parametra DELTA u odnosu na zdrave ispitanike jer je razlika između dviju vrijednosti APTV-a veća, kao i više vrijednosti parametara OMJER1 i OMJER2. Po istom načelu bolesnici s teškim oblikom bolesti u odnosu na bolesnike s blažim oblikom bolesti imali su više vrijednosti parametara DELTA, OMJER1 i OMJER2. Razlika u vrijednostima DELTA, OMJER1 i OMJER2 između sve 3 skupine bila je statistički značajna. Usporedbom dobivenih rezultata analize reakcijske krivulje APTV-a između dvije podskupine bolesnika unutar teškog oblika bolesti dobivene su više vrijednosti parametara DELTA, OMJER1 i OMJER2 u skupini s

težom kliničkom slikom, ali razlika nije bila statistički značajna. Ispitivanjem korelacije parametara analize reakcijske krivulje APTV-a s FVIIIkgl i FVIIIch u ukupnom broju uzoraka dobivena je vrlo dobra do izvrsna povezanost za sva tri parametra. U svim je skupinama nađena bolja povezanost s parametrom DELTA u odnosu na parametre OMJER1 i OMJER2. U kontrolnoj skupini nije nađena statistički značajna povezanost rezultata FVIIIkgl i FVIIIch niti s jednim parametrom analize reakcijske krivulje APTV-a. To se može objasniti činjenicom da male razlike u vrijednostima APTV-DB i APTV-PI u kontrolnoj skupini nisu posljedica samo aktivnosti FVIII, nego sveukupnog učinka pro- i anti-koagulacijskih čimbenika. Kod bolesnika s hemofilijom A aktivnost FVIII je snižena i ima snažan učinak na DELTA, OMJER1 i OMJER2. Što je aktivnost FVIII niža, to je i utjecaj veći i povezanost veća, što je i potvrđeno ispitivanjem korelacije u pojedinačnim skupinama gdje je u skupini s teškim oblikom nađena bolja povezanost nego u skupini s blažim oblikom bolesti. Nakon isključenja bolesnika koji su bili na nadomjesnoj terapiji ispitana je korelacija s kliničkim pokazateljima i dobivena je najbolja povezanost za parametar DELTA, a isti parametar je analizom ROC potvrđen kao izvrstan biljeg za razlikovanje teškog i blažeg oblika hemofilije A. Za parametre OMJER1 i OMJER2 dobivene su nešto niže vrijednosti dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti. Niti jedan parametar nije dobar u razlikovanju podskupina unutar skupine s teškim oblikom bolesti. Podjelom bolesnika u dvije grupe na temelju graničnih vrijednosti dobivenih analizom ROC za sva 3 parametra dobivene su statistički značajne razlike za sve kliničke pokazatelje, iako je najbolje razdvajanje bolesnika dobiveno pomoću parametra DELTA.

Dobiveni rezultati analize reakcijske krivulje APTV-a ukazuju na parametar DELTA kao najbolji od 3 parametra te potvrđuju vrijednost i mogućnost rutinske primjene ove metode . S obzirom da su unutar skupine bolesnika s istom aktivnošću FVIII nađene više vrijednosti parametara DELTA, OMJER1 i OMJER2 kod bolesnika s težom kliničkom slikom u odnosu na bolesnike s blažom kliničkom slikom, može se zaključiti da i drugi čimbenici, osim aktivnosti FVIII, utječu na hemostatski potencijal plazme, te je potvrđena svrsishodnost analize reakcijske krivulje APTV-a kao dodatka mjerenju aktivnosti FVIII. Jednostavnost i cijena metode, koja zahtijeva samo mjerenje APTV-a bez potrebe za dodatnim reagensima, dodatna je prednost ove metode koja nije zanemariva.

Metoda analize stvaranja trombina, prvi put opisana 1950-ih godina (67), laboratorijska je metoda u kojoj se, nakon dodatka aktivatora, aktivnost stvorenog trombina mjeri spektrofotometrijski ili fluorometrijski tijekom vremena. Kod bolesnika s hemofilijom A

mogla bi omogućiti procjenu učinaka i interakcija koji su, uz aktivnost FVIII, zaslužni za nastajanje trombina i oporavak poremećene hemostaze. Pri tome se mjeri cjelokupni proces nastajanja trombina tijekom vremena, a ne samo početna količina trombina. Mnogi su se autori bavili ispitivanjem vrijednosti TGT-a u dijagnostici hemofilije A. Santagostino i sur. i Van Veen i sur. dobili su široki raspon vrijednosti ETP unutar skupine s teškim oblikom bolesti, čime potkrijepljuju potencijal metode u razlikovanju kliničkog fenotipa unutar iste skupine bolesnika (65,93).

Većina autora nije dobila statistički značajnu razliku u vrijednostima ETP-a između bolesnika s težom i blažom kliničkom slikom kada je kao uzorak korišten PPP (66,93). Santagostino i sur. dobili su više vrijednosti ETP-a u skupini s blažom kliničkom slikom kada su kao uzorak koristili PRP, što upućuje na zaključak da PRP bolje odražava stanje *in vivo.* Ipak, s obzirom na zahtjevnu pripravu i nemogućnost pohrane PRP-a naglašavaju da je praktična primjena ove metode ograničena. Ispitivanjem korelacije većina autora je dobila umjerenu do dobru povezanost parametara TGT-a s FVIIIkgl i FVIIIch (66,92,94), pri čemu neki autori navode bolju povezanost u skupini bolesnika s nižom aktivnošću FVIII (92,95). Matsumoto i sur. ispitivali su korelaciju parametara TGT-a s parametrima analize reakcijske krivulje APTV-a u skupini zdravih ispitanika i ispitanika s hemofilijom A te su dobili vrlo dobru do izvrsnu povezanost (55). Beltrán-Miranda i sur. (66) navode C_max kao najbolji parametar TGT, dok Barrowcliffe (53) ističe AUC kao najreproducibilniji parametar.

Analiza stvaranja trombina provedena je u ovom istraživanju na uređaju BCS-XP s komercijalnim reagensom ETP te metodom prilagođenom za bolesnike s hemofilijom A i B (ETP-C). U kontrolnoj skupini dobivene su statistički značajno više vrijednosti parametara AUC-t i C_max-t u odnosu na skupinu bolesnika. Također, nađene su statistički značajno više vrijednosti navedenih parametara u skupini bolesnika s blažim oblikom bolesti u odnosu na teški oblik bolesti. Usporedbom dobivenih rezultata između dvije podskupine dobivene su niže vrijednosti C_max-t i više vrijednosti t_lag-t i t_max-t u skupini s težom kliničkom slikom u odnosu na blažu kliničku sliku, ali je razlika bila statistički značajna samo za t_max-t. Umjerena do dobra povezanost AUC s FVIIIkgl, FVIIIch i parametrom DELTA nađena je u skupini svih ispitanika i u skupini bolesnika s teškim oblikom hemofilije A, dok je slabija povezanost nađena s OMJER1 i OMJER2. Slabija povezanost bila je u skupini svih bolesnika i u skupini s blažim oblikom bolesti. Povezanost parametra C_max s FVIIIkgl, FVIIIch i parametrima DELTA, OMJER1, OMJER2 također je bila statistički značajna, ali nešto slabija od AUC u svim skupinama ispitanika. Za parametar t_lag i t-max nije nađena povezanost ili je bila slaba. Kao i kod analize reakcijske krivulje APTV-a, u kontrolnoj skupini nije nađena

statistički značajna povezanost parametara analize stvaranja trombina s FVIIIkgl, FVIIIch i parametrima DELTA, OMJER1 i OMJER2. Ispitivanjem korelacije AUC i C_max s kliničkim pokazateljima povezanost nije nađena. Nakon isključenja bolesnika koji su bili na nadomjesnoj terapiji napravljena je analiza ROC kojom je pokazano da su AUC i C_max slabi parametri u razlikovanju stupnja bolesti kod hemofilije A, dok u razlikovanju podskupina na temelju težine kliničke slike nemaju uspjeha. Podjelom bolesnika u dvije grupe na temelju graničnih vrijednosti dobivenih analizom ROC, dobivene su statistički značajne razlike u svim kliničkim pokazateljima na temelju parametra AUC, dok za parametar C_max nisu nađene statistički značajne razlike.

Ispitivanjem analize stvaranja trombina u ovom istraživanju pokazano je da je AUC najbolji parametar u dijagnostici hemofilije A. Međutim, u odnosu na parametre analize reakcijske krivulje APTV-a dobivena je bitno slabija korelacija sa standardnim laboratorijskim metodama, slabije razlikovanje stupnja bolesti, a povezanost s kliničkim pokazateljima nije potvrđena. S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da u postojećoj izvedbi metoda nije primjenjiva u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici bolesnika s hemofilijom A. Ispitivanjem TGT-a u dijagnostici hemofilije A otvorena su mnoga pitanja vezana za predanalitički dio analize, kao što su: vrsta uzorka, vrsta i koncentracija aktivatora, koncentracija fosfolipida i dodatak inhibitora kontaktne aktivacije. Slabi signal trombina koji se razvija tijekom reakcije u plazmi bolesnika s hemofilijom A rezultira često izrazito lošom krivuljom stvaranja trombina (96). Rezultat je otežano očitavanje parametara TGT-a, ali i jači učinak neželjenih predanalitičkih čimbenika u sustavu s malo trombina. U ovom istraživanju kao uzorak je korišten PPP priređen standardnim postupkom, zamrznut i nakon odmrzavanja centrifugiran na velikom broju okretaja da bi se uklonili ostatni trombociti. Ostaje pitanje jesu li pri tome uz trombocite uklonjeni i fragmenti trombocita koji su mogli interferirati prilikom mjerenja. U metodi ETP-C primijenjena je preporučena koncentracija TF-a od 1 pM, ali i elaginska kiselina kao aktivator kontaktnog sustava. S obzirom da se u većini radova preporuča uporaba inhibitora kontaktnog sustava pitanje je koji pristup rezultira manjim utjecajem kontaktne aktivacije. U svakom slučaju, TGT zahtijeva strogu kontrolu predanalitičkih uvjeta uz osobito pažljivu pripravu i pohranu uzorka kako bi se osigurali pouzdani rezultati mjerenja. Standardizacija metode, koju preporučuju u svojim radovima mnogi autori, svakako bi smanjila varijabilnost uzrokovanu predanalitičkim varijacijama, čime bi metoda dobila na pouzdanosti (53,64,65,91,97-100).

Konačna dijagnoza kod bolesnika s hemofilijom A temelji se na detaljnoj anamnezi, fizikalnom pregledu, te laboratorijskim metodama pretraživanja i potvrdnim metodama (101). Današnja laboratorijska dijagnostika tradicionalno se sastoji od mjerenja APTV-a, aktivnosti FVIII u krvi, te otkrivanja i mjerenja titra inhibitora na FVIII. Kvaliteta laboratorijskih nalaza ovisi o vještinama i znanju laboratorijskog osoblja, njihovom trajnom osposobljavanju i usavršavanju, ali i o kvaliteti opreme, metodologiji i reagencijama koje se koriste (101).

Precizno i točno mjerenje aktivnosti FVIII nije jednostavno postići, osobito u području izrazito niskih aktivnosti koje su upravo važne za razlikovanje teškog oblika bolesti od umjerenog, te za praćenje terapije kod teškog oblika bolesti. Poznato je da već aktivnosti FVIII≥0,01 kIU/L dovode do bitnog poboljšanja u kliničkoj slici (55). Mnogi autori naglašavaju probleme vezane za precizno mjerenje niskih aktivnosti FVIII koji se očituju izrazito velikim međulaboratorijskim razlikama, s koeficijentom varijacije od 10-20% (52,53,55,102).

Usporedba metoda mjerenja aktivnosti FVIII u ovom istraživanju potvrdila je literaturne podatke o razlikama između metode u jednom stupnju i kromogene metode, koje su obično veće u skupini s blažim oblicima hemofilije A (92,95,103,104). Analizom po Passing-Babloku dobivena je dobra korelacija rezultata FVIIIkgl i FVIIIch u skupini svih ispitanika, iako je Wilcoxon testom za parne uzorke pokazana statistički značajna razlika u svim skupinama. Nešto lošija korelacija nađena je u skupini bolesnika s blažim oblikom bolesti u odnosu na teški oblik bolesti. Analizom prema Bland-Altmanu pokazana je ukupna srednja razlika između FVIIIkgl i FVIIIch od 35,6%, uz veću srednju razliku u skupini s blažim oblikom bolesti u odnosu na teški oblik, dok je u kontrolnoj skupini razlika bila najmanja. Iz grafičkog prikaza prema Bland-Altmanu vidljivo je da su vrijednosti FVIIIch u preko 80% bolesnika s hemofilijom A niže u odnosu na vrijednosti FVIIIkgl. Ispitivanjem korelacije rezultata APTV-a, FVIIIkgl i FVIIIch s kliničkim pokazateljima nađena je umjerena do dobra povezanost nakon što su isključeni bolesnici koji su bili na nadomjesnoj terapiji. Dobiveni rezultati potvrđuju potrebu standardizacije metoda za mjerenje aktivnosti FVIII, što je naglašeno u preporukama SSC-a za FVIII i FIX ISTH-a kao ključni i nužan korak u prevladavanju spomenutih problema (8). Rezultati su u skladu s rezultatima Kitchen i sur. (105) koji navode da svaki laboratorij pri centru za hemofiliju uz mjerenje aktivnosti FVIII metodom u jednom stupnju mora imati mogućnost mjerenja aktivnosti i metodom u dva stupnja ili kromogenom metodom. Potonje bi se koristile kod bolesnika s osobnom ili obiteljskom anamnezom koja upućuje na blagu hemofiliju A, a čije su vrijednosti APTV-a i FVIII unutar referentnih intervala.

Laboratorijska metoda za praćenje hemofilije A treba biti pouzdana, ali i brza i jednostavna zbog hitnih stanja krvarenja u kojima je bolesnik životno ugrožen, a dobiveni rezultat mora biti odraz kliničkog stanja. Metoda analize reakcijske krivulje APTV-a i analiza stvaranja trombina predstavljaju novi pristup u laboratorijskoj dijagnostici hemofilije A, zbog mjerenja ne samo aktivnosti FVIII nego ukupnoga hemostatskog potencijala plazme. Na temelju naših rezultata analiza reakcijske krivulje APTV-a svakako opravdava novi pristup kao dodatna metoda uz mjerenje aktivnosti FVIII. Pri tome, uz dijagnostičku vrijednost metode valja imati na umu i povoljnu cijenu i brzinu provedbe metode. Analiza stvaranja trombina s komercijalnim reagensom ETP-C za sada ne ispunjava uvjete dobre rutinske metode i nije primjenjiva u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici bolesnika s hemofilijom A.

7. ZAKLJUČCI

U ovom istraživanju je ispitana povezanost 11 prokoagulacijskih i fibrinolitičkih parametara s endogenim trombinskim potencijalom i fenotipskim izražajem hemofilije A, te ispitani mogući mehanizmi koji rezultiraju razlikama u fenotipskom izražaju bolesti. Također, ispitana je mogućnost primjene novih laboratorijskih metoda u dijagnostici hemofilije A. Dobiveni rezultati upućuju na sljedeće zaključke:

1. U skupini svih bolesnika s hemofilijom A u odnosu na kontrolnu skupinu pokazano je smanjeno stvaranje trombina i ubrzana fibrinoliza.
   U skupini s teškim oblikom hemofilije A u odnosu na skupinu s blažim oblikom bolesti pokazana je povišena upalna komponenta i ubrzana fibrinoliza.
   U podskupini s težom kliničkom slikom u odnosu na podskupinu s blažom kliničkom slikom pokazana je povišena upalna komponenta, dok ubrzana fibrinoliza nije sa sigurnošću potvrđena.

2. Parametri APTV, FVIIIkgl, FVIIIch i TAFI su statistički značajno povezani s endogenim trombinskim potencijalom, parametrom AUC (koeficijenti korelacije u skupini svih bolesnika: za APTV r=-0,461 P=<0,001; za FVIIIkgl r=0,406 P=<0,001; za FVIIIch r=0,467 P=<0,001, u skupini s blažim oblikom bolesti: za TAFI r=0,303, P=0,045).
   Parametri APTV, FVIIIkgl, FVIIIch, FXIII i TAFI su statistički značajno povezani s pojedinim kliničkim pokazateljima (koeficijenti korelacije u raznim skupinama bolesnika: za APTV od 0,266 do 0,422; za FVIIIkgl od 0,261 do 0,376; za FVIIIch od 0,308 do 0,320; za FXIII r=0,294; za TAFI od 0,259 do 0,337).

3. Ispitana je učestalost i utjecaj mutacija FVG1691A i FIIG20210A. Heterozigotna mutacija FVG1691A nađena je kod 1 bolesnika (1%) a heterozigotna mutacija FIIG20210A kod 4 bolesnika (4,2%). Razlika u učestalosti polimorfizma FIIG20210A između podskupina s težom i blažom kliničkom slikom nije bila statistički značajna (P=0,152). Nisu dobivene statistički značajne razlike u kliničkim pokazateljima i parametrima TGT-a između skupine zdravih homozigota i skupine heterozigota.

4. Ispitan je utjecaj krvne grupe 0 na endogeni trombinski potencijal i klinički izražaj kod hemofilije A Nisu nađene statistički značajne razlike u parametrima TGT-a i kliničkim

pokazateljima između skupine bolesnika s krvnom grupom 0 i bolesnika s ostalim krvnim grupama.

5. Ispitivanjem korelacije rezultata FVIIIkgl i FVIIIch dobivena je vrlo dobra do izvrsna povezanost (u ukupnom broju uzoraka r=0,945). Korelacija rezultata u skupini bolesnika s blažim oblikom bolesti bila je niža (r=0,875) u odnosu na skupinu s teškim oblikom (r=0,904). U skupini s blažim oblikom bolesti dobivena je veća srednja razlika u odnosu na skupinu s teškim oblikom (61,7% *vs* 47,8%). Nađena je umjerena do dobra povezanost rezultata APTV-t, FVIIIkgl-t i FVIIIch-t s kliničkim pokazateljima (koeficijenti korelacije od 0,521 do 0,688).

6. Metoda kvantitativne analize reakcijske krivulje APTV-a:
   a. Primjenom dvaju različitih načina procjene reakcijske krivulje APTV-a koji rezultiraju s dva rezultata APTV-a u sekundama (metoda pomaka osnovne linije i metoda točke infleksije), osmišljena je kvantitativna analiza reakcijske krivulje APTV-a. Definirani su kvantitativni parametri: DELTA, koji predstavlja razliku između rezultata dobivenog metodom točke infleksije i rezultata dobivenog metodom pomaka osnovne linije; OMJER1, koji predstavlja omjer dva rezultata; OMJER2 koji predstavlja omjer između DELTA i rezultata APTV-a dobivenog metodom pomaka osnovne linije. Za sve parametre dobivene su statistički značajno više vrijednosti kod bolesnika s hemofilijom A u odnosu na zdrave ispitanike, kao i kod bolesnika s teškim oblikom bolesti u odnosu na bolesnike s blažim oblikom bolesti. U podskupini s težom kliničkom slikom u odnosu na bolesnike s blažom kliničkom slikom također su dobivene više vrijednosti kvantitativnih parametara, ali razlika nije bila statistički značajna.
   b. Za sva tri parametra pokazana je vrlo dobra do izvrsna povezanost s FVIIIkgl i FVIIIch u ukupnom broju uzoraka (koeficijenti korelacije od 0,793 do 0,882), a najbolja povezanost u svim skupinama nađena je za parametar DELTA.
   c. Za razlikovanje teškog i blažeg oblika hemofilije A na temelju analize reakcijske krivulje APTV-a dobivena je dijagnostička osjetljivost 97,3% i specifičnost 93,2% (granična vrijednost DELTA-t>9,7, AUC=0,979). Metoda nije dobra za razlikovanje podskupina unutar skupine s teškim oblikom bolesti. Ispitivanjem korelacije s kliničkim pokazateljima dobivena je najbolja povezanost za parametar DELTA-t (koeficijenti korelacije od 0,467 do 0,689).

Metoda se može rutinski primijenjivati, uz mjerenje aktivnosti FVIII, u dijagnostici bolesnika s hemofilijom A.

7. Analiza stvaranja trombina metodom ETP-C:
   a. Vrijednosti parametara AUC-t i C_max-t u kontrolnoj skupini su statistički značajno više u odnosu na skupinu bolesnika, kao i u skupini bolesnika s blažim oblikom bolesti u odnosu na skupinu s teškim oblikom. Usporedbom dobivenih rezultata između dvije podskupine nije dobivena statistički značajna razlika.
   b. Za parametar AUC nađena je umjerena do dobra povezanost u ukupnom broju uzoraka s FVIIIkgl, FVIIIch i DELTA (koeficijenti korelacije od 0,571 do 0,599). Povezanost parametra C_max bila je slabija (koeficijenti korelacije od 0,496 do 0,529), a za parametre t_lag i t-max nije nađena povezanost ili je bila slaba. U kontrolnoj skupini nije nađena statistički značajna povezanost.
   c. Za razlikovanje teškog i blažeg oblika hemofilije A na temelju parametra AUC-t dobivena je dijagnostička osjetljivost 86,5% i specifičnost 47,7% (granična vrijednost AUC-t≤25,6, AUC=0,637). Metoda nije dobra za razlikovanje podskupina unutar skupine s teškim oblikom bolesti. Nije nađena povezanost AUC i C_max s kliničkim pokazateljima.

ETP-C metoda u postojećoj izvedbi nije primjenjiva u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici hemofilije A.

POPIS LITERATURE:

1. Klinge J, Ananyeva NM, Hauser CAE, Saenko EL. Hemophilia A – From Basic Science to Clinical Practice. Semin Thromb Hemost 2002;3:309-21.
2. Mannucci PM, Tuddenham EGD. The hemophilias— from royal genes to gene therapy. N Engl J Med 2001;344:1773-9.
3. Zupančić Šalek S. Bolesti uzrokovane poremećajima hemostaze. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B, ur. Interna medicina 4. izd. Zagreb: Naklada Ljevak, 2008;956-71.
4. Otto J. An account of a hemorrhagic disposition existing in certain families. Med Repos 1803;6:1-4.
5. Maclean RM, Makris M. Hemophilia A and B. U: Key N, Makris M, O´Shaughnessy D, Lillicrap D, ur. Practical Hemostasis and Thrombosis. 2. izd. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2009;61-72.
6. Nilsson IM. History and demography of hemophilia with special reference to the situation in Sweden. U: Nilsson IM, ur. Hemophilia. Malmö: Pharmacia Plasma Products. 1994;2-5.
7. Franchini M, Favaloro EJ, Lippi G. Mild hemophilia A. J Thromb Haemost 2010;8:421-32.
8. Preston FE, Kitchen S, Jennings I, Woods TAL, Makris M. SSC/ISTH classification of hemophilia A: can hemophilia center laboratories achieve the new criteria? J Thromb Haemost 2004;2:271-4.
9. Friedman KD, Rodgers GM. Inherited Coagulation Disorders. U: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, Means RT, ur. Wintrobe´s Clinical Hematology. 12. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009;1380-424.
10. Peerlinck K, Jacquemin M. Mild haemophilia: a disease with many faces and many unexpected pitfalls. Haemophilia 2010;16(Suppl 5):100-6.
11. Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, Kim JH, Stoddard BL. The tertiary structure and domain organisation of coagulation factor VIII. Blood 2008;111:1240-7.
12. Oldenburg J, Ananyeva NM, Saenko EL. Molecular basis of haemophilia. Haemophilia 2004;10:133-9.
13. Hoyer LW. Hemophilia A. N Engl J Med 1994;330:38-47
14. Dahlbäck B. Blood coagulation. Lancet 2000;355:1627-32.

15. Saenko EL, Ananyeva NM, Tuddenham EG, Kemball-Cook G. Factor VIII – novel insights into form and function. Br J Haematol 2002;119:323–31.
16. Nilsson IM. Biochemical properties of factor FVIII, factor IX and von Willebrand factor. U: Nilsson IM, ur. Hemophilia. Malmö: Pharmacia Plasma Products. 1994;6-13.
17. Nesheim M. Thrombin and Fibrinolysis. Chest 2003;124:33S-39S.
18. Booth NA. Fibrinolysis and Thrombosis. Baillière`s Clinical Haematology 1999;12:423-33.
19. Mosnier LO, Bouma BN. Regulation of Fibrinolysis by Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor, an Unstable Carboxypeptidase B That Unites the Pathways of Coagulation and Fibrinolysis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26:2445-53.
20. Bouma BN, Meijers JC. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). J Thromb Haemost 2003;1(7):1566-74.
21. Nilsson IM. Heredity in hemophilia. U: Nilsson IM, ur. Hemophilia. Malmö: Pharmacia Plasma Products. 1994;14-19.
22. FVIII HAMSTeRS mutation database. URL: http://europium.csc.mrc.ac.uk
23. Jacquemin M, De Maeyer M, D'Oiron R, Lavend'Homme R, Peerlinck K, Saint-Remy JM. Molecular mechanisms of mild and moderate hemophilia. J Thromb Haemost 2003;1:456-63.
24. Repesse´ Y, Slaoui M, Ferrandiz D, Gautier P, Costa C, Costa JM, Lavergne JM, Borel-Derlon A. Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. J Thromb Haemost 2007;5:1469–76.
25. Peyvandi F, Jayandharan G, Chandy M, Srivastava A, Nakaya SM, Johnson MJ, Thompson AR, Goodeve A, Garagiola I, Lavoretano S, Menegatti M, Palla R, Spreafico M, Tagliabue L, Asselta R, Duga S, Mannucci PM. Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. Haemophilia 2006;12(Suppl. 3):82–9.
26. Kasper CK, Buzin CH. Mutations. U: Kasper CK, Buzin CH, ur. Genetics of hemophilia A and B. 1. izd. Philadelphia: The CSL Behring foundation, 2007;8-12.
27. Zupančić-Šalek S. Hitna stanja u hemofiliji. Pediatr Croat 2005;49(Supl1):269-70.
28. Den Ujil IEM, Fischer K, van der Bom JG, Grobbee DE, Rosendaal FR, Plug I. Clinical outcome of moderate haemophilia compared with severe and mild haemophilia. Haemophilia 2009;15:83-90.

29. Mannucci PM. Hemophilia: treatment options in the twenty-first century. J Thromb Haemost 2003;1:1349-55.
30. Pool JG, Hershgold EJ, Pappenhagen AR. High-potency antihaemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin in precipitate. Nature 1964;203:312.
31. Mannucci PM. Treatment of hemophilia: recombinant factors only? No. J Thromb Haemost 2003;1:216-7.
32. Giangrande PLF. Treatment of hemophilia: recombinant factors only? Yes. J Thromb Haemost 2003;1:214-5.
33. Franchini M, Lippi G. Recombinant factor VIII concentrates. Semin Thromb Hemost 2010;36:493-7.
34. Franchini M. Plasma-derived versus recombinant Factor VIII concentrates for the treatment of haemophilia A: recombinant is better. Blood Transfus 2010;8:292-6.
35. White II GC, Kempton CL, Grimsley A, Nielsen B, Roberts HR. Cellular immune responses in hemophilia: why do inhibitors develop in some, but not all hemophiliacs? J Thromb Haemost 2005;3:1676–81.
36. Saint-Remy JMR. Immunology of Factor FVIII Inhibitors. Semin Thromb Hemost 2002;28:265-8.
37. Verbruggen B. Diagnosis and quantification of factor VIII inhibitors. Haemophilia 2010;16:20-4.
38. Dimichele D. Inhibitors: resolving diagnostic and therapeutic dilemmas.Haemophilia 2002;8:280–7.
39. Mannucci PM, Abshire T, Dimichele D, Santagostino E, Blanchette V. Inhibitor development, immunel tolerance and prophylaxis in haemophilia A – the need for an evidence-based approach. Haemophilia 2006;12:429-34.
40. White II GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. Recommendations of the Scientific Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost 2001;85:560.
41. Astermark J, Lacroix-Desmazes S, Reding MT. Inhibitor Development. Haemophilia 2008;14:36-42.
42. Astermark J. Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. Haemophilia 2006;12:52–60.

43. Lacroix-Desmazes S, Navarrete AM, Andre´ S, Bayry J, Kaveri SV, Dasgupta S. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. Blood 2008;112:240-249
44. Roberts HR. Choise of replacement therapy for hemophilia. J Thromb Haemost 2003;1:595.
45. van den Berg HM, De Groot PHG, Fischer K. Phenotypic heterogeneity in severe hemophilia. J Thromb Haemost 2007;5(Suppl.1):151-6.
46. Escuriola-Ettingshausen C, Halimeh S, Kurnik K, Schobess R, Wermes C, Junker R, Kreuz W, Pollmann H, Nowak-Gottl U. Symptomatic onset of severe hemophilia A in childhood is dependent on the presence of prothrombotic risk factors. Thromb Haemost 2001;85:218-20.
47. Van Dijk K, van der Bom JG, Fischer K. Do prothrombotic factors influence clinical phenotype of severe haemophilia? A review of the literature. Thromb Haemost 2004;92:305-10.
48. Van Dijk K, van der Bom JG, Fischer K, de Groot PG, van den Berg HM. Phenotype of severe haemophilia A and plasma levels of risk factors for thrombosis. J Thromb Haemost 2007;5:1062-4.
49. Grünewald M, Siegemund A, Grünewald A, Konegen A, Koksch M, Griesshammer M. Paradoxical hyperfibrinolysis is associated with a more intensely haemorrhagic phenotype in severe congenital haemophilia. Haemophilia 2002;8:768-75.
50. Antovic JP, Schulman S, An SSA, Greenfield RS, Blombäck M. Does an enzyme other than thrombin contribute to unexpected changes in the levels of the different forms of thrombin activable fibrinolysis inhibitor in patients with hemophilia A, hemophilia B and von Willebrand disease? Scand J Clin Lab Invest 2004;64:745-51.
51. Shetty S, Vora S, Kulkarni B, Mota L, Vijapurkar M, Quadros L, Ghosh K. Contribution of natural anticoagulant and fibrinolytic factors in modulating the clinical severity of haemophilia patients. Br J Haematol. 2007;138:541-4.
52. Verbruggen B, Meijer P, Novakova I, van Heerde W. Diagnosis of factor VIII deficiency. Haemophilia 2008;14(Suppl 3):76-82.
53. Barrowcliffe TW. Monitoring haemophilia severity and treatment: new or old laboratory tests? Haemophilia 2004;10(Suppl 4):109-14.
54. Shima M, Matsumoto T, Ogiwara K. New assays for monitoring haemophilia treatment. Haemophilia 2008;14(Suppl 3):83-92.

55. Matsumoto T, Shima M, Takeyama M, Yoshida K, Tanaka I, Sakurai Y, Giles AR, Yoshioka A. The measurement of low levels of factor VIII or factor IX in hemophilia A and hemophilia B plasma by clot waveform analysis and thrombin generation assay. J Thromb Haemost 2006;4(2):377-84.
56. Dargaud Y, Lambert T, Trossaert M. New advances in the therapeutic and laboratory management of patients with haemophilia and inhibitors. Haemophilia 2008;14(Suppl 4):20-7.
57. Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM. Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests; a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure. J Lab Clin Med 1953;41:637-47.
58. Biggs R, Eveling J, Richards G. The assay of antihemophilic-globulin activity. Br J Haematol 1955;1:20-34.
59. Seghatchian MJ, Miller-Anderson M, Howarth DJ, Stirling Y, Brozovic M. Proceedings: automated techniques for estimating factor VIII levels in concentrate preparations. Thromb Diath Haemorrh 1975;34:611.
60. Kasper C, Aledort L, Counts R Edron J, Fratantoni J, Green D, Hampton J, Hilgartner M, Laserson J, Levine P, MacMillan C, Pool J, Shapiro S, Shulman N, Eys J.A more uniform measurement of factor VIII-inhibitors. Thromb Diath Haemorrh. 1975;34:869–72.
61. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, MauserBunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. Thromb Haemost 1995;73:247–51.
62. Giles AR, Verbruggen B, Rivard GE, Teitel J, Walker I. A detailed comparison of the performance of the standard versus the Nijmegen modification of the Bethesda assay in detecting factor VIII:C inhibitors in the haemophilia A population of Canada. Association of Hemophilia Centre Directors of Canada. Factor VIII/IX Subcommittee of Scientific and Standardization Committee of International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost 1998;79(4):872-5.
63. Barrowcliffe TW, Cattaneo M, Podda GM, Bucciarelli P, Lussana F, Lecchi A, Toh CH, Hemker HC, Beguin S, Ingerslev J, Sorensen B. New approaches for measuring coagulation. Haemophilia 2006;12(Suppl. 3):76-81.
64. Nair SC, Dargaud Y, Chitlur M, Srivastava A. Tests of global haemostasis and their applications in bleeding disorders. Haemophilia 2010;16(Suppl. 5):85-92.

65. vanVeen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? Br J Haematol 2008;142:889-903.
66. Beltrán-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR, Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. Haemophilia 2005;11:326-34.
67. Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. J Clin Pathol 1953;6:3-8.
68. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, Lecompte T, Beguin S. Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. Pathophysiol Haemost Thromb 2003;33:4-15.
69. Varadi K, Turecek PL, Schwarz HP. Thrombin generation assay and other universal tests for monitoring haemophilia therapy. Haemophilia 2004;10(Suppl 2):17-21.
70. Hartert H. Bluttgerinnungsstudien mit der Thromboelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. Klin Wochenschr 1948;26:577-83.
71. James P, Lillicrap D. Molecular diagnostic approaches to hemostasis. U: Key N, Makris M, O´Shaughnessy D, Lillicrap D, ur. Practical Hemostasis and Thrombosis. 2. izd. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2009;25-36.
72. Milos M, Coen Herak D, Zadro R. Is it possible to predict the degree of FVIII deficiency from aPTT waveform analysis on Behring Coagulation Timer (BCT)?. J Thromb Haemost 2005;3(Suppl 1):P1291.
73. Coen D, Zadro R, Honović L, Banfić L, Stavljenić Rukavina A. Prevalence and association of the factor V Leiden and prothrombin G20210A in healthy subjects and patients with venous thromboembolism. Croat Med J. 2001;42(4):488-92.
74. Antovic J, Schulman S, Eelde A, Blombäck M. Total thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) antigen and pro-TAFI in patients with haemophilia A. Haemophilia 2001;7(6):557-60.
75. Hvas AM, Sørensen HT, Norengaard L, Christiansen K, Ingerslev J, Sørensen B. Tranexamic acid combined with recombinant factor VIII increases clot resistance to accelerated fibrinolysis in severe hemophilia A. J Thromb Haemost 2007;5:2408-14.
76. Lisman T, Mosnier LO, Lambert T, Mauser-Bunschoten EP, Meijers JCM, Nieuwenhuis HK, de Groot PG. Inhibition of fibrinolysis by recombinant factor VIIa in plasma from patients with severe hemophilia A. Blood 2002;99:175-9.
77. Mosnier LO, Lisman T, van den Berg HM, Nieuwenhuis HK, Meijers JC, Bouma BN. The defective down regulation of fibrinolysis in haemophilia A can be restored by increasing the TAFI plasma concentration. Thromb Haemost 86(4):1035-9.

78. Foley JH, Nesheim ME, Rivard GE, Brummel-Ziedins KE. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activation and bleeding in haemophilia A. Haemophilia DOI: 10.1111/j.1365-2516.2011.02648.x
79. Toh CH. Characterization of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in normal and acquired haemostatic dysfunction. Blood Coagul Fibrinolysis. 2003;14 Suppl 1:S69-71.
80. Nichols WC, Amano K, Cacheris PM, Figueiredo MS, Michaelides K, Schwaab R, Hoyer L, Kaufman RJ and Ginsburg D. Moderation of hemophilia A phenotype by the factor V R506Q mutation. Blood 1996;88:1183-7.
81. Tizzano E, Soria JM, Coll I, Guzman B, Cornet M, Altisent C, Martorell M, Domenech M, del Rio E, Fontcuberta J, Baiget M. The prothrombin 20210A allele influences clinical manifestations of hemophilia A in patients with intron 22 inversion and without inhibitors. Haematologica 2002;87:279-85.
82. Vezendi K, Tápai K, Erdödi E, Szabó I, Tomek A, Oszlács J, Scheibl E. Thrombophilic markers in patients with congenital bleeding disorders. Haematologia 2002;8:768-75.
83. Nowak-Göttl1 U, Escuriola C, Kurnik K, Schobess R, Horneff S, Kosch1 A, Kreuz W, Pollmann H. Haemophilia and thrombophilia. What do we learn about combined inheritance of both genetic variations? Hämostaseologie 2003;23:36–40.
84. Kurnik K, Kreuz W, Horneff S, Düring C, Schobess R, Bidlingmaier C, Escuriola-Ettingshausen C, Krümpel A, Bogdanova N, Nowak-Göttl U. Effects of the factor V G1691A mutation and the factor II G20210A variant on the clinical expression of severe hemophilia A in children – results of a multicenter study. Haematologica 2007;92:982-5.
85. Arbini AA, Mannucci PM, Bauer KA. Low prevalence of the factor V Leiden mutation among "severe" hemophiliacs with a "milder" bleeding diathesis. Thromb Haemost. 1995;74(5):1255-8.
86. Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Antunes SV, Costa FF. Association of severe haemophilia A and factor V Leiden: report of three cases. Haemophilia 1996;2:51-3.
87. Lee DH, Walker IR, Teitel J, Poon MC, Ritchie B, Akabutu J, Sinclair GD, Pai M, Wu JW, Reddy S, Carter C, Growe G, Lillicrap D, Lam M, Blajchman MA. Effect of the factor V Leiden mutation on the clinical expression of severe hemophilia A. Thromb Haemost. 2000;83(3):387-91.
88. Ar MC, Baykara O, Buyru AN, Baslar Z. The Impact of Prothrombotic Mutations on Factor Consumption in Adult Patients with Severe Hemophilia. Clin Appl Thromb Hemost 2009;15:660-5.
89. Franchini M, Lippi G. Factor V Leiden and hemophilia. Throm Res 2010;125(2):119-23.

90. Ghosh K, Shetty S, Kulkarni B. Correlation of thromboelastographic patterns with clinical presentation and rationale for use of antifibrinolytics in severe haemophilia patients. Haemophilia 2007;13:734-9.
91. Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. Br J Haematol 2005;130:653-61.
92. Salvagno GL, Astermark J, Lippi G, Ekman M, Franchini M, Guidi GC, Berntorp E. Thrombin generation assay: a useful routine check-up tool in the management of patients with haemophilia? Haemophilia. 2009;15(1):290-6.
93. Santagostino E, Mancuso ME, Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M, Garagiola I, Mannucci PM. Severe hemophilia with mild bleeding phenotype: molecular characterization and global coagulation profile. J Thromb Haemost 2010;8(4):737-43.
94. Dargaud Y, Béguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet JC, Hemker HC, Negrier C. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. Thromb Haemost 2005;93:475-80.
95. Trossaërt M, Regnault V, Sigaud M, Boisseau P, Fressinaud E, Lecompte T. Mild hemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype. J Thromb Haemost 2008;6(3):486-93.
96. Lewis SJ, Stephens E, Florou G, Macartney NJ, Hathaway LS, Knipping J, Collins PW. Measurement of global haemostasis in severe haemophilia A following factor VIII infusion. Br J Haematol 2007;138:775-82.
97. Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, Leflem L, Elalamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment: The influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. Thromb J 2005;3:16.
98. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Giesen PL, Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. Haematologica 2003;88:547-54.
99. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Negrier C, Lecompte T, Petros S, Hogwood J, Bordet JC, Regnault V, Siegemund A, Baglin T. Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicentre study. Br J Haematol 2007;139:303-9.
100. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Tripodi A. Standardization of the endogenous thrombin potential measurement: how to minimize the effect of residual platelets in stored plasma. Br J Haematol 2004;124:355-7.

101. Chuansumrit A, McCraw A, Preston EF. Essential issues of laboratory investigation for patients with haemophilia and bleeding disorders. Haemophilia 2004;10(Suppl. 4):105-8.

102. van den Besselaar AMHP, Haas FJLM, Kuypers AWHM. Harmonisation of factor VIII:C assay results: study within the framework of the Dutch project „Calibration 2000“. Br J Haematol 2005;132:75-9.

103. Cid AR, Calabuig M, Cortina V, Casana P, Haya S, Moret A, Cabrera N, Aznar JA. One-stage and chromogenic FVIII:C assay discrepancy in mild haemophilia A and the relationship with the mutation and bleeding phenotype. Haemophilia 2008;14:1049-54.

104. Chandler WL, Ferrell C, Lee J, Tun T, Kha H. Comparison of three methods for measuring factor VIII levels in plasma. Am J Clin Pathol 2003;120:34-9.

105. Kitchen S, Hayward C, Negrier C, Dargaud Y. New developments in laboratory diagnosis and monitoring. Haemophilia 2010;16(Suppl 5):61–6.

ŽIVOTOPIS AUTORA

Osobni podaci:

Ime i prezime:	Marija Miloš (rođ. Penava)
Datum rođenja:	31.05.1969. god.
Mjesto rođenja:	Imotski
Telefon:	01 2367 263
e-mail:	marijamilos1@yahoo.com

Obrazovanje:

1987. - 1992. Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, smjer medicinska biokemija

1997. - znanstveni poslijediplomski studij na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu

2004. - stekla akademski stupanj magistra medicinskih znanosti iz područja biomedicina i zdravstvo (farmacija).
Tema magistarskog rada: "Citometrijsko razlikovanje podrijetla hematurije".

2002. - 2005. specijalistički staž iz medicinske biokemije

2005. - položila specijalistički ispit iz medicinske biokemije

Radno iskustvo:

1992. - 1993. pripravnički staž u Dijagnostičkom laboratoriju Doma zdravlja Novi Zagreb

1993. - 1994. Dijagnostički laboratorij Doma zdravlja Novi Zagreb

1995. - 1996. Dijagnostički laboratorij Doma zdravlja Sesvete

1996. - 2005. zaposlena kao dipl. ing. medicinske biokemije u Zavodu za specijalnu biokemiju, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb

2005. - zaposlena kao specijalist medicinske biokemije u Zavodu za hematologiju i koagulaciju, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb

Članstvo u udrugama:

Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara

Hrvatska komora medicinskih biokemičara

POPIS OBJAVLJENIH DJELA

Popis znanstvenih radova:

1. Matišić D, **Miloš M**, Rogić J. Analitička procjena analizatora Behring Nephelometer II tvrtke Dade Behring. Biochemia Medica 2000:35-40.
2. **Milos M**, Coen D, Zadro R. Reliability of Prothrombin and Activated Partial Thromboplastin Time Determination on CoaguChek Pro DM. Point of Care 2004, 3(3):135-139.
3. Aurer I, Lauc G, Dumić J, Rendić D, Matišić D, **Miloš M**, Heffer-Lauc M, Flogel M, Labar B. Abberant Glycosylation of IgG Heavy Chain in Multiple Myeloma. Coll. Antropol. 31(2007) 1:247-251.
4. **Miloš M**, Boršo G, Čvorišćec D. Citometrijsko razlikovanje podrijetla hematurije uporabom antitijela na glikoforin A. Biochem Med 2008;18(2):206-15.
5. **Milos M**, Herak D, Kuric L, Horvat I, Zadro R. Evaluation and performance characteristics of the coagulation system: ACL TOP analyzer - HemosIL reagents.Int J Lab Hematol. 2009;31:26-35.
6. Coen Herak D, **Milos M**, Zadro R. Evaluation of the Innovance D-DIMER analytical performance. Clin Chem Lab Med 2009: 47: 945-51.
7. **Milos M**, Coen Herak D, Zadro R. Discrepancies between APTT results determined with different evaluation modes on automated coagulation analyzers. Int J Lab Hematol. 2010, 32, 33-39.

Ostali radovi:

1. **Miloš M.** IFCC preporuke za izražavanje rezultata koncentracije glukoze u krvi. Biochemia Medica 2009;19(1):101-2. Smjernice-prijevod.

Poglavlja u priručnicima za trajno usavršavanje:

1. **Milos M**, Antiagregacijska terapija - rezistencija na aspirin i clopidogrel. U: Zadro R, Trombociti. Zagreb: Medicinska naklada, 2008, 35-43.
2. **Milos M**, Laboratorijska dijagnostika u hemostazi. U: Zadro R, Koagulacija. Zagreb: Medicinska naklada, 2010, 11-20.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet **Doktorski rad**

POVEZANOST PROKOAGULACIJSKIH I FIBRINOLITIČKIH ČIMBENIKA S UKUPNIM TROMBINSKIM POTENCIJALOM I FENOTIPSKIM IZRAŽAJEM U BOLESNIKA S HEMOFILIJOM A

MARIJA MILOŠ

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb

S a ž e t a k

Hemofilija A je rijetki nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi koji nastaje zbog manjka FVIII u cirkulaciji i dijeli se na teški, srednje teški i blagi oblik. Kod teškog oblika bolesti javljaju se spontana krvarenja, koja su kod blažih oblika rijetka. Literaturni podaci ukazuju na heterogenost kliničkog izražaja hemofilije A. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi mogući utjecaj drugih prokoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika, osim FVIII, na endogeni trombinski potencijal i na klinički izražaj bolesti. Ispitana je vrijednost analize reakcijske krivulje APTV-a i analize stvaranja trombina u dijagnostici hemofilije A jer se ovim metodama mjeri ukupni hemostatski potencijal plazme. Dobiveni rezultati potvrđuju povećanu aktivnost fibrinolitičkog sustava kod hemofilije A u odnosu na zdravu populaciju, koja je izraženija kod teškog oblika bolesti. Pojačana fibrinoliza kod bolesnika s težom kliničkom slikom nije nedvojbeno potvrđena. Potvrđena je vrijednost analize reakcijske krivulje APTV-a u dijagnostici hemofilije A. Pokazana je dobra korelacija sa standardnim laboratorijskim metodama i kliničkim pokazateljima te dobro razlikovanje stupnja bolesti. Jednostavnost i cijena metode, koja zahtijeva samo mjerenje APTV-a, dodatne su prednosti. Ispitivanjem analize stvaranja trombina dobivena je slabija korelacija sa standardnim laboratorijskim metodama i kliničkim pokazateljima, te slabije razlikovanje stupnja bolesti. U postojećoj izvedbi metoda nije primjenjiva u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici hemofilije A.

Rad je pohranjen u knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta te Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici.

(117 stranica, 42 slike, 29 tablica, 105 literaturnih navoda, izvornik je na hrvatskom jeziku)

Ključne riječi: hemofilija A, FVIII, prokoagulacijski čimbenici, fibrinolitički čmbenici, fenotipski izražaj hemofilije A, analiza reakcijske krivulje APTV-a, analiza stvaranja trombina

Voditelj: Dr.sc. Renata Zadro, red. prof.
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu

Ocjenjivači: Dr.sc. Tihana Žanić-Grubišić, red. prof.
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu

Dr.sc. Renata Zadro, red. prof.
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu

Dr.sc. Dubravka Čvorišćec, red. prof.
Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu

Datum prihvaćanja rada: 23.05.2012.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry **Doctoral Thesis**

ASSOCIATION OF PROCOAGULANT AND FIBRINOLYTIC FACTORS WITH THROMBIN POTENTIAL AND HEMOPHILIA A PHENOTYPE

MARIJA MILOŠ

Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia

S u m m a r y

Hemophilia A is a rare X-linked bleeding disorder characterized by decreased FVIII activity, and is classified as severe, moderate or mild. The clinical phenotype of severe hemophilia A consists of spontaneous bleeding episodes that are rare in non-severe types. Heterogeneity in bleeding pattern has been observed, but mechanisms are poorly understood. The aim of this study was to identify whether activities of common prothrombotic and fibrinolytic factors are associated with clinical phenotypes. New laboratory methods were evaluated that assess overall clotting function, clot waveform analysis and thrombin generation test. Results showed enhanced fibrinolytic activity in patients as compared to healthy subjects, as well as in severe hemophilia A patients compared to those with mild disease. The enhanced fibrinolytic activity in patients with severe phenotype was not confirmed with certainity. By using waveform analysis, good correlation was obtained to standard laboratory methods and clinical parameters, as well as good discrimination of disease severity. Simplicity and cost benefit of this method make this approach a promising tool for assessing coagulation in hemophilia patients. The correlation to routine laboratory methods and clinical parameters in thrombin generation test was weaker and this method did not fulfill the goals expected for a routine laboratory method.

The thesis is deposited in the library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry and University Library
(117 pages, 42 figures, 29 tables, 105 references, original in Croatian)

Key words: hemophilia A, FVIII, procoagulant factors, fibrinolytic factors, hemophilia A phenotype, aPTT waveform analysis, thrombin generation test

Supervisor: Prof. Renata Zadro, PhD, Full Professor
University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: Prof. Tihana Žanić, PhD, Full Professor
University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Prof. Renata Zadro, PhD, Full Professor
University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Prof. Dubravka Čvorišćec, PhD, Full Professor
University of Zagreb, School of Medicine

Thesis accepted: 23.05.2012.