

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Dr Irena S. Đunić

**ZNAČAJ BIOMARKERA U PROCENI OŠTEĆENJA
ZGLOBA KOD BOLESNIKA SA HEMOFILIJOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL FACULTY

Dr Irena S. Đunić

**THE IMPORTANCE OF BIOMARCERS FOR ESTIMATION
OF JOINT DAMAGE IN PATIENTS WITH HEMOPHILIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentor doktorske disertacije:

Prof dr Ivo Elezović, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

1. Prof dr Nada Suvajdžić-Vuković, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu – predsednik komisije
2. Prof.dr Biljana Mihaljević, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu – član komisije
3. Prof.dr Aleksandar Lešić, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu – član komisije
4. Doc dr Predrag Miljić – član komisije
5. Prof.dr Violeta Dopsaj, Farmaceutski Fakultet Univerziteta u Beogradu – član komisije

ZNAČAJ BIOMARKERA U PROCENI OŠTEĆENJA ZGLOBA KOD BOLESNIKA SA HEMOFILIJOM

Hemofilna artropatija, sa karakterističnim oštećenjima zglobova, vodeći je uzrok morbiditeta kod bolesnika sa teškom hemofilijom. Kontinuirana profilaksa intravenskom primenom faktora (F) VIII i IX je glavna klinička strategija u lečenju ovih bolesnika. Nedavno je pokazano da se biomarkeri razgradnje zglobne hrskavice mogu detektovati u serumu iili urinu i odražavaju stepen ukupnog oštećenja zglobova kod bolesnika sa hemofilijom.

Ciljevi ove studije bili su: a) uporediti validnost dva laboratorijska testa – rotaciona tromboelastometrija (ROTEM) i potencijal endogenog trombina (ETP) u praćenju efikasnosti dva različita profilaktička režima lečenja bolesnika sa teškom hemofilijom; b) odrediti korelaciju između koncentracije biomarkera degradacije zglobne hrskavice u serumu i urinu i radiološkog skora za hemofilnu artropatiju; c) proceniti da li određivannje koncentracije ovih biomarkera može biti korisna u praćenju efikasnosti različitih režima profilakse teške hemofilije.

Ova studija obuhvatila je 20 odraslih bolesnika sa teškom hemofilijom. Pet bolesnika sa hemofilijom A primalo je profilaksu koncentratom FVIII u standardnoj dozi od 20 i.j./kg tri puta nedeljno, pet bolesnika sa hemofilijom A primalo je kao profilaksu intermedijarne doze koncentrata FVIII, 10-15 i.j./kg tri puta nedeljno. Sedam bolesnika sa hemofilijom A i tri bolesnika sa hemofilijom B primalo je koncentrat FVIII/IX samo po potrebi (“on demand”).

Kod bolesnika na profilaktičkoj terapiji, ROTEM i ETP određivani su inicijalno pre početka profilakse, zatim, 20 minuta nakon primene prve doze profilakse i posle tri meseca, pre primene sledeće profilaktičke doze. Kod bolesnika na “on demand” terapiji, ROTEM i ETP rađeni su dva puta u intervalu od tri meseca. U ROTEM testu određivano je vreme koagulacije (CT) unutrašnjeg puta (INTEM), dok je kod ETP određivana

kalkulisana vrednost površine ispod krive generacije trombina (ETP.AUC.cal) i kalkulisane vrednosti maksimalne koagulacije (ETP.Cmax.cal).

Takođe su određivani i sledeći degradacioni produkti zglobne hrskavice: serumski oligometrični matriks protein (COMP) i urinarni C terminalni telopeptid kolagena tip II (CTX-II). Uzorci seruma i urina uzimani su inicijalno pre početka terapije (obeleženi sa COMP-1 i CTX-II-1) i posle praćenja od tri meseca (obeleženi sa COMP-2 i CTX-II-2).

Radiološka evaluacija hemofilne artropatije određivana je inicijalno prema Pettersson skoru.

U grupi bolesnika na standardnoj dozi profilakse, ROTEM (CT-INTEM) - $p=0.025$ i ETP.AUC2.cal - $p=0.042$, bili su značajno bolji posle tri meseca u odnosu na bolesnike na intermedijarnim dozama profilakse. ETP.Cmax.cal nije bio značajno promenjen između ovih grupa bolesnika. Kod bolesnika na "on demand" terapiji, vrednosti ROTEM i ETP nisu se značajno menjale.

Rezultati su pokazali značajnu pozitivnu korelaciju između broja bodova u Pettersson-ovom skoru i koncentracije oba biomarkera: COMP ($r = 0.602$, $p = 0.006$) i CTX-II ($r = 0.580$, $p = 0.009$). U grupi bolesnika na standardnoj dozi profilakse, srednja vrednost COMP-2 bila je značajno niža u odnosu na srednju vrednost COMP-1 ($p = 0.043$), dok se u grupi bolesnika na intermedijarnim dozama profilakse i na "on demand" terapiji, srednje vrednosti COMP-2 nisu značajno menjale u poređenju sa COMP-1. Takođe je u grupi bolesnika na standardnoj dozi profilakse srednja vrednost CTX-II-2 bila značajno niža u odnosu na srednju vrednost CTX-II-1 ($p = 0.014$). Međutim, srednja vrednosti CTX-II-2 bila je značajno niža u odnosu na srednju vrednost CTX-II-1 i u grupi bolesnika na intermedijarnoj dozi profilakse ($p = 0.028$). Srednje vrednosti CTX-II nisu se značajno menjale kod bolesnika na "on demand" terapiji.

Na osnovu iznetih rezultata može se zaključiti da profilaksa standardnim dozama koncentrata FVIII/IX omogućava adekvatnu hemostazu u odnosu na profilaksu intermedijarnim dozama. ROTEM i ETP mogu biti korisni testovi za praćenje efikasnosti različitih modaliteta lečenja bolesnika sa hemofilijom. Rezultati ove studije su takođe pokazali da degradacioni produkti zglobne hrskavice, kao što su biomarkeri COMP i CTX-II, omogućavaju procenu stepena oštećenja zglobova kod bolesnika sa hemofilijom.

Određivanje koncentracije biomarkera u serumu/urinu korisno je u praćenju efikasnosti primenjenih doza FVIII/X u različitim režimima lečenja ovih bolesnika.

Ključne reči: hemofilija, hemofilna artropatija, profilaksa, testovi hemostaze, biomarkeri zglobne hrskavice

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Hematologija

THE IMPORTANCE OF BIOMARCERS FOR ESTIMATION OF JOINT DAMAGE IN PATIENTS WITH HEMOPHILIA

Haemophilic arthropathy, with characteristic joint damage, is the main cause of morbidity in individuals with severe haemophilia. The most important clinical strategy for management of these patients is treatment by continuous prophylaxis with intravenously applied factor (F) VIII/IX. Recently, it was shown that serum and/or urine biomarkers of cartilage turnover in joints reflected the degree of total joint degradation in haemophilia patients.

The aims of this study were: a) to compare validity of two laboratory assays – rotating thromboelastometry (ROTEM) and endogenous thrombin potential (ETP) in monitoring and evaluating different prophylactic treatment regimens in patients with severe haemophilia; b) to detect correlations between serum and urine concentrations of biomarkers of joint cartilage degradation and the radiological score for haemophilic arthropathy and c) to estimate whether measurement of these biomarkers could be useful in monitoring the efficacy of different prophylaxis regimens for severe haemophilia.

This study included 20 adults patients with severe haemophilia, without inhibitor. Five patients with haemophilia A were received prophylaxis with factor VIII (FVIII) concentrate in standard dose 20 IU/kg three times per week, five patients with haemophilia A were received intermediate dose of FVIII concentrate as prophylaxis, 10-15 IU/kg three times per week. Seven patients with haemophilia A and 3 with haemophilia B, were received FVIII/IX concentrate only on-demand.

In patients on prophylactic therapy, ROTEM and ETP were done initially before start of prophylaxis, in addition, 20 minutes after application of first prophylactic dose and afterwards 3 months, before receiving next prophylactic dose. In patients treated only on-demand, ROTEM and ETP were done twice per three-months period. In ROTEM, clotting time (CT) in intrinsic system (INTEM) was measured, whereas in ETP,

calculated values of area under the thrombin generation curve (ETP.AUC2.cal) and calculated values of maximal clotting (ETP.Cmax.cal) were estimated.

Also, the following joint cartilage degradation products were measured: serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and urinary C-terminal telopeptide of type II collagen (CTX-II). Blood and urine samples were collected initially, before the start of treatment (marked as COMP-1 and CTX-II-1) and after 3 months follow-up (marked as COMP-2 and CTX-II-2). Radiological evaluation of haemophilic arthropathy was estimated initially according to the Pettersson score.

In group on standard prophylactic dose, ROTEM (CT-INTEM) ($p=0.025$) and ETP.AUC2.cal ($p=0.042$) were significantly improved after 3 months in compare with patients with intermediate prophylactic dose. ETP.Cmax was not significantly changed between these groups. In patients treated only on-demand, ROTEM and ETP values were not changed.

The results showed significant positive correlations between the number of points in the Pettersson score and both COMP level ($r = 0.602$, $p = 0.006$) and CTX-II level ($r = 0.580$, $p = 0.009$). In the group of patients given standard-dose prophylaxis, the mean value for COMP-2 was significantly lower than that for COMP-1 ($p = 0.043$), while in the group of patients receiving intermediate-dose prophylaxis and in those treated on demand the mean values of COMP-2 were not significantly changed when compared to those for COMP-1. Likewise, in the group of patients treated with standard-dose prophylaxis, the mean value for CTX-II-2 was significantly lower than that for CTX-II-1 ($p = 0.014$). Moreover, the mean value of CTX-II-2 was also significantly decreased compared to that for CTX-II-1 ($p = 0.028$) in the group receiving intermediate-dose prophylaxis. The mean values of CTX-II in the group of patients treated on demand showed no change.

In summary, we may conclude that prophylaxis with standard dose of FVIII/IX concentrate provides adequate haemostasis in compare with intermediate prophylactic dose. ROTEM and ETP can be useful for treatment's modalities monitoring and evaluation in patients with haemophilia. Based on results of this study, we also can conclude that joint cartilage degradation products, such as the biomarkers: serum COMP and urinary CTX-II, can provide an estimation of the amount of joint damage in patients

with haemophilia. Measurement of serum/urinary biomarker levels is useful for monitoring the efficacy of the applied doses of FVIII/IX in different treatment approaches towards these patients.

Key words: haemophilia, haemophilic arthropathy, prophylaxis, haemostatic tests, biomarkers of joint cartilage.

Science field: Medicine

Specific science field: Hematology

SADRŽAJ

UVOD	1
Hemofilija	1
Istorija hemofilije.....	1
Koagulacija.....	3
Genetika i molekularna biologija hemofilije.....	8
Klinička slika.....	11
Dijagnostičke procedure.....	12
Lečenje.....	13
Hemofilična artropatija	24
Komponente zgloba.....	24
Patofiziologija hemofilične artropatije.....	30
Biomarkeri oštećenja zglobne hrskavice.....	32
CILJ RADA	34
METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA	36
Izbor bolesnika.....	36
Uzorkovanje.....	37
Metode ispitivanja.....	37
Biomarkeri oštećenja zgloba.....	42
Radiografija zglobova.....	43
Statistička obrada.....	46
REZULTATI RADA	47
DISKUSIJA	78
ZAKLJUČAK	85
LITERATURA	8

UVOD

HEMOFILIJIA

Hemofilija je nasledna bolest koja se javlja usled nedostatka faktora koagulacije VIII (hemofilija A) ili IX (hemofilija B) [1]. Nasleđivanje je recesivno preko hromozoma X, zbog čega su oboleli gotovo isključivo muškarci, dok su žene prenosioci bolesti [1]. Incidenca hemofilije A iznosi 1:5000 živorođene muške dece, dok je incidenca hemofilije B iznosi 1:30000 [1]. Hemofilija je uzrokovana mutacijom gena koji je odgovoran za sintezu faktora VIII (FVIII), odnosno faktora IX (FIX) [1,2]. Hemofilija A je češća i čini 80-85% ukupnog broja obolelih od hemofilije (WFO) [2]. Oba faktora učestvuju u takozvanom „unutrašnjem putu“ koagulacije krvi [1]. Hemofilija se klasifikuje kao teška, srednje teška ili blaga hemofilija u odnosu na nivo faktora u serumu: < 1%, 1-5% i >5%, mada mnogi Evropski centri uzimaju vrednost nivoa faktora < 2% za definiciju hemofilije teškog stepena [3,4]. Dok bolesnici sa srednje teškom i blagom hemofilijom obilnije krvare nakon povrede ili hirurškog zahvata, za bolesnike sa teškom hemofilijom karakteristične su epizode spontanog krvarenja ili obilnog krvarenja i nakon manje povrede, posebno u zglobove i mišiće [5]. Ova učestala krvarenja u zglobove (hemartroze) vremenom dovode do ireverzibilnog oštećenja zgloba, odnosno do hemofilične artropatije, poliartrikularne bolesti koja se odlikuje ukočenošću zgloba, hroničnim bolom i ograničenom pokretljivošću [5,6]. Hemofilna artropatija ograničava fizičku aktivnost bolesnika sa hemofilijom, smanjuje njihov kvalitet života i značajno doprinosi morbiditetu ove bolesti [5,6].

1. Istorija hemofilije

Reč hemofilija vodi poreklo od grčke reči „haima“ – krv i reči „philia“ – sklonost (tendencija) [7]. Najraniji dokument o hemofiliji potiče iz II veka nove ere gde je u jevrejskom Talmudu zapisano da ukoliko su dva starija sina umrla od krvarenja nakon cirkumcizije, treći sin se oslobađa ove procedure [8]. Ono što je zadivljujuće je da se iz ovog teksta može videti da je već tada prepoznata familijarna, odnosno nasledna priroda bolesti. U XII veku, takođe od strane

jevrejskih rabina, zabranjuje se cirkumcizija dečacima ukoliko su sinovi majčinih sestara umrli od krvarenja nakon iste [8]. Ovde vidimo da je prepoznato da se bolest nasleđuje sa majčine strane. Prvi savremeni stručni opis hemofilije kao bolesti kakvu je znamo i danas, dao je Otto J.C. 1803.godine [7]. On je detaljno opisao porodice sa hemofilijom i doneo zaključke koji su i danas aktuelni: 1) hemofilija uzrokuje obilna krvarenja, 2) oboleli su predominantno muškarci, 3) bolest je nasledna [7]. Međutim, celokupna rana istorija hemofilije zabeležena je u izuzetnoj, monumentalnoj monografiji publikovanoj od strane Bulloch i Fields, 1911.godine, gde je precizno izneta klinička slika, genealogija bolesti i ono što je možda i najznačajnije, muškarci su prepoznati kao oboleli a žene kao prenosioci bolesti [8].

Razumevanja hemofilije nije moglo biti bez uporednog laboratorijskog istraživanja i otkrića u polju hemostaze, odnosno procesa koagulacije. Temelje teorije koagulacije postavio je Paul Morawitz (1879-1936.). Morawitz je 1904.godine sumirao znanja o koagulaciji koja su se bazirala na radu nekoliko naučnika 18. i 19. veka i izneo svoju „klasičnu teoriju“ koagulacije prema kojoj se protrombin konvertuje u trombin pod dejstvom trombokinaze za koju je Morawitz verovao da može voditi poreklo od krvnih pločica ili oštećenog tkiva, i kalcijuma, dok trombin konvertuje fibrinogen u fibrin. Mehanizam koji konvertuje protrombin u trombin pomoću tkiva nazvao je *spoljašnji put koagulacije*. Bilo je poznato da krv može koagulisati i bez tkiva i to je nazvao *unutrašnjim putem koagulacije* [9]. Kasnije je Nolt (1908.) trombokinazu nazvao *trombiplastin*, a Howell je 1914.godine uveo u upotrebu izraz *tkivni faktor* [9].

„Klasična teorija“ koagulacije Paul Morawitz-a bila je of fundamentalnog značaja za dalje razumevanje i istraživanje kako samog procesa koagulacije, tako i koagulacionih poremećaja i laboratorijskog dijagnostikovanja hemofilije. Addis je 1910. godine dokazao da je kod bolesnika sa hemofilijom proces pretvaranja protrombina u trombin usporen, dok Hawell 1914.godine iznosi teoriju da je zapravo kod ovih bolesnika koncentracija protrombina u plazmi značajno smanjena [8]. Quick je 1936.godine uveo u upotrebu test određivanja *protrombinskog vremena* (PT – „prothrombin time“) kojim se meri vreme spoljašnjeg puta koagulacije i već iste godine pokazao da je ono kod hemofiličara normalno [8]. Patek i Stetson (1936.) objavili su da su hemofilni bolesnici deficitarni u faktoru ili faktorima koji pripadaju globulinskoj frakciji normalne plazme i nazvali su ga *antihemofilni globulin* [8]. Brinkhouse je 1939. prepoznao

antihemofilni faktor, koji sada nazivamo FVIII, a isti naučnik 1952.godine razvija i uvodi u upotrebu test određivanja *parcijalnog protrombinskog vremena* (APTT – „partial prothrombin time“), kojim se meri vreme unutrašnjeg puta koagulacije. Joules i Macfarlane (1938), kao i Pavlovsky (1944) zapazili su u odvojenim ogledima da prilikom mešanja plazme dva hemofilicara dolazi do uzajamne korekcije vremena zgrušavanja [7-9]. Međutim, tek početkom 50-tih godina XX veka istraživanjem mnogih naučnika kao što su Aggeler, Biggs, Macfarlane, Schulman i Smith, zapravo je otkriveno da postoje dve vrste hemofilija, odnosno hemofilija A koja se javlja kao posledica nedostatka FVIII i hemofilija B koja nastaje usled nedostatka FIX [7].

S obzirom da je hemofilija bolest nedostatka faktora zgrušavanja VIII/IX, što ima za posledicu sklonost ka krvarenju ovih bolesnika, kao i zbog razumevanja dijagnostičkih testova i lečenja ove bolesti, u daljem tekstu biće izneta fiziologija procesa koagulacije.

2. Koagulacija

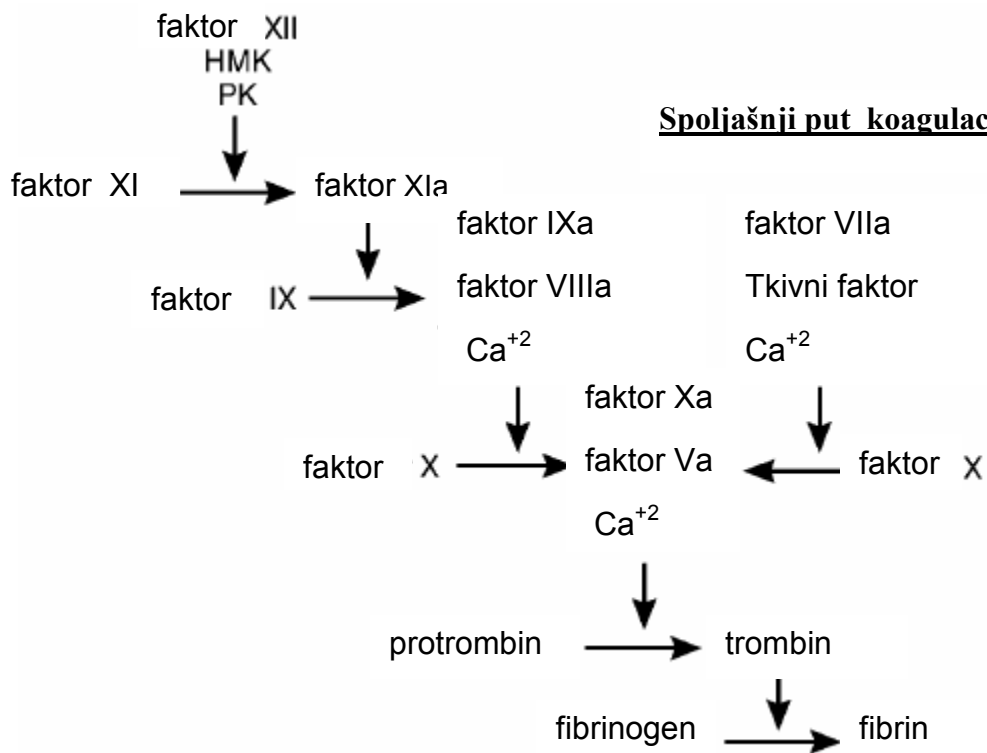
Koagulacija je sistem odbrane organizma kojim se održava integritet zatvorenog cirkulatornog sistema [10]. Klasična teorija koagulacije Poul Morawitz-a je preživela četiri decenije sve do 1964.godine, kada je od strane Ratnoff-a i Davie-a u časopisu *Science* objavljena teorija koagulacije koju su ovi istraživači nazvali „*vodopadna hipoteza mehanizma koagulacije*“ [11]. U isto vreme, iznenađujuće slična publikacija teorije koagulacije objavljena je u časopisu *Nature* takođe 1964.godine od strane Macfarlane-a, koji je svoju shemu koagulacije nazvao „*kaskadna*“, termin koji se zadržao do danas [12]. Jedina razlika između vodopadne hipoteze Ratnoff-a i Davie-a i kaskadne hipoteze koagulacije Macfarlane-a bila je u nomenklaturi: Ratnoff i Davie upotrebljavali su tradicionalnu terminologiju faktora koagulacije, dok je Macfarlane preferirao Romansku numeričku nomenklaturu preporučenu od strane Internacionalnog Komiteta za Nomenklaturu Faktora Koagulacije (*Internatioal Comittee on the Nomeclature of Clotting Factors*) [9].

Kaskadni model koagulacije, koji je bio prihvaćen kao model koagulacije sve do početka devedesetih godina XX veka, sastojao se od unutrašnjeg puta, spoljašnjeg puta i zajedničkog

puta koagulacije. Unutrašnji put započinjao je na mestu povrede aktivacijom FXII u aktivirani FXII (FXIIa), u prisustvu kalikreina i kininogena velike molekularne težine (HMK), koji aktivira FXI u FXIa, FXIa pretvara FIX u FIXa, FIXa se spaja sa FVIII i aktivira FX u FXa. Spoljašnji put koagulacije započinjao je eksprimiranjem tkivnog faktoa (TF) na mestu povrede koji delujući sa FVII aktivira FX u FXa. Zajednički put koagulacije započinjao je aktivacijom FX u FXa, bilo unutrašnjim putem, bilo spoljašnjim putem, FXa se spaja sa FV, što dovodi do pretvaranja protrombina u trombin koji pretvara fibrinogen u fibrin, a takođe aktivira FXIII u FXIIIa koji stabilizuje ugrušak (Shema 1) [13].

Unutrašnji put koagulacije

Spoljašnji put koagulacije



Shema 1: Unutrašnji i spoljašnji put koagulacije (teorija „kaskade“) [9]

Koagulaciona kaskada, podeljena na unutrašnji i spoljašnji put, u savremeno vreme ima značaj samo kao paradigma koja na najbolji način odslikava testove hemostaze *in vitro*. U laboratoriji, „spoljašnji“ put se se procenjuje merenjem intereakcije cirkulišućeg faktora VIIa sa egzogeno dodatim TF (tromboplastin) i meri se kao protrombinsko vreme (PT), koji je veoma osetljivo za definisanje F II, V, VII, X i fibrinogena. „Unutrašnji“ put meri se kao parcijalno protrombinsko vreme (APTT) koje je produženo u slučaju deficita FVIII, IX, XI i XII. Rezultati ovog testa su produženi u slučaju nedostatka faktora „zajedničkog“ puta (F II, V, X), s tim što je u tom pogledu PT znatno osetljiviji test. Model „vodopada“ ili „kaskade“ bio je veliki napredak u razumevanju procesa koagulacije. Nastao je kao rezultat istraživanja kome je bio cilj da objasni identitet, funkciju i intereakciju pojedinačnih prokoagulantnih proteina. On tačno reprezentuje sveobuhvatnu strukturu koagulacionog procesa kao seriju proteolitičkih reakcija [14]. Svaka proteaza cepa i aktivira sledeću proteazu u seriji. Međutim, ovaj model nije mogao da objasni puteve hemostaze *in vivo*. Ako su unutrašnji i spoljašnji put odvojeni koagulaconi putevi hemostaze *in vivo*, kao što to prikazuje kaskadni model, postavilo se pitanje zbog čega aktivacija FX koja se odvija u spoljašnjem putu (od strane kompleksa TF/FVII, ne može da kompenzuje nedostatak FVIII i FIX u hemofiliji. Takođe se postavilo pitanje zašto nedostatak faktora koji aktiviraju unutrašnji put - FXII, kinin velike molekulske mase (HMK) i prekalikrein (PK), ne dovode do kliničke pojave hemoragijske dijateze [14]. Naravno, jasno je da su neke komponente unutrašnjeg puta, FVIII i FIX, esencijalne za hemostazu jer njihov nedostatak dovodi do teških poremećaja koagulacije (hemofilija) [13,14]. Takođe se zna da deficit FX, FV i FII izaziva ozbiljne kliničke hemoragijske sindrome. Nasuprot tome, nedostatak FXI dovodi do pojave blage kliničke hemoragije, za razliku od nedostatka FVIII i FIX [13,14]. Sve ovo dovelo je do shvatanja da unutrašnji i spoljašnji put nisu odvojeni koagulacioni putevi u *in vivo* uslovima.

Ključ u razumevanju kako spoljašnji i unutrašnji put mogu biti međuzavisni u normalnim fiziološkim uslovima, bilo je prepoznavanje da kompleks TF/FVIIa može aktivirati ne samo FX već i FIX. Takođe je bilo važno otkriće da trombin može direktno aktivirati FXI na površini trombocita. Ovo je dovelo do pojave koncepta hemostaze u kome TF ima primarnu ulogu u fiziološkoj aktivaciji hemostaze. Međutim, još uvek nije jasno zašto direktna aktivacija FX od strane kompleksa FVIIa/TF ne može da kompenzuje nedostatak FVIII i FIX. Postoji hipoteza da inhibitor puta tkivnog faktora (TFPI) inhibiše FVIIa/TF pre nego što se stvori dovoljno FXa za

hemostazu. Evolucija kaskadnog modela dovela je do razumevanja kako koagulacioni proteini intereaguju za vreme hemostaze, uz sagledavanje ćelijske komponente čija je uloga obezbeđivanje fosfolipidne površine na kojoj se odigravaju koagulacioni procesi. Ovako modifikovani kaskadni model koagulacije nazvan je *ćelijski koncept koagulacije* [13-16].

2.1. Ćelijski koncept koagulacije

Ćelijski koncept koagulacije sastoji se iz tri procesa koja se međusobno prepliću: a) inicijacije, koji započinje eksprimiranjem tkivnog faktora, b) amplifikacije, gde dolazi do aktivacije trombocita i faktora koagulacije i c) propagacije, gde na površini aktiviranih trombocita i uz pomoć aktiviranih faktora koagulacije dolazi do stvaranja velike količine trombina [13].

Inicijacija

TF ima primarnu ulogu u fiziološkoj aktivaciji koagulacije. Povreda zida krvnog suda omogućava plazmi da dođe u kontakt sa TF-prezentujućim ekstravaskularnim ćelijama, tako da koagulacija započinje vezivanjem aktiviranog FVII (FVIIa) za TF koji formiraju kompleks FVIIa/TF. Još uvek nije poznat mehanizam kako se mala količina neaktivnog FVII konvertuje u aktivni oblik, ali zna se da plazma čak i u odsustvu koagulacije sadrži FVIIa u koncentraciji od 0,5-8,4ng/ml³. Kompleks FVIIa/TF aktivira FX i FIX koji se konvertuju u FXa i FIXa. FXa aktivira plazmatski FV u FVa. Slobodni FXa ubrzo nakon aktivacije kompleksom FVIIa/TF biva inhibiran od strane TFPI i AT. Međutim, na ćelijskoj površini ostaje dovoljno FXa koji vezujući se za FVa stvara kompleks FXa/FVa, ili kompleks protrombinaze, koji pretvara protrombin u trombin i igra važnu ulogu u aktivaciji trombocita i FVIII za vreme faze amplifikacije koagulacije [16-18].

Amplifikacija

Oštećenje krvnog suda dopušta trombocitima, kao i plazmi, da dođe u kontakt sa ekstravaskularnim tkivom. Trombociti adheriraju na komponente subendotelnog matriksa na mestu povrede. Ovaj proces vezivanja trombocita za proteine subendotelnog matriksa aktivira trombocite, a takođe ih lokalizuje u blizini mesta ekspozicije TF. TF-prezentujuće ćelije

proizvode malu količinu trombina koji pojačava inicijalne prokoagulantne signale tako što povećava adeziju i aktivaciju trombocita, a takođe aktivira FV, VIII i XI [18,19]

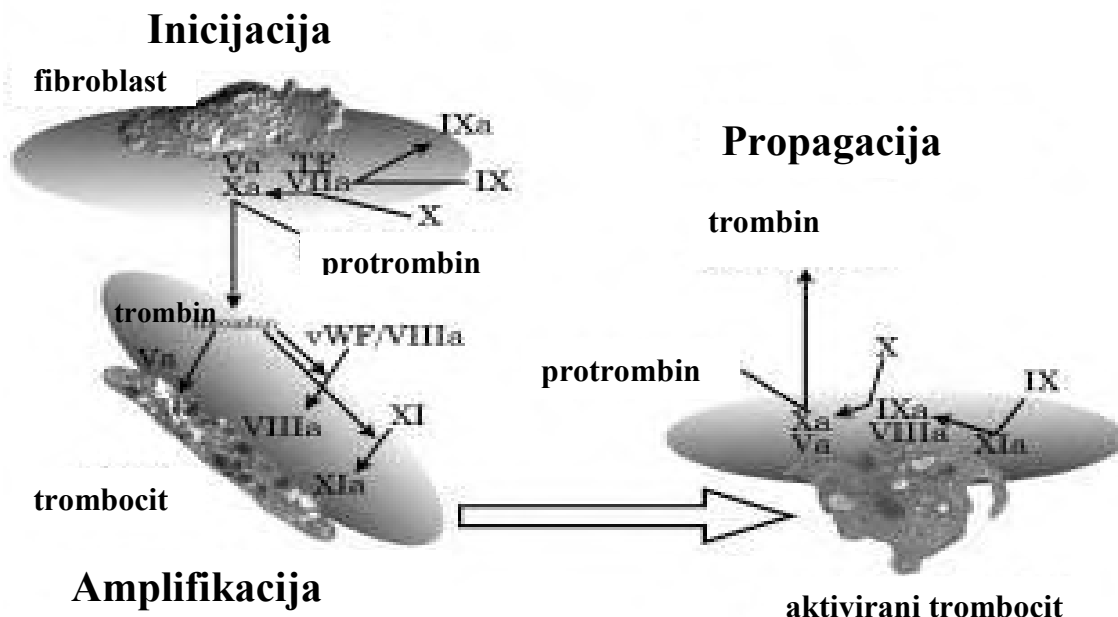
Trombin je moćan agonista trombocita, koje aktivira vezujući se za svoj proteaza-aktivirani receptor (PAR). Za vreme aktivacije, trombociti oslobađaju FV iz alfa granula na svoju površinu. FV se tada aktivira u FVa pod dejstvom FXa ili trombina [18-10].

Trombin se takođe vezuje i za ne-PAR receptore, kao što je glikoprotein (GP) Ib/IX, i može aktivirati druge faktore koagulacije na trombocitnoj površini. Kompleks von Willebrand faktor (vWF)/FVIII vezuje se za trombocite i tada pod dejstvom trombina dolazi do aktiviranja FVIII i njegovog odvajanja od vWF, a FVIIIa ostaje vezan za površinu trombocita. Sada, kada su trombociti aktivirani i kada imamo aktivirane FV i FVIII na njihovoj površini, započinje aktivnost brojnih prokoagulantnih kompleksa koji dovode do stvaranja trombina [21].

Propagacija

Za vreme faze propagacije, kompleksi tenaze i protrombinaze na površini trombocita dovode do stvaranja značajne količine trombina. Na fosfolipidnoj membrani trombocita nalaze se vezujuća mesta visokog afiniteta za FIXa, Xa i FXI. Ovi receptori igraju važnu ulogu u kordinaciji stvaranja koagulacionih kompleksa [13,16].

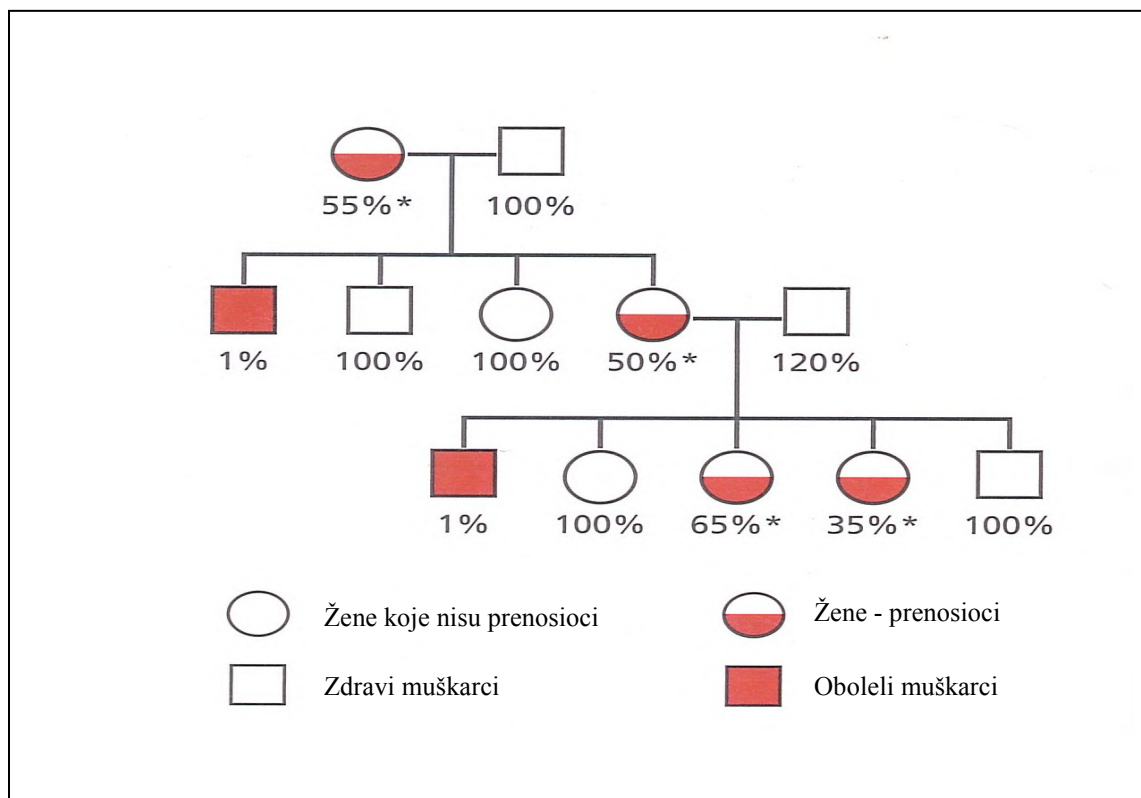
Formiraje kompleksa tenaze, odnosno kompleksa FVIIIa/FIXa, započinje najpre vezivanjem FIX za odgovarajuće vezujuće mesto na membrani trombocita. FIXa može difundovati do površine trombocita sa mesta svoje aktivacijena TF-prezentujućim ćelijama, dok ne bude inhibiran od strane AT ili ostalih plazma inhibitora. Uz to, FXI koji se nalazi u plazmi, nakon aktivacije trombinom u FXIa, vezuje se za površinu trombocita i konvertuje dodatne količine FIX u FIXa. Kompleks FVIIIa/FIXa aktivira FX na površini trombocita, što rezultuje stvaranje FXa koji se sada veže za svoj kofaktor FVa u kompleks protrombinaze, odnosno kompleks FXa/FV. Kompleks FXa/FVa na površini trombocita, takođe, konvertuje protrombin u trombin, koji svojim dejstvom fibrinogen pretvara u fibrin i na taj način obezbeđuje dodatne količine trombina. Stabilizacija fibrinskog ugruška nastaje dejstvom aktiviranog FXIII na fibrin, čiju konverziju iz FXIII u FXIIIa vrši upravo trombin i na taj način učestvuje u stvaranju stabilnog hemosatskog fibrinskog koaguluma (Shema 2) [13].



Shema 2: Ćelijski koncept koagulacije: Inicijacija na TF-prezentujućim ćelijama; Amplifikacija aktivacijom trombocita; Propagacija na površini aktiviranih trombocita [13].

3. Genetika i molekularna biologija hemofilije

Hemofilija se nasleđuje recesivno preko X hromozoma (Shema 3) [3,22]. Po literaturnim podacima, oko dve trećine bolesnika sa hemofilijom ima pozitivnu porodičnu anamnezu, dok se smatra da se kod jedne trećine obolelih radi o novonastaloj mutaciji. S obzirom da se prenosi preko X hromozoma, muškarci obolevaju a žene su prenosioci bolesti [23]. U retkim slučajevima su žene obolele od hemofilije i može se dogoditi ukoliko je homozigot (otac hemofiličar i majka prenosilac bolesti), ili hemizigot kao na primer kod Turner-ovog sindroma (45 XO) [23]. Takođe, opisani su slučajevi kod žena obolelih od hemofilije koje su prenosioci bolesti, odnosno imaju mutaciju F8 gena na jednom X hromozomu a došlo je do inaktivacije gena na drugom X hromozomu [23].



Shema 3: Tipično porodično stablo koje se najčešće viđa kod obolelih od hemofilije A (procenti pokazuju stepen aktivnosti FVIII izražen u odnosu na procenat normalne vrednosti) [22].

Gen za sintezu FVIII (F8) nalazi se na dugom kraku hromozoma X (Xq28) i mapiran je 1984.godine. Gen F8 se sastoji od 26 egzona, veličine 186 kb [24]. Kod otprilike polovine obolelih od hemofilije A mutacija je uzrokovana inverzijom između sekvenci lokalizovanih unutar introna 22 gena F8 i sekvenci izvan gena F8 (Inv22). Kod ostalih, uzrok su mutacije gena F8 tipa delecije, nonsens mutacija i tačkastih mutacija [25]. Gen F8 odgovoran je za sintezu FVIII i mada ga mogu sintetisati mnoge ćelije, glavno mesto sinteze je jetra [23]. FVIII je neophodan za normalnu koagulaciju i u krvi cirkuliše kao heterodimer sastavljen od lakog lanca (molekularne težine 80.000 daltona), koji sadrži karboksiterminalni deo i teškog lanca (molekularne težine 90-200.000 daltona), koji sadrži aminoterminalni deo molekula. U krvi

cirkuliše u veoma maloj koncentraciji (100 ng/l), vezan za von Willebrand-ov faktor (vWF) nekovalentnim vezama. vWF ima veoma važnu ulogu u direktnoj regulaciji aktivnosti FVIII: omogućava vezivanje FVIII za fosfolipide trombocitne membrane, štiti ga od aktivacije faktorom Xa, kao i od inaktivacije aktiviranim proteinom C (APC). Poluživot FVIII kada je vezan za vWF iznosi 8-12h, a kada je nevezan (nedostatak vWF u von Willebrandovoj bolesti), poluživot mu je značajno skraćen i iznosi 2,4h. Kada se pomoću vWF veže za aktivirane trombocite, FVIII se aktivira dejstvom trombina, pri čemu se vWF odvaja. Prilikom aktivacije dolazi do cepanja dve argininske veze, od kojih se jedna nalazi na teškom lancu na poziciji 372-373 čijim kidanjem nastaju dva peptidna lanca molekularne težine 43.000 i 50.000 daltona), dok se druga nalazi na lakom lancu na poziciji 1686-1687 i njenim kidanjem nastaje jedan peptidni lanac (molekularne težine 73.000 daltona). Tako aktivirani FVIII se vezuje na površini trombocita za FIXa, i kao što je već rečeno, formira kompleks FIXa/FVIIIa, odnosno kompleks tenaze. Nedostatak FVIII prouzrokuje hemofiliju A [26].

Gen za sintezu FIX (F9) takođe je lokalizovan na dugom kraku hromozoma X (Xq27) i kod obolelih od hemofilije B otkriveni su gotovo svi tipovi mutacija: inverzije, delecije, ninsens i tačkaste mutacije [23]. Gen F9 reguliše sintezu FIX koji je izuzetno značajan za proces koagulacije. FIX je jednolančani polipeptid, sastavljen od 415 aminokselina, molekularne težine 56.000 daltona. Sintetiše se u jetri uz neophodno prisustvo vitamina K. Njegova koncentracija u krvi iznosi oko 5 µg/ml, a poluživot mu je oko 24h. U toku aktivacije, od aminotermalnog dela molekula faktora IX nastaje laki lanac (molekularne težine 18.000 daltona), a od karboksitermalnog dela nastaje teški lanac (molekularne težine 28.000), pri čemu se oslobađa peptid aktivacije (molekularne težine 10.000 daltona). Oba lanca su međusobno povezana disulfidnim vezama. Aktivacija FIX nastaje dejstvom kompleksa FVIIa/TF na fosfolipidnoj membrani trombocita, uz prisustvo Ca^{2+} . Može ga aktivirati i FXIa, i ta reakcija se takođe odvija na membrani trombocita i u prisustvu Ca^{2+} . FIXa vezuje se na površini trombocita za VIIIa i sa njim gradi kompleks FIXa/VIIIa, ili kompleks tenaze. Nedostatak FIX uzrokuje hemofiliju B [26].

U retkim slučajevima hemofilija se ne mora javiti kao nasledna bolest već kao takozvana *stečena hemofilija*. Incidenca pojave stečene hemofilije je veoma retka i iznosi 1-4 slučajeva na

milion stanovnika godišnje. Nastaje usled razvoja antitela na epitope A2 i C2 regiona molekula FVIII. Češće se javlja kod žena i to starosti 20-40 godina, zato što je stečena hemofilija obično udružena sa trudnoćom i porođajem tako da oko 10% stečene hemofilije nastaje u postpartalnom periodu. Kod muškaraca je uglavnom javlja nakon 60-te godine života i često je udružena sa malignitetom. Takođe, korelacija između stečene hemofilije i upotrebe lekova, kao što su penicilin, sulfonamidi, hloramfenikol, difenilhidantion, fenitoin, metil dopa, depot tioksanten, interferon alfa, fludarabin, levodopa, hlopidrogel ili BCG vakcine, dobro je poznata [27].

4. Klinička slika

Hemofilija se obično manifestuje neuobičajenim krvarenjem u ranim godinama života i pojava prvog krvarenja zavisi od težine hemoilije. Kod teškog oblika hemofilije, prva epizoda krvarenja obično se javlja u uzrastu između 12 i 18 meseci, dok se kod srednje teške hemofilije prva manifestacija bolesti obično viđa između druge i pete godine života. Mada svi bolesnici sa teškom hemofilijom imaju epizode spontanog krvarenja u zglobove (hematroze), one se retko javljaju pre devetog meseca života kada deca počinju da pužu. Zapaženo je da trauma pri rođenju ne uzrokuje pojavu češćih intrakranijalnih hemoragija kod novorođenčadi obolele od hemofilije, sem kod upotrebe vakuum ekstrakcije ili forcepsa. Takođe, obilnije krvarenje prilikom cirkumcizije uočeno je kod manje od polovine dece sa teškom hemofilijom [28].

Najčešći simptom, karakterističan za hemofiliju, je krvarenje u zglobove (70-80%) i mišiće (10-20%). Najčešće zahvaćeni zglobovi su kolena (45%), laktovi (30%) i skočni zglobovi (15%), mada mogu biti zahvaćeni i ramena (3%), ručni zglobovi (3%), kao i kukovi (2%) [28]. Najčešći uzrok smrti su bila intrakranijalna krvarenja (5%), ali od sredine osamdesetih godina XX veka vodeći uzrok smrti postaje AIDS (sindrom stečene imunodeficijencije), s obzirom da su se tada koristili koncentracije faktora iz ljudske plazme za lečenje hemofilije, a detekcija virusa HIV-a (prouzrokovala AIDS-a) još uvek nije bila moguća. Preko 50% hemofiličara u SAD i zapadnoj Evropi zaraženo je tada virusom HIV-a. Hematurija i gastrointestinalna krvarenja su takođe čest problem. Retroperitonealni hematomi se mogu javiti spontano i mogu se spustiti duž psoas mišića do ingvinuma i butine ili se čak mogu širiti i na gore kroz vertebralne mišiće, zahvatajući čak i vrat. Krvarenje u zatvorenom prostoru kao što je podlaktica može dovesti do

razvoja „kompartment“ sindroma koji se karakteriše kompromitovanjem funkcije nerava i krvotoka. Ukoliko se ne leči (nadoknada faktora i hirurška dekompresija), krvarenje može dovesti do trajne neuropatije, nekroze tkiva ili čak i do amputacije. Takođe mogu se javiti i hemofilni pseudotumori koji su u stvari veliki inkapsulirani hematomi sa progresivnim cističnim oticanjem usled ponavljanih krvarenja. Mogu se javiti u fascijama i mišićima, velikim mišićnim grupama, kao i u dugim kostima, karlici i kranijumu usled subperiostalnih krvarenja sa destrukcijom kosti i stvaranjem novih koštanih formacija [28].

Značajan doprinos komorbiditetu ovih bolesnika imaju i transmisivni virusi hepatitisa B i C, takođe, zbog upotrebe neprečišćenih koncentrata faktora poreklom iz humane plazme [28].

5. Dijagnostičke procedure

Sumnju na hemofiliju treba postaviti kod bolesnika kod kojih postoje podaci o učestalom i lakom izlaženju modrica u detinjstvu, javljanje spontanih krvarenja, naročito u zglobove i meka tkiva, kao i opsežno krvarenje nakon povrede ili hirurške intervencije [2].

Kod sumnje na hemofiliju najpre treba uraditi rutinske testove hemostaze kao što su određivanje vremena krvarenja, PV i APTT test. Kod ovih bolesnika nivo fibrinogena je normalan, vreme krvarenja i PV test je u granisama normale a APTT je produžen. Nakon detektovanja produženog APTT potrebno je uraditi određivanje novoa FVIII/IX. Nivoi FVIII i FIX se procenjuju u odnosu na normalnu plazmu koja projektuje 100% aktivnost FVIII/IX ili (što je ekvivalentno) 1.0 jedinica u mililitru plazme (U/ml). Normalan raspon FVIII/FIX varira od 50-150%, mada je porast nivoa faktora udružen sa trudnoćom ali i godinama starosti [2,28]. Upotreba kontraceptiva koji sadrže estrogen takođe podižu nivo ovih faktora. Za normalne, zdrave neonatuse tipične su nešto snižene vrednosti FIX (ali ne i FVIII), 20-50%, nastaju zbog nezrelosti jetre koja ih sintetiše i unutar 6 meseci vrednosti se normalizuju [2,28]. Težina krvarenja kod obolelih od hemofilije je generalno u korelaciji sa koncentracijom faktora u plazmi (Tabela 1). Kod kongenitalnog deficita FVIII/FIX teškog stepena (< 1%) javljaju se česta i ozbiljna krvarenja, dok se viši nivo FVIII/FIX (> 1% do 5%) manifestuje umerenom ili blagom (> 5% od normalne aktivnosti) simptomatologijom [2,28].

Tabela 1: Težina krvarenja kod hemofilije u odnosu na nivo faktora koagulacije

Težina krvarenja	Nivo faktora koagulacije % aktivnosti (IU/ml)	Epizode krvarenja
Teško	< 1% (<0.01)	Spontana krvarenja, predominantno u zglobove i mišiće
Umereno	1-5% (0.01-0.05)	Povremena spontana krvarenja. Obilno krvarenje prilikom povrede ili hirurške intervencije
Blago	5-40% (0.05-0.4)	Obilno krvarenje uzrokovano masivnom povredom, odnosno hirurškom intervencijom

Hemofiliju najpre treba diferencijalno dijagnostički razdvojiti od von Willebrand-ove bolesti (vWD). Kod vWD vreme krvarenja je produženo dok je kod hemofilije normalno, APTT takođe može biti normalan ili umereno produžen. Međutim nivo vWF kod hemofilije je normalan a kod vWD snižen. Takođe je ristocetin-indukovana agregacija trombocita snižena kod vWD dok je kod hemofilije normalna [28].

Kod žena – prenosioca može se uraditi i perinatalna dijagnostika. Biopsija horiona obezbeđuje fetalnu DNA za analizu. Takođe antenatalnom dijagnostikom iz umbilikalne vene (iglena aspiracija pod kontrolom ultrazvučne dijagnostike) obezbeđuje se fetalna krv iz koje se može odrediti nivo FVIII/IX [28].

6. Lečenje

Kroz istoriju prepoznavanja i razumevanja hemofilije razvijali su se i načini lečenja ove bolesti. Prvi udžbenik koji je uključivao i poglavlje o lečenju hemofilije bio je „*The United*

States Surgeon's Catalogue“, koji je izdat 1901. godine i njegove preporuke bile su inhalacija kiseonika, upotreba štitne žlezde, koštane srži ali i vodonik peroksida. U sledećem izdanju (1926) preporuke su uključivale primenu injekcija natrijum citrata, kalcijum laktata, splenektomiju, dok pojedini istraživači publikuju radove sa primenom antidifteroidnog seruma, injekcije oksalne kiseline, ekstrakt bromida iz belanceta jajeta, međutim, treba imati u vidu da se tada još uvek nije znalo šta je hemofilija [8]. Prvi naučno zasnovan način lečenja, baziran na eksperimentalnom radu, publikovan je od strane Macfarlan-a 1934.godine u kojem se savetuje primena prokoagulantnog zmijskog otrova [7,8]. Ključ savremenog lečenja hemofilije bio je, naravno, u razvoju transfuzije krvi. Najranije zabeležena primena transfuzije krvi kod hemofilicara bila je od strane Lane-a 1840.godine, ali tek biohemičar Cohn razvija 1944.godine proces frakcionisanja kojim se plazma odvaja iz ostatka krvi [7,8]. Graham 1964.godine razvija krioprecipitat, a u narednim godinama Brinkhouse othriva kako prečistiti FVIII iz plazme. Primena liofiliziranog komercijalnog koncentrata FVIII, a potom i FIX, počinje sedamdesetih godina XX veka [7,8]. Naravno, ovakav način lečenja je doveo do obolevanja bolesnika sa hemofilijom od transmisivnih bolesti kao što su hepatitis B i C, a početkom osamdesetih godina XX veka i AIDS-.a. Smatra se da je do sredine osamdesetih godina polovina bolesnika sa hemofilijom lečenih koncentratom FVIII/IX bilo zaraženo virusom HIV-a a stopa smrtnosti ove populacije bolesnika je bila izuzetno visoka do pojave antiretroviralne terapije i poboljšanja procesa inaktivacije virusa u toku proizvodnje koncentrata faktora iz humane plazme devedesetih godina prošlog veka. Takođe, od 1985.godine počinje i era primena rekombinantnih faktora u lečenju bolesnika sa hemofilijom [7].

4.1. Lečenje krvarenja u hemofiliji A

Za lečenje krvarenja u hemofiliji A koriste se komercijalni preparati koncentrata FVIII poreklom iz ljudske plazme ili rekombinantni koncentrat FVIII (rFVIIaI) dobijen tehnikom genetskog inženjerstva [2,28].

Svaka jedinica FVIII po kilogramu telesne mase primenjena intravenski (i.v.) podiže nivo FVIII u plazmi za oko 2% [2]. Poluživot mu je otprilike 8-12h. Doza se izračunava množenjem telesne težine bolesnika u kg sa željenim nivoom faktora pomnoženo sa 0.5, čime se dobija broj

jedinica (i.j.) faktora koji treba primeniti (npr: 50 kg x 40 (% željenog nivoa) x 0.5 = 1000 i.j. FVIII). Preporučeni nivo FVIII i trajanje terapije u odnosu na tip krvarenja dati su u Tabeli 2. FVIII daje se u sporom i.v. bolusu i brzina ne bi trebalo da bude veća od 3 ml u minuti [2].

U izuzetnim slučajevima (nedostatak koncentrata FVIII) može se primeniti krioprecipitat. Jedna doza krioprecipitata sadrži 60-100 i.j. FVIII (otprilike oko 80 i.j.). Takođe, ukoliko nije dostupan koncentrat FVIII, primenjuje se i sveže zamrznuta plazma (SZP). Jedan ml SZP sadrži 0,6 i.j. FVIII [2].

Dezmpresin (1-deamino-8-D-arginin vazopresin – DDAVP) može se koristiti za lečenje bolesnika sa blagom formom bolesti (> 5% FVIII). DDAVP se primenjuje u dozi od 0.3 µg/kg i.v. u toku 30 minuta, u vidu subkutane injekcije ili intranazalno, uz substitucionu terapiju [2].

Antifibrinolitici, traneksamična kiselina i epsilon-aminokapronska kiselina, mogu se primenjivati oralno ili intravenski. Naročito su efikasni u zaustavljanju mukoznih krvarenja kao što je primena prilikom ekstrakcije zuba i smanjuju potrošnju koncentrata faktora [2].

4.2. Lečenje krvarenja u hemofiliji B

Za lečenje krvarenja u hemofiliji B koriste se komercijalni preparati koncentrata FIX poreklom iz ljudske plazme, rekombinantni FIX kao i retko koncentrat protombinskog kompleksa. Svaka jedinica FIX data i.v. podiže nivo FIX u plazmi za 1%. Međutim, odgovor na primenu rFIX je slabiji, odnosno svaka jedinica rFIX podiže nivo FIX u plazmi za 0.8% kod odraslih i za 0.7% kod dece. Razlog slabijeg odgovora na rFIX za sada nije poznat. Poluživot i.v. datog FIX iznosi 18-24h. Doza se izračunava množenjem telesne težine bolesnika u kg sa željenim nivoom faktora čime se dobija broj jedinica FIX koji treba primeniti (npr. 50 kg x 40 (% željenog nivoa) = 2000 i.j. FIX). Preporučeni nivo FIX i trajanje terapije u odnosu na tip krvarenja dat je u Tabeli 2. FIX se daje u sporom i.v. bolusu i brzina primene ne bi trebala da bude veća od 3 ml u minuti [2].

Ukoliko koncentrat FIX nije dostupan može se primeniti SZP. Preporučena početna doza je 15-20 ml/kg. I kod hemofilije B primenjuju se antibibrinolitici, posebno za zaustavljanje mukoznih krvarenja (ekstrakcija zuba) [2].

Ekstrakcija zuba

Za intervenciju ekstrakcije zuba potrebno je obezbediti nivo faktora od 50% za hemofiliju A i 40% za hemofiliju B pre davanja lokalnog anestetika i započinjanja intervencije. Terapija se ukoliko nema krvarenja nastavlja primenom antifibrinolitika i to: traneksamična kiselina 25-50 mg/kg na 6-8 h oralno 10 dana ili epsilon-aminokapronska kiselina 50-100 mg/kg svakih 4-6 h (maksimalno 24 g za 24 h) 5-10 dana. Antifibrinolitici se mogu primenjivati i lokalno kao oralni rastvor [2].

Epistaksa

Formiranje trombocitnog ufruska na mestu povrede obično je dovoljni za zaustavljanje krvarenja te primena faktora najčešće nije potrebna. Prilikom epistakse potrebno je saviti glavu bolesnika napred da bi se izbeglo gutanje krvi i savetovati mu da izduva postojeće ugruške. Potom lokalno, u unutrašnjost nosa, staviti gazu natopljenom ledenom vodom i držati čvrsto narednih 20 minuta. Antihistaminisi i dekonjestivi mogu takođe biti korisni. U slučaju intenzivnijeg ili ponavljanih krvarenja konsultovati otorinolaringologa i primeniti koncentrt faktora sa željenim nivoom od 50% [2].

Tabela2 : Primena FVIII/IX kod bolesnika sa hemofilijom u slučaju krvarenja -preporuke WFH [2]

Tip krvarenja	Hemofilija A		Hemofilija B	
	Željeni nivo FVIII	Dužina primene (dani)	Željeni nivo FIX	Dužina primene (dani)
Zglob	40-60%	1-2, produžiti ukoliko nema adekvatnog terapijskog odgovora	40-60%	1-2, produžiti ukoliko nema adekvatnog terapijskog odgovora
Mišići (izuzev ileopsoasa)	40-60%	2-3, produžiti ukoliko nema adekvatnog terapijskog odgovora	40-60%	2-3, produžiti ukoliko nema adekvatnog terapijskog odgovora
Ileopsoas				
• inicijalno	80-100%	1-2	60-80%	1-2
• održavanje	30-60%	3-5, ponekad duže kao profilaksa u toku fizikalne terapije	30-60%	3-5, ponekad duže kao profilaksa u toku fizikalne terapije
CNS				
• inicijalno	80-100%	1-7	60-80%	1-7
• održavanje	50%	8-21	30%	8-21
Grlo i vrat				
• inicijalno	80-100%	1-7	60-80%	1-7
• održavanje	50%	8-14	30%	8-14
GIT				
• inicijalno	80-100%	1-6	60-80%	1-6
• održavanje	50%	7-14	30%	7-14
Renalna	50%	3-5	40%	3-5
Duboka razderotina	50%	5-7	40%	5-7
Velika operacija				
• Pre-op	80-100%		60-80%	
• Post-op	60-80%	1-3	40-60%	1-3
	40-60%	4-6	30-50%	4-6
	30-50%	7-14	20-40%	7-14

4.3. Hemofilija sa inhibitorom

Prvu pojavu inhibitora kod bolesnika hemofilijom A koji je lečen transfuzijama krvi opisali su Lawrence i Jonson 1941.godine [29]. Detektovali su cirkulišući antikoagulant koji je produžavao vreme koagulacije normalne plazme. Cradog i Lowrence su konačno 1947. utvrdili da je otkriveni antikoagulant u stvari antitelo koje prepoznaje – kako je u to vreme nazivan – antihemofilni globulin [29]. Šesdesetih godina prošlog veka ovaj antikoagulans je identifikovan kao antitelo koje pripada klasi imunoglobulina IgG [30]. Ovo IgG antitelo vezuje se za specifične epitope FVIII kao što su A2 (mesto vezivanja FIXa), A3 (mesto vezivanja vWF i C2 region (mesto vezivanja za fisfolipide) [30,31].

4.3.1. Epidemiologija i dijagnostikovanje hemofilije sa inhibitorom

Rizik razvoja inhibitora kod hemofilije B je 2% dok kod hemofilije A iznosi 25%. Dokazano je da postoji genska predispozicija za nastanak inhibitora jer velike delecije i nonsens mutacije, kao i intron 22 inverzije kod hemofilije A predisponiraju ove bolesnike na razvoj inhibitora [30]. Pretpostavlja se da sama tehnologija proizvodnje koncentrata faktora (pasterizacija, jonska hromatografija, monoklonskamantitela, detergentski) mogu uticati na antigenost koncentrata. Opisana je i pojava inhibitora nakon zamene jednog koncentrata drugim. Takođe je uočena veća incidenca pojave inhibitora kod bolesnika lečenih kontinuiranom primenom faktora. Međutim, za sada nije dokazano da je pojava inhibitora učestalija kod primene rekombinantnih faktora u odnosu na plazmatske koncentrate faktora [29-30].

Za merenje inhibitora koristi se Bethesda metod, odnosno Nijmegen modifikacija koja omogućava merenje inhibitora u malom titru. Jedna Bethesda jedinica (Bj) inhibitora neutrališe 50% egzogenog FVIII posle 2 časa inkubacije na 37C [31].

Postoje dve vrste inhibitora: jedna vrsta inhibitora se javlja ubrzo nakon primene faktora i titar je mu obično iznad 10 Bj („high responder“); druga vrsta inhibitora nastaje sporo („low responder“) i njegov titar je obično manji od 5 Bj [32].

Na postojanje inhibitora treba posumnjati ukoliko bolesnik ne reaguje na do tada uobičajene doze koncentrata faktora. Najpre treba uraditi test mešanja plazme bolesnika sa normalnom plazmom kod koje dovodi do korekcije APTT bolesnika., međutim, nakon jednog časa inkubacije na 37C APTT se produžava [32].

4.3.2. Lečenje hemofilije sa inhibitorom

Za lečenje krvarenja kod bolesnika sa hemofilijom i inhibitorom koriste se : koncentrat protrombinskog kompleksa (KPK), aktivirani koncentrat protrombinskog kompleksa (FEIBA – Factor Eights Inhibitors Bypassing Activity), koncentrat svinjskog FVIII (Hyate:C; napomena: više se ne proizvodi) i rekombinantni aktivirani FVII (rFVIIa) [32].

FEIBA se koristi u dozi od 50-100 i.j./kg i.v. na 8-12h kod hemofilije A i efikasno zaustavlja 82% akutnih i 91% hirurških krvarenja. Kratak poluživot ovog preparata ograničava njegovu efikasnost. Ukoliko se upotrebljava u većim dozama potencira se njegova trombogenost, zbog čega je maksimalna dnevna doza ograničena na 200 i.j./kg [32]

Koncentrat svinjskog FVIII (Hyate:C) primenjivan je ukoliko inhibitor nije pokazivao unakrsnu reakciju na svinjski faktor i to u dozi od 50-150 i.j./kg i efikasnost se mogla meriti određivanjem nivoa FVIII [32].

Za zaustavljanje krvarenja kod bolesnika sa hemofilijom i inhibitorom više od 10 godina koristi se rVIIa (NovoSeven), koji za sada predstavlja najbezbedniju terapijsku opciju za ove bolesnike. Ranom primenom rVIIa postiže se terapijski uspeh u preko 90% bolesnika. S obzirom da ima kratak poluživot koji kod odraslih iznosi 2.7 h a kod dece 2 h, primenjuje se na svaka dva sada u dozi od 90-120 µg/kg i.v. do zaustavljanja krvarenja. Dokazano je da je jedna doza od 270 µg/kg efikasna kao tri doze od 90 µg/kg [32].

Za hirurške intervencije, rFVIIa se primenjuje u dozi od 90-120 µg/kg prvih 48 časova, zatim se povećava interval između doza do kraja lečenja. Duže lečenje je potrebno za veće hirurške intervencije a kraće lečenje 1-3 dana za manje hirurške intervencije i invazivne procedure [32].

Ukoliko se koristi FEIBA za veće hirurške intervencije treba dati punu dozu od 200 i.j./kg prva 2-4 dan, potom postepeno smanjivati dozu do kraja lečenja [32].

Za elektivne ortopedske operacije, preporučuje se davanje bolus doze rFVIIa od 120-180 µg/kg a zatim se nastavlja primenom doze od 90 µg/kg na svakih 2 sata u toku trajanja operacije. Primena rFVIIa u dozi od 90 µg/kg nastavlja se na svaka 2 sata u toku prvih 48 postoperativnih sati. Deset minuta pre skidanja drenova treba primeniti bolus dozu od 90 µg/kg, potom se može produžiti davanje leka na 3 sata narednih 48 sati. Od petog dana interval primene leka se može produžiti na 4 sata narednih 72 sata. Od osmog dana interval primene rFVIIa se produžava na 6 sati do otpusta. Pred skidanje konaca treba dati bolus dozu od 90 µg/kg. U slučaju neadekvatnog terapijskog odgovora treba razmotriti primenu FEIBA ili eskalaciju doze rFVIIa [32].

Eradikacija inhibitora u hemofiliji

Poslednjih 30 godina za eradikaciju inhibitora kod bolesnika sa hemofilijom koriste se razni terapijski postupci kao što je imunosupresija, imunomodulacija, imunoadsorpsija, imunodeplecija, imunotolerancija ili njihova kombinacija [32,33].

Da bi se postigla potpuna eradikacija inhibitora, poslednjih 30 godina primenjuje indukcija imune tolerancije (ITI) [32-34] Postoji nekoliko ITI protokola i svi se baziraju na primeni rekombinantnih faktora uz dodatak FEIBA, Prednisona, Ciclophosphamid-a, u zavisnosti od ITI protokola. Primena ITI efikasna je kod 60-80% bolesnika sa hemofilijom A i 36% kod bolesnika sa hemofilijom B. Smatra se da ITI treba započeti što pre od pojave inhibitora kada je inhibitor veći od 5 Bj a manji od 10 Bj [32-34].

5. Profilaktička terapija kod bolesnika sa hemofilijom

Profilaksa u teškoj hemofiliji podrazumeva kontinuiranu primenu faktora koagulacije u redovnim vremenskim intervalima u cilju sprečavanja krvarenja [2,35]. Primena profilakse kod bolesnika sa hemofilijom započela je još krajem pedesetih godina prošlog veka grupa istraživača u Švedskoj okupljena oko Prof dr Inga Mariae Nilsson, tada sa redovnim transfuzijama krioprecipitata, s ciljem da se bolesnici sa teškom hemofilijom prevedu u srednje tešku

hemofiliju koja ne krvari spontano [35,36]. Ova grupa naučnika je potom šezdesetih godina XX veka, na osnovu laboratorijskih i kliničkih studija sprovedenih na uzorku od 157 bolesnika sa hemofilijom jasno pokazala da se učestala, rekurentna krvarenja i zglobna oštećenja predominantno javljaju kod bolesnika sa teškom formom bolesti, odnosno kod kojih je nivo faktora $< 1\%$, u poređenju sa hemofiličarima sa umerenom formom bolesti kod kojih je nivo faktora $\geq 1\%$ [37,38]. Na ovom zapažanju se zasniva danas racionalna osnova za primenu profilaktičke terapije koja ima za cilj da se bolesnici sa teškom hemofilijom prevedu u umerenu formu bolesti. Studija Nilsson i sar. trajala je skoro 30 godina i najpre je uključivala decu sa već postojećim oštećenjima zglobova a potom je obuhvatila i decu kod koje još nije bilo pojave oštećenja zglobova. Rezultati ove obimne studije publikovani su 1992. i 1997.godine i zaključci su bili da profilaktička terapija bolesnika sa hemofilijom znatno smanjuje broj epizoda krvarenja tako da su zglobna oštećenja ove populacije hemofiličara znatno manja [36,38].

Profilaktička terapija hemofilije može biti primarna i sekundarna. Primarna profilaksa podrazumeva njeno započinjanje pre nastanka oštećenja zglobova što je definisano kao započinjanje kontinuirane primene faktora pre druge godine života ili nakon prve epizode krvarenja u zglob. Sekundarna profilaksa podrazumeva redovnu primenu faktora nakon druge godine života ili nakon dva ili više krvarenja u zglob [4,39]. Nakon skoro 40 godina primene profilaktičke terapije, brojne studije su pokazale superiornost ove terapije u odnosu na lečenje „on demand“ (na zahtev) koje se primenjuje samo u slučaju zbrinjavanja epizode krvarenja. Bolesnici koji su bili na profilaksi imali su značajno manji broj epizoda spontanog krvarenja, očuvanost zglobova je bila značajno bolja a samim tim i bolji kvalitet života ove populacije obolelih od hemofilije [39-41].

„Zlatni standard“ profilaktičkog režima lečenja hemofilije postavila je upravo navedena Švedska grupa istraživača (Nilsson i sar.) i on podrazumeva primenu koncentrata FVIII tri puta nedeljno u dozi od 20-40 i.j./kg (hemofilija A), odnosno koncentrata FIX u istoj dozi dva puta nedeljno (hemofilija B) [4,37,38,39]. Poslednjih godina pojavljuju se publikacije u kojima se na osnovu rezultata mnogih studija preporučuju doze u profilaktičkom lečenju hemofilije od 25-40 i.j./kg tri puta nedeljno za hemofiliju A i dva puta nedeljno za hemofiliju B, a ovo je ujedno i preporuka Svetske Federacije za hemofiliju (WFH) [2,41]. Najveći nedostatak profilaktičkog

lečenja hemofilije je visoka cena ovakvog tretmana. Ovo je i razlog zbog čega se pokušalo sa primenom manjih doza faktora u profilaksi. Holandska grupa je 1997.godine pokazala da primena takozvanih inermedijarnih doza faktora u profilaksi bolesnika sa hemofilijom daje slične rezultate kao i pune doze profilakse. Preporučene doze ove grupe su 15-25 i.j./kg dva do tri puta nedeljno za hemofiliju A i 30-50 i.j. /kg jednom do dva puta nedeljno za hemofiliju B, što je oko 35 i.j./kg u ukupnoj nedeljnoj dozi [42,44].

Primarna profilaksa je danas prihvaćena i od strane WFH kao najbolji način lečenja u cilju sprečavanja pojave hroničnog oštećenja zglobova (hemofilične artropatije) a time i prevencije invaliditeta ovih bolesnika [2]. Zbog toga se, iako je potrošnja faktora veća, primena profilakse dugoročno ekonomski isplati jer se ovakvim vidom lečenja zglobovi bolesnika sa hemofilijom sačuvaju i kasnije ne zahtevaju dalje lečenje invaliditeta koje se neizostavno razvija ukoliko se ne primenjuje profilaktički način lečenja hemofilije [37-42].

Sekundarna profilaksa bolesnika sa hemofilijom podrazumeva započinjanje njene primene nakon razvoja oštećenja zgloba [39]. Ovaj tip profilakse značajno poboljšava kvalitet života ovih bolesnika jer značajno smanjuje broj epizoda krvarenja, ne samo u zglobove već i u drugim delovima tela kao što su gastrointestinalna ili intrakranijalna krvarenja, ali nije u stanju da popravi oštećenje zglobova koja su nastala usled ranijih krvarenja [39]. Definicije terapijskih modela lečenja hemofilije date su na Tabeli 3.

Tabela 3: Definicija terapijskih modela za bolesnike za hemofilijom (European network for pediatric haemophilia management, WFH) [2,39].

Model	Definicija
Primarna profilaksa	Kontinuirani, regularni tretman koji započinje pre 2 godine života ili nakon prvog krvarenja u zglob
Sekundarna profilaksa	A: kontrinuirni, regularni (dugotrajni) tretman koji započinje nakon 2 godine života ili nakon ≥ 2 epizoda krvarenja u zglob B: Povremeni (kratkotrajni) tretman u trajanju od 4-8 nedelja u cilju zaustavljanja ciklusa ponavljanih krvarenja u zglob
„On demand“ tretman	Tretman koji se psorovodi kada se javi krvarenje

HEMOFILNA ARTROPATIJA

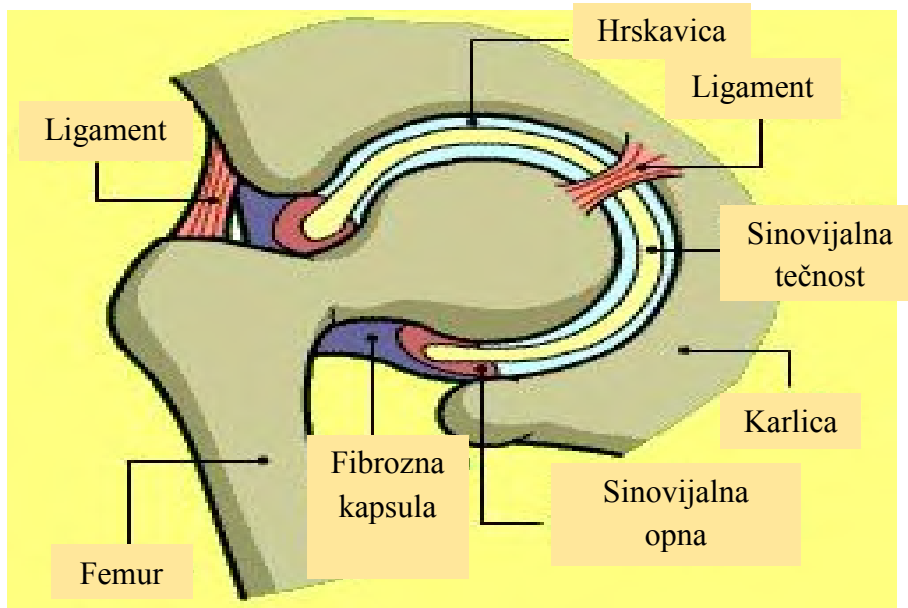
Za bolesnike sa teškom hemofilijom karakteristična su učestala spontana krvarenja u zglobove (hemartroza) koja čine više od 90% svih ozbiljnih epizoda krvarenja i uglavnom su pogođeni kao ciljni (target) zglobovi: kolena, laktovi i skočni zglobovi [6,45]. Nakon dužeg perioda, ponavljane epizode hemartroze uzrokuju ireverzibilna oštećenja zgloba dovodeći do pojave hemofilične artropatije (HA), poliartikularne bolesti koju karakteriše ukočenost zgloba, hronični bol i ozbiljan stepen ograničene pokretljivosti zgloba [6]. Kod većine teških slučajeva, zglobne kosti se spajaju što dovodi do potpune onesposobljenosti zgloba, odnosno do teškog invaliditeta ovih bolesnika, te na taj način značajno umanjuje njihov kvalitet života i doprinosi značajnom morbiditetu ove bolesti. Studije koje su sprovedene osamdesetih i devedesetih godina prošlog veka pokazale su da 90% bolesnika sa teškom hemofilijom razvije HA jednog od šest zglobova do 25-te godine života [6]. Patogenetski put razvoja od rekurentnih hemartroza do HA, posebno rane promene, još uvek nije dovoljno razjašnjen. To je zaista kompleksan, multifaktorijalan proces koji uključuje nekoliko degenerativnih hrskavicom-posredujućih i infamatornih sinovijom-posredujućih komponenti [45]. Za sada, možemo se nadati da će bolje razumevanje patogeneze ove teške komplikacije dovesti do razvoja novih efikasnih terapijskih strategija.

Karakteristike HA su hronični proliferativni sinovitis i destrukcija hrskavice. Oba događaja su posledice ponavljanih dijagnostikovanih i nedijagnostikovanih krvarenja u zglob. Hemofilni sinovitis je proliferativni poremećaj sinovijalnog tkiva, dok je destrukcija hrskavice rezultat proizvodnje enzima i citokina od strane inflamatornih ćelija koje infiltruju sinovijalnu membranu. Dakle, HA pokazuje karakteristike inflamatorne i degenerativne bolesti zgloba [45].

U proceni HA koriste se razni skorovi koji podrazumevaju vizuelnu procenu oštećenja zgloba primenom „imaging“ metoda kao što su radiografija ili magnetna rezonanca. Za sada je najprihvatljiviji (i u najčešćoj upotrebi) Pettersson skor koji se zasniva na radiografskoj proceni oštećenja zglobova [45].

1. Komponente zgloba

Delove zgloba čine: zglobna hrskavica, sinovijalna opna, kosti i vaskularno tkivo unutar zgloba. Zglobna hrskavica prekriva epifize kostiju koje čine zglob čime omogućava elastičnost ivica zgloba i time povećava njihovu otpornost na opterećenje težinom. Fibrozna kapsula koja se nastavlja na periost kosti, sadrži mnoštvo nervnih vlakana, ali ne sadrži krvne sudove, odnosno predstavlja avaskularno tkivo. Sinovijalna opna prekriva nehrskavičave delove unutrašnjih zglobnih površina i sastoji se iz dva sloja: subintime i intime. Fibroblastne ćelije koje se nalaze unutar intimalnog sloja imaju sintetsku funkciju, dok makrofagi imaju ulogu u uklanjanju krvi i ostalih štetnih substanci iz zglobnog prostora. Ispod intime nalazi se subintimni sloj sinovijalne opne koji sadrži krvne sudove koji obezbeđuju kiseonik, hranjive materije i faktore rasta za sinoviju i avaskularnu hrskavicu. Zglobna šupljina koja se nalazi unutar samog zgloba obezbeđuje smanjenje sile trenja između zglobnih površina i sadrži hijaluronsku kiselinu, lubricin, proteinaze i kolagenaze [45-47]. Komponente sinovijalnog zgloba prikazane su na Slici 1.



Slika 1: Sinovijalni zglob (www. Robert Mcgrory website/anatomy 3)

1.1. Zglobna hrskavica

Zglobna (hijalina) hrskavica je avaskularno tkivo sastavljeno iz specijalizovanog matriksa koga čini kolagen, proteoglikani i nekolageni proteini i u kojem hondrociti predstavljaju jedinu ćelijsku komponentu [48].

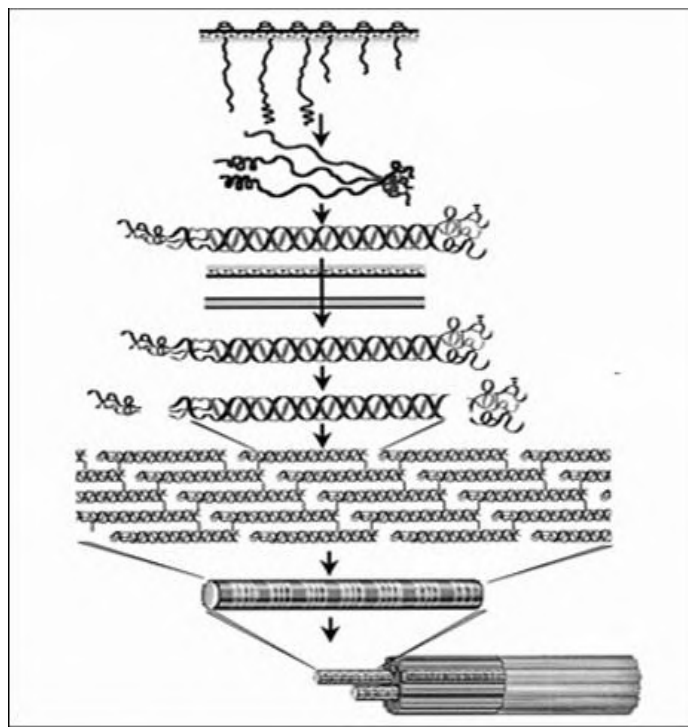
1.1.1. Hondrociti

Hondrociti imaju ulogu u sintezi svih elemenata matriksa, kako kolagenih tako i nekolagenih komponenti. Takođe, hondrociti sintetišu kolagenaze i agrekanaze – enzime koji imaju ulogu u razgradnji kolagena i proteoglikana matriksa. Jedna od najznačajnijih kolagenaza, koja je i najviše ispitivana je matriks metaloproteinaza 13 (MMP13) koja ima ulogu u razgradnji kolagena zglobne hrskavice [47]. U toku oštećenja hrskavice hondrociti proizvode i proinflamatorne citokine kao što su interleukin (IL) - 1, IL - 6 i alfa faktor tumorske nekroze (TNF α) [49]. Ove funkcije - sinteza i razgradnja matriksa čine ulogu hondrocita ključnom u procesu obnavljanja zglobne hrskavice prilikom njenog oštećenja. Kada stopa razgradnje matriksa bude veća od stope sinteze novih molekula od strane hondrocita, nastaju oboljenja zglobova [47,49].

1.1.2. Kolagen zglobne hrskavice

Dve trećine zglobne hrskavice čini kolagen. Kolagen tip II je najzastupljeniji tip kolagena u zglobnoj hrskavici odraslih ($\geq 90\%$), zatim tu je kolagen tip XI (oko 3%) i kolagen tip IX (oko 1%). Kolagen tip II ima ulogu da obezbedi tenzilnu snagu (na istezanje) zglobnoj hrskavici [49].

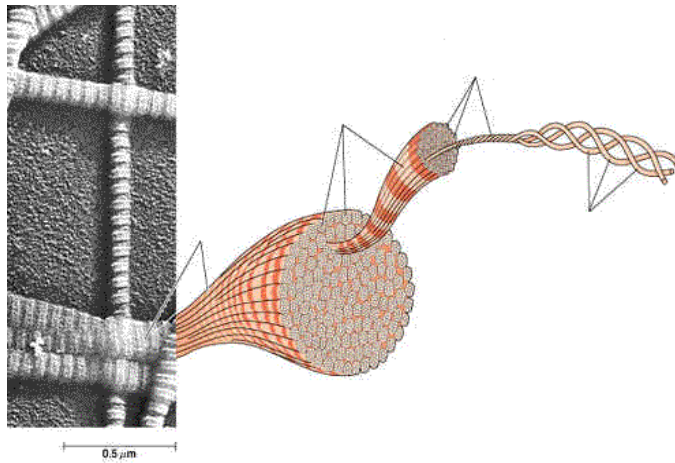
Kolagen je sastavljen od paralelno raspoređenih vlakana, „fibrila“, debljine 0.2-0.5 mikrona spojenih mukopolisaharidima (Slika 1). Fibrili su dalje sastavljeni iz mikrofibrila debljine 100-150 angstrema, koji predstavljaju agregate molekula tropokolagena. Nizovi osnovnih molekula tropokolagena ujedanju se u dugačke lančane agregate-mikrofibrile zahvaljujući specifičnim završim peptidima-telopeptidima (Slika 2). Na tim mestima ih proteolitičke supstance najlakše cepaju. Svaka molekula tropokolagena ima na suprotnim krajevima-telopeptidima, aminokiselinsku (N - terminalnu) ili karboksilnu (C - terminalnu) grupu, što omogućava stvaranjem unakrsnih veza povezivanjem u lančaste nizove [50].



Slika 2: Trolančana struktura molekula tropokolagena i njihova agregacija u mikrofibrile kolagena (www. php.med.unsw.edu.au/Image Library)

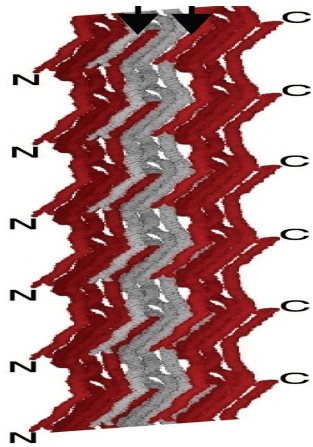
Osnovne komponente kolagena sintetišu hondrociti. U cisternama endoplazmatskog retikuluma nastaje granulirani materijal koji predstavlja prekursor osnovne molekule

tropokolagena. Ovaj primarni sintetski produkt se dalje transportuje u sastav Golgi zone gde se vrši adicija polisaharida na lance aminokiselina. Sekretorne vezikule koje sadrže molekule tropokolagena se stapaju sa ćelijskom membranom i zatim izlučuju preko površine. U neposrednoj blizini ćelija formiraju se fina vlakanca, čijom postupnom agregcijom nastaju kolagenski fibrili. Pod kontrolom i daljom vanćelijskom organizacijom faktora međucelijske sredine, dolazi do polimerizacije izlučenih komponenata sa formiranjem protofibrila. Uz učešće mukopolisaharida i fermenta koji su takođe produkti fibroblasta, nastaju udruženi fibrilarni snopovi-kolagena vlakna (Slika 3) [49,50].



Slika 3: Udruživanje fibrila kolagena u snopove kolagenih vlakana
(www.php.med.unsw.edu.au/ImageLibrary)

Molekul kolagena tip I se sastoji iz tri spiralna lanca koja su međusobno povezana piridinom. Amino i karboksi krajevi ove trolančane strukture se nazivaju N-telozeptid i C-telozeptid (Slika 4). Dok su u kolagenim vlaknima, molekuli kolagena bivaju podvrgnuti sporim hemijskim promenama. Intermolekularne veze se formiraju unakrsnim vezivanjem terminalnih telozeptida. Ove unakrsne veze su najpre bivalentne, ali vremenom sazrevaju u multivalentne strukture [49,50].



Slika 4: Amino terminalni (N-telopeptid) i karboksi terminalni (C-telopeptid) krajevi kolagena tip II ([www. php.med.unsw.edu.au/ImageLibrary](http://www.php.med.unsw.edu.au/ImageLibrary))

Razgradnja kolagena zglobne hrskavice odvija se pod dejstvom kolagenaze MMP13 koja odvaja C terminalni teloepetid kolagena tip II (CTX-II) u solubilne monomere [47].

1.1.3. Proteoglikani

Proteoglikani čine čvrst substrat hijaline hrskavice i sadrže tri vrste glikozaminoglikana: hijaluronsku kiselinu, hondroitin sulfat i keratin sulfat. Hondroitin i keratin sulfat se spajaju u takozvano proteinsko jezgro („core protein“) i formiraju proteoglikan monomer. Svaki pojedini molekul hijaluronske kiseline udružuje se sa oko 80 molekula monomera proteoglikana i na taj način formiraju velike agregate hijaluronat proteoglikana – agrekane. Ovi agregati se vezuju za tanke fibrile kolagena matriksa elektrostatičkim interakcijama i unakrsnim vezama putem glikoproteina, tako da imaju esencijalnu ulogu u zaštiti kolagene mreže. Proteoglikani obezbeđuju hijalinoj hrskavici otpornost na silu pritiska (kompresiju) [47,49].

1.1.4. Nekolageni proteini

Nekolageni proteini matriksa hrskavice pripadaju grupi glikoproteina iz familije trombospondina i tu spadaju: dekorin, fibromodulin, fibronektin, biglikan, anhorin CII, tenascin, matrilini i oligomerni matriks protein hrskavice (COMP – eng. „cartilage oligomeric matrix protein“). Ovi mali regulatorni i strukturalni proteini utiču na interakcije između hondrocita i matriksa, odnosno pomažu hondrocitima da ostanu pričvršćeni za matriks. Dokazano je da je uloga COMP da katalizuje fibrilogenezu kolagena [46,47,49].

2. Patofiziologija hemofilne artropatije

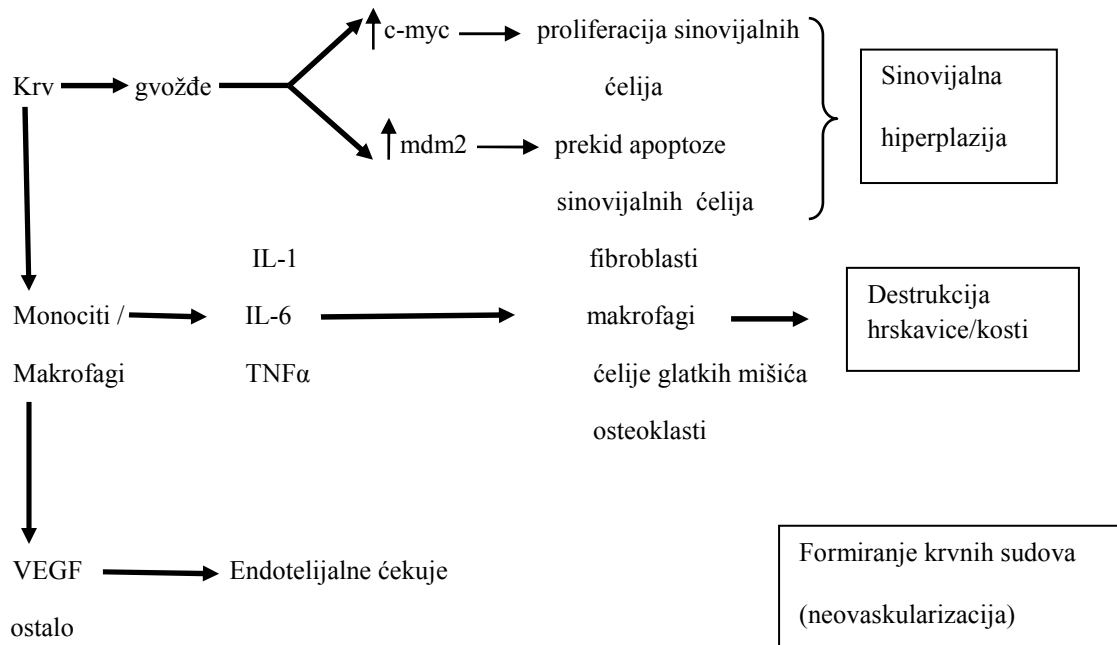
Sve komponente zgloba: hrskavica, sinovija, kosti i vaskularno tkivo zgloba – mogu biti mete krvarenja (hemartroze). Najpre je smatrano da promene u sinoviji prethode oštećenju hrskavice [7]. Ovakvo shvatanje je bilo podržano istraživanjima koja su pokazala da lizosomalni enzimi i citokini koje proizvodi inflamirana sinovija oštećuju hrskavicu. Međutim, nedavnim istraživanjima pokazano je da intraartikularna krv direktno oštećuje hrskavicu pre i nezavisno od bilo kakvih promena u sinoviji, tako da se ovo smatra inicijalnim događajem u razvoju oštećenja zgloba kod bolesnika sa hemofilijom, odnosno u razvoju HA i javlja se pre inflamacije sinovije [45-47].

Istraživanja *in vitro* su pokazala da ukoliko se hrskavica kultiviše u prisustvu pune krvi u trajanju od 4 dana (vreme za koje se smatra da je potrebno za evakuaciju krvi iz zgloba u uslovima hemartroze) dolazi do inhibicije sinteze proteoglikana, povećanog oslobađanja (razgradnje) komponenti matriksa kao i do povećane apoptoze hondrocita. Takođe je dokazano da ovi događaji zavise od koncentracije krvi i vremena izlaganja i dovode do jasnog gubitka matriksa zglobne hrskavice. Istraživanja *in vivo* pokazala su da jednokratno izlaganje zgloba krvarenju uzrokuje dugotrajne promene u smislu smanjenja aktivnosti hondrocita i oštećenja integriteta matriksa hrskavice. Klinički značaj ovih istraživanja mogao bi da bude i moguće

objašnjenje zbog čega samo jedna epizoda krvarenja u zglob u ranom detinjstvu može dovesti do pojave oštećenja zgloba u narednoj deceniji života ili kasnije [51].

U razvoju sinovijalne proliferacije glavnu ulogu ima gvožđe [45,46]. Naime, prilikom krvarenja u zglob, odvija se fagocitoza gvožđa od strane makrofaga koji ga u obliku hemosiderina deponuju u sinoviju. Odgovor sinovije je povećana sinteza inflamatornih citokina kao što su TNF α , gama interferon (If γ), IL-1 i IL-6, što dovodi do razvoja hronične inflamacije sinovije [45,46]. Takođe, deponovani hemosiderin aktivira ekspresiju liganda nuklearnog faktora – kapa B (RANKL) uzrokujući povećanu aktivnost osteoklasta što dovodi do demineralizacije kosti, osteoporoze i destrukcije koštanih zglobnih površina. Uzrok proliferacije sinovije koja se viđa kod HA je aktivacija protoonkogene *c-myc* u sinovijalnim fibroblastima od strane deponovanog gvožđa. Eksperimentalna istraživanja (sprovedena na miševima) pokazala su takođe da krvarenje u zglob dovodi do povećane ekspresije MDM2, p53 vezujućeg proteina, koji prekida apoptozu sinoviocita i na taj način dovodi do povećane proliferacije sinovijalne opne [45,46]. Karakteristično za sinovijalnu opnu kod HA je njena neovaskularizacija koja je takođe direktna posledica delovanja deponovanog gvožđa na pericite krvnih sudova ćelija glatkih mišića intime i subintime, kao i povećane sinteze vaskularnog endotelnog faktora rasta (VGEF) koji dovodi do povećane angiogeneze (Shema 4) [45,46].

Shema 4: Patofiziologija hemofilične artropatije



3. Biomarkeri razgradnje zglobne hrskavice

Biomarkeri su molekuli ili fragmenti koji se oslobađaju u biološke tečnosti tokom razgradnje tkiva. Prilikom oštećenja zgloba nastaju biomarkeri pojačane destrukcije ili sinteze hrskavice, kosti ili sinovije. Biomarkeri u krvi i urinu su od posebnog interesovanja s obzirom na lako prikupljanje uzoraka za klinički monitoring u odnosu na biomarkere sinovijalne tečnosti do kojih je teže doći [52].

Do sada najispitivaniji biomarkeri oštećenja zglobne hrskavice su C terminalni telopeptid kolagena tip II - CTX-II i oligometrični matriks protein - COMP. Njihova povećana koncentracija u krvi i urinu najpre je dokazana kod oboljenja zglobova kao što su osteoartritis (OA) i reumatoidni artritis (RA), gde je pokazana i njegova pozitivna prediktivna vrednost za progresiju artropatije [52]. Tek u skoro publikovanoj studiji Jansen i sar. 2009.godine dokazano je da je kod bolesnika sa hemofilijom njihova koncentracija u serumu (CTX-II i COMP) i urinu (CTX-II) povišena. Takođe, ista studija je dokazala da postoji pozitivna korelacija između

koncentracije ovih biomarkera i radiološki verifikovanog oštećenja zgloba kod bolesnika sa hemofilijom [52].

CTX-II predstavlja karboksi terminalni telopeptid kolagena tip II koji se odvaja od kolagena pod dejstvom kolagenaze MMP13. Direktnim toksičnim dejstvom krvi na hrskavicu zgloba dolazi do smanjene sinteze inhibitora kolagenaze MMP13 što za rezultat ima povećanu aktivnost kolagenaze MMP13 na degradaciju kolagena tip II odvajanjem njegovog karboksilnog kraja. Ovim procesom stvaraju se solubilni molekuli CTX-II koji se mogu izmeriti u krvi, a s obzirom da se izlučuju putem bubrežne eliminacije, takođe se mogu kvantifikovati i u urinu [47,49,51].

COMP je nekolageni protein matriksa zglobne hrskavice, pripada familiji trombospondina i njegovim vezivanjem za kolegena vlakna stabilizuje se kolagena mreža. COMP se ne nalazi ekskluzivno samo u hrskavici, već se nalazi i u tetivama, meniskusima i sinovijalnom tkivu. Prisustvo krvi u zglobu ima toksično dejstvo na hrskavicu koja produkuje razne citokine koji dovode do povećanog oslobađanja komponenti matriksa, među kojima je i COMP [48]. Takođe proinflamatorni citokini koje sintetiše sinovija usled toksičnog depoa hemosiderima takođe pojačava razgradnju hrskavice, što oslobađa COMP iz matriksa u sinovijalnu tečnost i serum [47,48]. I u ovom slučaju je povišena koncentracija COMP u serumu najpre opisana kod OA i RA, a tek u studiji Jansen i sar. dokazano je i da je kod bolesnika sa HA i radiološki potvrđenom HA povišena vrednost ovog biomarkera u serumu. Za COMP je dokazano da je pozitivnoj u korelaciji sa radiološki procenjenim stepenom oštećenja zgloba [52].

Postoje i drugi biomarkeri čija se uloga ispituje u oboljenjima zglobova kao što su OA, RA i HA, a to su: C telopeptid kolagena I (CTX-I) u serumu i urinu koji odražava destrukciju koštanog tkiva kod oštećenja zgloba, zatim produkti razgradnje hrskavice - C1,2C („cleavage products“) koji nastaje degradacijom kolagena tip I i tip II, dok C2C potiče samo iz kolagena tip II. Međutim, njihov značaj kao biomarkera nije potvrđen kod HA [52]. Nasuprot tome, Jansen i sar. su pokazali da postoji pozitivna korelacija između koncentracije relativno novijeg biomarkera – hondroitin sulfata (CS) – 846 i radiološki dokazanog stepena oštećenja zgloba. CS – 846 je biomarker pojačane sinteze hondroitin sulfata, proteoglikana ekstraćelijskog matriksa hrskavice. Njegove povišene vrednosti mogu se naći u sinovijalnoj tečnosti i serumu [52].

Kao što smo videli, u dosadašnjoj literaturi pokazano je da CTX-II i COMP predstavljaju najznačajnije biomarkere oštećenja zgloba, odnosno zglobne hrskavice, kod bolesnika sa hemofilijom i reflektuju stepen ozbiljnosti destrukcije zgloba kod HA. Za sada nema publikovanih studija koje bi demonstrirale značaj praćenja ovih biomarkera u toku profilaktičke terapije bolesnika sa hemofilijom. S obzirom da je cilj profilaktičke terapije da smanji broj epizoda krvarenja u zglobove, za očekivati je da se smanji stepen destrukcije, odnosno oštećenja zglobne hrskavice.

CILJ RADA

HA je glavni uzročnik visokog morbiditeta bolesnika sa hemofilijom. Oko 80% svih epizoda krvarenja i preko 90% svih ozbiljnih epizoda krvarenja jesu upravo krvarenja u zglobove [45,51]. Ponavljane hemartroze dovode do progresivnog oštećenja zgloba usled degradacije zglobne hrskavice i proliferacije sinovije [45]. Standardna procedura procene stepena oštećenja zgloba jeste konvencionalna radiografija. Mada preciznije podatke možemo dobiti tehnikom magnetne rezonance (MR), ona se ređe koristi zbog teže dostupnosti ove imiging procedure [53]. S obzirom da u toku razvoja HA dolazi do procesa razgradnje hrskavice, u novijim literaturnim podacima sve se više pažnje poklanja biomarkerima njene degradacije. Ovi biomarkeri su dostupni u krvi i urinu što značajno olakšava njihovu dostupnost, odnosno uzimanje uzoraka za analizu. Najznačajniji biomarkeri degradacije zglobne hrskavice, koji su i najviše pručavani u HA, jesu: a) CTX-II, koji predstavlja degradacioni produkt kolagena hrskavice, oslobađa se kao solubilni molekul i može se odrediti u serumu i urinu i b) COMP, koji je deo nekolagene strukture ekstracelularnog matriksa hrskavice i njegove vrednosti se ispituju u serumu.

Cilj ovog istraživanja je da se kod bolesnika sa hemofilijom koji su na različitim režimima lečenja deficitarnim faktorom: sekundarna profilaksa punim dozama vs intermedijarne doze vs „on demand“, proceni:

1. Uticaj primene različitih režima terapije na korekciju rutinskih testova hemostaze – APTT.
2. Efikasnost primene različitih režima terapije na nivo deficitarnog faktora u krvi.
3. Efikasnost primene različitih režima terapije u korekciji koagulacionog statusa testovima: ETP (endogeni trombin potencijal) i ROTEM (rotaciona tromboelastometrija).
4. Efikasnost različitih režima terapije deficitarnim faktorom na promenu koncentracije biomarkera – COMP u serumu i CTX-II u urinu.
5. Korelacija između koncentracije biomarkera CTX-II i COMP i radiografskog Pettersson skora za procenu HA.

METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA

1. Izbor bolesnika

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je ukupno 20 bolesnika sa teškom hemofilijom, bez inhibitora, i to: 17 bolesnika sa hemofilijom A i 3 bolesnika sa hemofilijom B. Svi ispitanici su lečeni hospitalno na Klinici za hemtologiju Kliničkog Centra Srbije (KCS) ili ambulantno – Kabinet za hemofiliju, Klinika za hematologiju, KCS. Radiografija zglobova rađena je u Kabinetu za Radiologiju Klinike za Hematologiju, KCS. Testovi hemostaze: PV, APTT, nivo faktora VIII/IX i ETP, rađeni su u Centru za medicinsku biohemiju, Laboratorija Poliklinike KCS, Odeljenje Laboratorijske hematologije i hemostaze. ROTEM test rađen je u Odseku Transfuzione medicine Klinike za Vaskularnu hirurgiju, KCS.

Značaj svih ispitivanih parametara upoređivan je u odnosu na tri grupe bolesnika:

- a) Bolesnici na sekundarnoj profilaksi koncentratom faktora VIII u preporučenoj dozi 20 i.j./kg tri puta nedeljno. Takvih bolesnika u ovom istraživanju bilo je ukupno 5, svi sa hemofilijom A.
- b) Bolesnici na sekundarnoj profilaksi koncentratom faktora VIII u intermedijarnim dozama: 10-15 i.j./kg tri puta nedeljno. U ovom ispitivanju, ovih bolesnika bilo je ukupno 5, svi sa hemofilijom A.
- c) Bolesnici koji su primali koncentrat FVIII/IX samo u slučaju krvarenja po potrebi, odnosno „on demand“. Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 10 ovakvih bolesnika i to 7 sa hemofilijom A i 3 sa hemofilijom B.

Bolesnici na profilaktičkoj terapiji bili su sami sebi kontrola pre započinjanja terapije i nakon tri meseca primene profilakse.

Kontrolnu grupu za vrednosti testa ETP, vrednosti CTX-II u urinu i COMP u serumu činilo je 10 zdravih ispitanika.

2. Uzorkovanje

- a) Uzorci krvi za određivanje hemostaznih testova: PV, APTT, nivo FVIII/IX, ETP i ROTEM sakupljeni su u tri vremenska intervala kod bolesnika koji su na profilaksi: a) inicijalno, pre terapije; b) 20 min nakon primene prve doze koncentrata faktora i c) posle tri meseca redovne profilaktičke terapije a pre primene sledeće profilaktičke doze. Kod bolesnika koji su primali terapiju „on demand“, uzorci su uzimani inicijalno i nakon tri meseca praćenja. Krv je uzimana u količini od 10 ml na natrijum citratu kao antikoagulasu u odnosu 9:1.
- b) Uzorci krvi za određivanje koncentracije COMP uzimani su kod svih bolesnika inicijalno i nakon tri meseca. Krv je uzimana u suvoj epruveti, bez antikoagulansa, u količini od 10 ml i odmah po uzimanju uzorka u epruvetu je dodavan koncentrat FVIII/IX u količini od 8 i.j. da bi se obezbedila odgovarajuća koagulacija [52].
- c) Uzorci urina za određivanje koncentracije CTX-II svih bolesnika sakupljeni su uzimanjem jutarnjeg urina inicijalno i nakon tri meseca.
- d) Zdravim ispitanicima (kao kontrolnoj grupi) uzorak krvi za određivanje ETP i COMP, kao i uzorak jutarnjeg urina za određivanje CTX-II uziman je u jednom aktu.
- e) Radiografija zglobova kolena, laktova i skočnih zglobova svim bolesnicima u ovom istraživanju rađena je u jednom aktu, inicijalno na početku studije.

3. Metode ispitivanja

3.1. Testovi hemostaze

Testovi hemostaze: PV, APTT, nivo FVIII/IX i ETP, određivani su iz citratne plazme, dok je ROTEM test rađen iz pune krvi na citratnom antikoagulasu. Citratna plazma izdvojena nakon centrifugiranja u trajanju od 15 minuta na 1500 obrtaja u minuti, najpre je kratkotrajno (10

min) zamrzavana u tečnom azotu na -180C a potom čuvana u frižiderima na temperaturi od -80C do završetka uključivanja svih planiranih ispitanika u studiju.

3.1.1. Rutinski testovi hemostaze

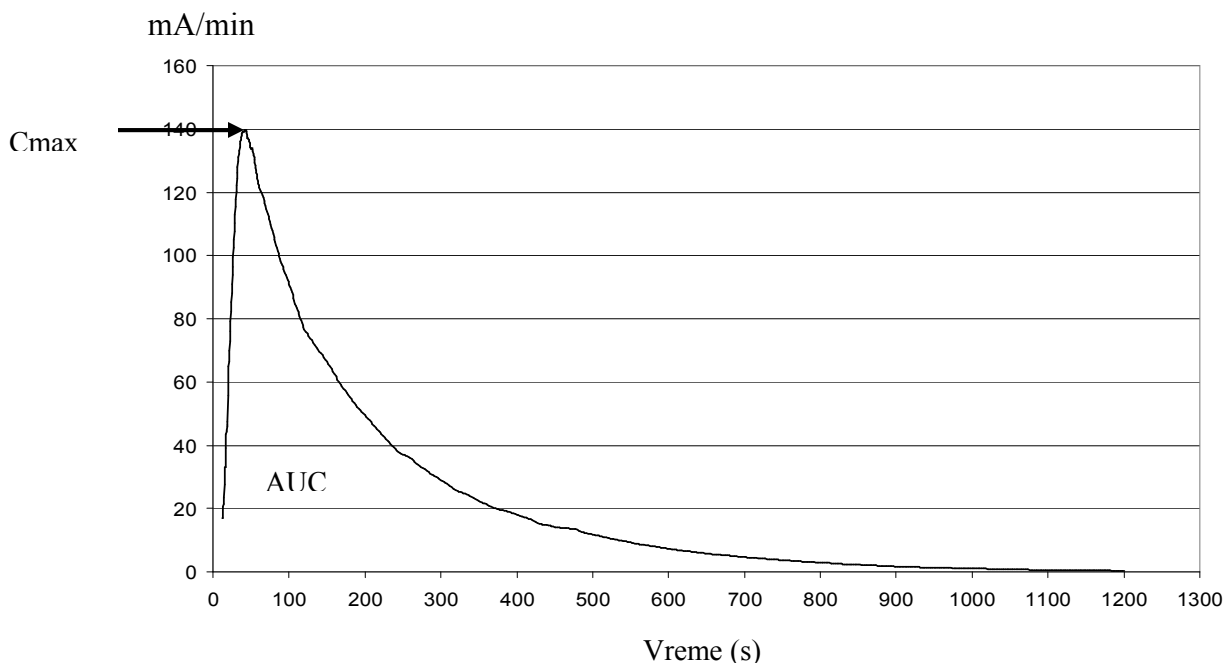
Rutinski testovi hemostaze: PV,APTT i nivo FVIII/IX, određivani su su na automatskom koagulometru Automated Coagulometer BCS XP Dade Behring. Kontrolne vrednosti za PV bile su 75-120% (izraženo u procentima u odnosu na normalnu plazmu) i za APTT iznosile su 25-35s. Nivo FVIII i FIX u plazmi izražavan je u procentima aktivnosti faktora normalne plazme. S obzirom da su ispitanici ove studije oboleli od hemofilije, vrednost faktora <1% su bolesnici sa teškom hemofilijom a vrednosti $\geq 1\%$ uzimane su kao uspešna konverzija teške u srednje tešku hemofiliju, što je i željeni efekat profilaktičke terapije koncentratom faktora.

3.1.2. Endogeni potencijal trombina (ETP)

Određivanje endogenog potencijala trombina (ETP-eng. endogenous thrombin potential) rađeno je nakon odmrzavanja sakupljene citratne plazme, takođe na automatskom koagulometru Automated Coagulometer BCS XP Dade Behring u koji je ugrađen softverski sistem - BCS® System/ BCS® XP System. Ovaj sistem u stvari predstavlja matematički algoritam za automatsku korekciju vrednosti ETP u odnosu na aktivnost α_2 -makroglobulina vezanog za trombin i ove vrednosti se obeležavaju sa ETP.cal (eng.- calculated). S obzirom da trombin igra glavnu ulogu u procesu hemostaze, određivanje njegovog formiranja, odnosno inhibicije formiranja trombina, značajno odražava koagulacioni status u uzorku. Dobijene vrednosti se izražavaju u % normalne plazme. Količina formiranog trombina se izražava kao ETP.AUC.cal (AUC – eng.- area under the curve) i predstavlja površinu ispod krive formiranja trombina, dok se vrednosti maksimalnog zgušavanja obeležavaju kao ETP.Cmax.cal (eng.- maximal clotting), što je prikazano na Grafikonu 1. Za aktivaciju formiranja trombina korišćen je tkivni faktor (Dade® Innovin® reagens) i kalcijum hlorid.

Kao kontrolne vrednosti korišćene su vrednosti ETP dobijene iz plazme 10 zdravih ispitanika.

Grafikon 1: Grafički prikaz vrednosti ETP.AUC.cal (količina formiranog trombina) i vrednosti ETP.Cmax.cal (maksimalnog zgrušavanja). mA/min (brzina formiranja izražena u miliamperima u minuti)

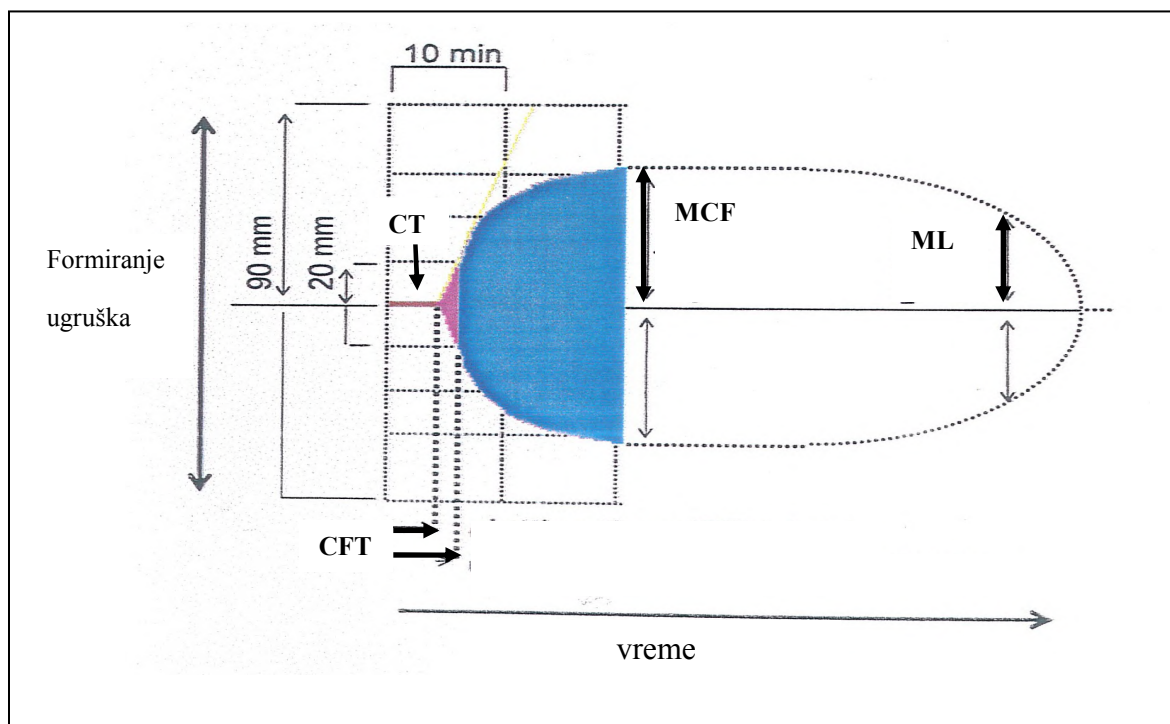


3.1.3. Rotaciona tromboelastometrija (ROTEM)

ROTEM je rađen iz pune citratne krvi 30-60 minuta nakon uzimanja uzorka na automatskom koagulometru (ROTEM Coagulation Analyzier, Pentapharm, Germany). Rotem test obezbeđuje grafički prikaz kompletnog procesa koagulacije, počevši od aktivacije koagulacije preko formiranja koaguluma pa sve do njegove lize. Glavni parametri koji se mere ROTEM testom su (Grafikon 2):

- CT (eng. – clotting time): vreme od početka merenja do započinjanja koagulacije; predstavlja poces inicijacije koagulacije, formiranje trombina i početak polimerizacije fibrina.
- CFT (eng.- clotting formation time): vreme od započinjanja koagulacije do formiranja ugruška; predstavlja proces polimerizacije fibrina i stabilizacije ugruška posredstvom trombocita i FXIII.
- MCF (eng.- maximum clott firmness): izražava maksimalnu čvrstinu formiranog ugruška; reprezentuje porast procesa stabilizacije ugruška putem polimerizacije fibrina, trombocita kao i FXIII.
- ML (eng. – maximum lysis): prikazuje razgradnju ugruška nakon MCF; reprezentuje proces fibrinolize.

Grafikon 2: Grafički prikaz parametra koji se određuju ROTEM testom: CT (clottin time), CFT (clotting formation time, MCF (maximum clot firmness), ML (maximum lysis)

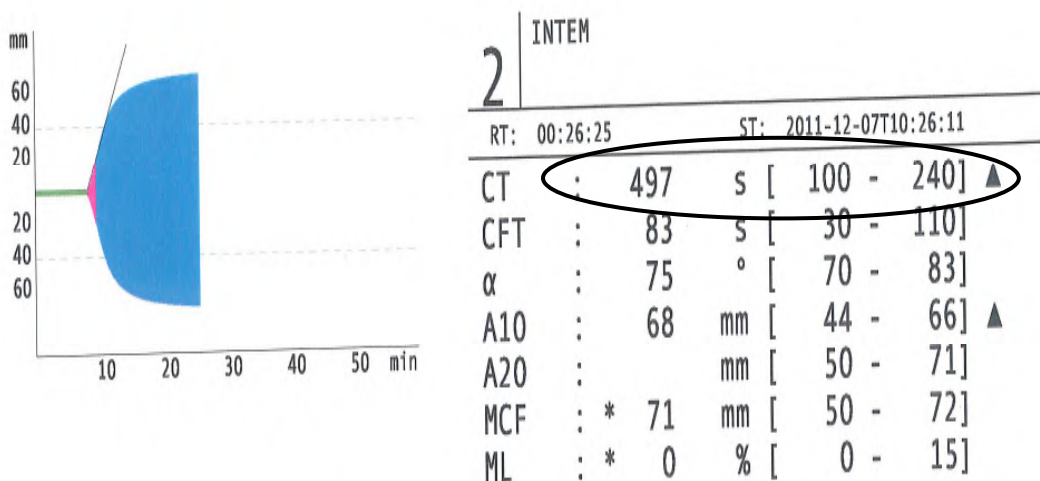


ROTEM testom se određuju standardne analize:

- EXTEM: koagulacija se aktivira malom količinom tkivnog faktora i meri se spoljašnji put koagulacije.
- INTEM: koagulacija se aktivira preko kontaktne faze i na taj način se ispituje unutrašnji put koagulacije i senzitivna je kod smanjenja ili nedostatka faktora VIII i IX
- FIBTEM: koagulacija se aktivira pomoću TF kao i kod EXTEM i reprezentuje količinu i funkciju fibrinogena.

S obzirom da je kod bolesnika sa hemofilijom osnovni uzrok poremećaja koagulacije u deficitu faktora unutrašnjeg puta – FVIII i FIX, kod naših ispitanika praćene su i upoređivane vrednosti INTEM testa. Kao što je već napomenuto, CT meri vreme potrebno za formiranje trombina (do započinjanja koagulacije koja se potom nastavlja polimerizacijom fibrina), tako da je, preciznije rečeno, ispitanicima ove studije određivan CT u INTEM testu i njegove vrednosti koje su kod ovih bolesnika produžene, praćene su i upoređivane u odnosu na različite režime lečenja. Normalne vrednosti CT u INTEM testu su 100-240 sekundi (s). Produžen CT u INTEM testu kod bolesnika sa hemofilijom prikazan je na Grafikonu 3.

Grafikon 3: Produžen CT u INTEM testu kod bolesnika sa hemofilijom



4. Biomarkeri oštećenja zgloba

Biomarkeri oštećenja zgloba određivani su nakon odmrzavanja seruma i urina sakupljenih uzoraka. U ovom istraživanju, određivana je koncentracija oligometričnog matriks proteina (COMP) u serumu i C-terminalnoog telopeptida kolagena tip II (CTX-II) u urinu.

- COMP je u serumu ispitanika određivan ELISA testom (Enzime Linked Immunoabsorben Assay) pomoću komercijalnog kita (AnaMar Medica, Sweden). Test se za sada koristi samo u istraživačke svrhe te vrednosti nisu standardizovane i upoređuju se u odnosu na kontrolnu grupu koju u ovom istraživanju čini 10 zdravih ispitanika. Izmerene vrednosti se izražavaju u jedinicama na litar (U/l). Međutim, postoje izvesne preporuke za COMP a to su: < 12 U/l – predstavlja mali rizik za agresivnu destrukciju zgloba, 12-15 U/l – povećan rizik agresivne destrukcije zgloba i >15 U/L – veoma visok rizik za agresivnu destrukciju zgloba.

- CTX-II određivan je ELISA testom pomoću komercijalnog kita (CartiLaps® EIA, Nordic Bioscience, Denmark) u urinu ispitanika. Dobijene vrednosti CTX-II korigovane su, po savetu proizvođača) u odnosu na vrednosti kreatinina po sledećoj formuli:

Korigovani CTX-II u urinu (ng/mmol) = 1000 x urin CartiLaps (µg/l) / kreatinin u urinu (mmol/l).

Dobijene vrednosti se izražavaju u ng/mmol. I ovaj test se za sada koristi samo u svrhe istraživanja, nema preporučenih standardizovanih vrednosti tako da su u našoj studiji vrednosti dobijene u zdravoj kontroli bile osnova za upoređivane vrednosti CTX-II izmerene kod bolesnika.

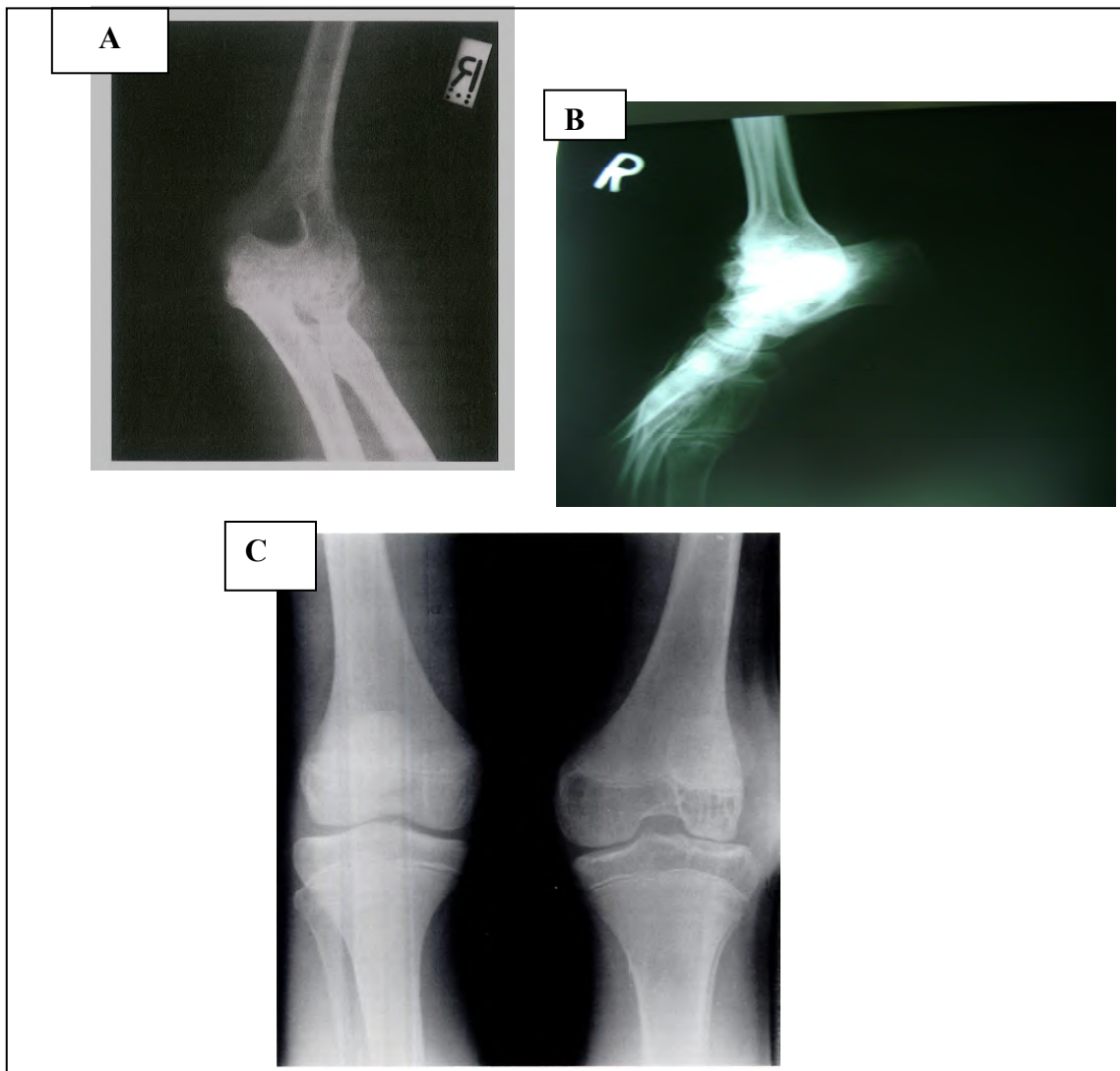
5. Radiografija zglobova

Svim bolesnicima rađena je inicijalno konvencionalna radiografija zglobova: oba kolena, oba lakatna i oba skočna zglobova iz dva pravca. Za bodovanje težine deformiteta zglobova korišćen je Pettersson skor, koji je usvojila Svetska Federacija za Hemofiliju. Pettersson skor boduje 8 karakteristika zglobova i to su: osteoporoza, uzdužena epifize, iregularna subhondralna površina, suženje zglobne površine, subhondralna cistična formacija, erozija zglobnih ivica, gruba neusklađenost ivica zglobne kosti, deformitet zglobova (ugaonost ili izmeštanje zglobnih kosti). Maksimalni broj poena po zglobovu je 13 a maksimalni ukupni Pettersson skor je 78 [53]. Bodovanje po pettersson skor prikazano je na Tabeli 4. Na Slici 5 (A,B,C) prikazani su snimci konvencionalne radiografije zglobova lakta, skočnog zglobova i kolena sa HA.

Tabela 4: Sistem bodovanja oštećenja zgloba u HA po Pettersson skoru

Parametar	Karakteristika	Broj poena
Osteoporoza	Odsustvo	0
	Prisustvo	1
Izdužena epifiza	Odsustvo	0
	Prisustvo	1
Iregularna subhondralna površina	Odsustvo	0
	Parcijalna zahvaćenost	1
	Totalna zahvaćenost	2
Suženje zglobne površine	Odsustvo	0
	Zglobna površina <1mm	1
	Zglobna površina >1mm	2
Subhondralna cistična formacija	Odsustvo	0
	1 cista	1
	> 1 ciste	2
Erozije zglobnih ivica	Odsustvo	0
	Prisustvo	1
Gruba neusklađenost ivica zglobne kosti	Odsustvo	0
	Blago	1
	Izraženo	2
Deformitet zgloba (ugaonost ili izmeštanje između zglobnih kosti)	Odsustvo	0
	Blago	1
	Izraženo	2

Slika 5: A - Radiografski prikaz levog lakta sa potpunim nedostatkom zglobnog prostora i subondrijalnim cistama. B – Radiografski prikaz potpuno uništenog desnog skočnog zgloba sa maksimalnim brojem Pettersson skora. C – Radiografski prikaz oba kolena gde vidimo da je desno koleno potpuno zdravo dok se na levom uočava iregularnost zglobne površine.



Statistička obrada

U radu su od metoda **deskriptivne statistike** primenjene:

- mere centralne tendencije: aritmetička sredina (\bar{x}) i medijana (Med)
- mere varijabiliteta. Interval varijacije (min-max) i standardna devijacija (SD)
- relativni brojevi

Od metoda **analitičke statistike** u radu su korišćene:

- Metode za identifikaciju empirijskih raspodela
- Metode za procenu značajnosti razlike i to:
 - Studentov t-test za nevezane uzorke
 - Studentov t-test za vezane uzorke
 - Hi-kvadrat test (χ^2 test)
 - Fisher-ov test tačne verovatnoće
- Metode za procenu **povezanosti razlike**:
 - Pearson-ov koeficijent linearne korelacije
 - Spearman-ov koeficijent korelacije ranga
- Metode za procenu **značajnosti razlike**:
 - multifaktorijalna analiza varijanse (ANOVA)

REZULTATI RADA

U vremenskom periodu od 2010. - 2012. godine na Klinici za hematologiju, KCS, ovim ispitivanjem obuhvaćeno je 20 bolesnika sa teškom hemofilijom i to: 17 bolesnika sa hemofilijom A i 3 bolesnika sa hemofilijom B. S obzirom da je ispitivanje obuhvatalo obolele od hemofilije – svi ispitanici su muškog pola. Kontrolnu grupu činilo je 10 zdravih ispitanika.

1. Deskriptivne karakteristike ispitivanih grupa u odnosu na godine starosti i režim lečenja

Prosečna starost svih 20 bolesnika obuhvaćenih ovom studijom bila je 31.63 godine, ranga od 19 do 55 godina, dok je prosečna starost zdravih ispitanika iznosila 33.70 godina, ranga 21 do 55 godina.

Bolesnici su podeljeni u tri grupe u odnosu na režim lečenja: 1) 5 bolesnika primalo je punu profilaktičku dozu koncentrata FVIII 20 i.j./kg tri x nedeljno; 2) 5 bolesnika primalo je intermedijarne doze koncentrata FVIII kao profilaksu i to 10-15 i.j./kg tri x nedeljno (prosečno 32 i.j./kg nedeljno); 3) 10 bolesnika primalo je koncentrat faktora VIII/IX samo u epizodama krvarenja („on demand“). Svi bolesnici na profilaksi su bolesnici sa hemofilijom A dok u grupi koja je primala terapiju „on demand“ 7 bolesnika ima hemofiliju A i 3 bolesnika hemofiliju B. Nije bilo značajne razlike u prosečnim godinama starosti kako između grupa bolesnika tako i između bolesnika i zdrave kontrole ($p=0.621$) što je značajno za homogenost ispitivanih i međusobno upoređivanih grupa. Distribucija bolesnika u odnosu na režim lečenja i godine starosti prikazana je na Tabeli 5 i Tabeli 6.

Tabela 5: Struktura ispitivanih bolesnika sa hemofilijom u odnosu na režim lečenja

Režim lečenja	Doze faktora	N	%
Pune doze profilakse	20 i.j./kg 3 x nedeljno	5	25
Intermedijarne doze profilakse	10-15 i.j. 3 x nedeljno	5	25
“On demand”	Th samo u slučaju krvarenja	10	50
Ukupno		20	100

Tabela 6: Distribucija starosti ispitivanih grupa

Grupe ispitanika	N	Godine starosti (x)	SD	min	max	p
Pune doze profilakse	5	34.80	11.584	23	53	
Intermedijarne doze profilakse	5	26.40	4.219	21	31	
„On demand“	10	33.80	14.635	19	55	
Zdrava kontrola	10	33.70	10.371	19	55	
Značajnost razlike u godinama između grupa						0.621

2. Testovi hemostaze

Svi bolesnici, kao što je bilo i očekivati, imali su vrednosti PV u opsegu normale. Test je rađen da bi se isključili drugi uzroci poremećaja koagulacije, sem urođenog deficita FVIII/IX.

2.1. Rutiniski testovi hemostaze

Od rutinskih testova hemostaze, sem PV, rađeni su APTT i nivo FVIII/IX, zbog njihove važnosti kod bolesnika sa hemofilijom, kako dijagnostičke tako i u praćenju efekta terapije.

Svi bolesnici imali su produžen APTT i to i u uzorcima krvi koji su uzeti inicijalno ali i u uzorcima koji su uzeti nakon tri meseca praćenja. Ovaj podatak se odnosi i na bolesnike koji su bili na punim, odnosno intermedijarnim dozama profilakse kao i na bolesnike koji su primali terapiju „on demand“. Prosečna vrednost APTT kod bolesnika iz sve tri grupe iznosila je 72.6s.

U grupi bolesnika koji su primali pune doze profilakse, vrednost APTT se značajno korigovala 20 minuta nakon primene faktora, 76.72s vs 41.2s ($p=0.003$), dok je prosečna vrednost APTT nakon tri meseca praćenja bila 60.22s, što nije statistički značajna razlika.

Bolesnici koji su primali intermedijarne doze profilakse imali su takođe značajno smanjenje prosečne inicijalne vrednosti APTT u odnosu na vrednosti izmerene 20 minuta nakon davanja faktora, 70.98s vs 49.46s ($p=0.038$), a prosečne vrednosti APTT nakon 3 meseca praćenja, 62.20s, što nije statistički značajna razlika u odnosu na inicijalne vrednosti nisu se značajno razlikovale od vrednosti bolesnika na punim profilaktičkim dozama.

Očekivano, prosečne vrednosti APTT u grupi bolesnika na „on demand“ terapiji nisu se razlikovale u uzorcima uzetim inicijalno i nakon tri meseca praćenja (75.60s vs 72.30s).

Nije bilo značajne razlike u srednjim vrednostima APTT između bolesnika na punim i intermedijarnim dozama profilakse nakon tri meseca praćenja, ali ni između ovih grupa bolesnika i grupe koja je primala terapiju „on demand“.

Značajnost promene srednjih vrednosti APTT u odnosu na period praćenja od 3 meseca i tip terapije prikazan je na Tabeli 8.

Tabela 8: Značajnost promene u vrednostima APTT u odnosu na period praćenja i tip terapije kod bolesnika sa hemofilijom

Grupe ispitanika	APTT (s)		p
	Pre Th (x)	3 meseca praćenja (x)	
Pune doze profilakse	76.72	60.22	0.142
Intermedijarne doze profilakse	70.98	62.20	0.580
„On demand“	75.50	72.30	0.624
Značajnost promene APTT između grupa: Puna vs Intermedijarna doza profilakse			0.540
Značajnost promene APTT između grupa: Puna doza profilakse vs „on demand“			0.142
Značajnost promene APTT između grupa: Intermedijarna doza profilakse vs „on demand“			0.244

Nivo FVIII/IX kod svih bolesnika inicijalno je iznosio < 1% s obzirom da su ovim ispitivanjem obuhvaćeni samo bolesnici sa teškom hemofilijom. Kod bolesnika koji su primali profilaktičku terapiju, pune i intermedijarne doze, nivo FVIII/IX se korigovao > 1% u uzorcima krvi uzetim 20 minuta nakon aplikovanja koncentrata faktora.

U grupi bolesnika koja je primala pune doze profilakse, nakon tri meseca 80% (4) ovih ispitanika imalo je željeni opseg faktora - > 1%, dok je u grupi koja je primala intermedijarne

doze profilakse kod 40% bolesnika (2) je postignut nivo faktora >1%, što je bila statistički značajna razlika, $p=0.024$ (Grafikon 3). Pokazano je da postoji značajna razlika u zastupljenosti vrednosti faktora > 1% ne samo između bolesnika koji su primali pune doze profilakse i bolesnika na „on demand“ terapiji, $p=0.012$ već i između bolesnika na intermedijarnim dozama profilakse i bolesnika na „on demand“ terapiji (kod kojih nijedan bolesnik nakon 3 meseca nije imao vrednosti faktora > 1%, $p=0.042$). Na Tabeli 9 prikazana je značajnost promene nivoa FVIII/IX u odnosu na period praćenja od tri meseca i tip terapije.

Grafikon 3: Značajnost razlike u zastupljenosti bolesnika sa hemofilijom koji su postigli željeni nivo FVIII (>1%) između grupa koje su primale punu dozu (20 i.j./kg) i intermedijarnu dozu (10-15 i.j./kg) profilaktičke terapije

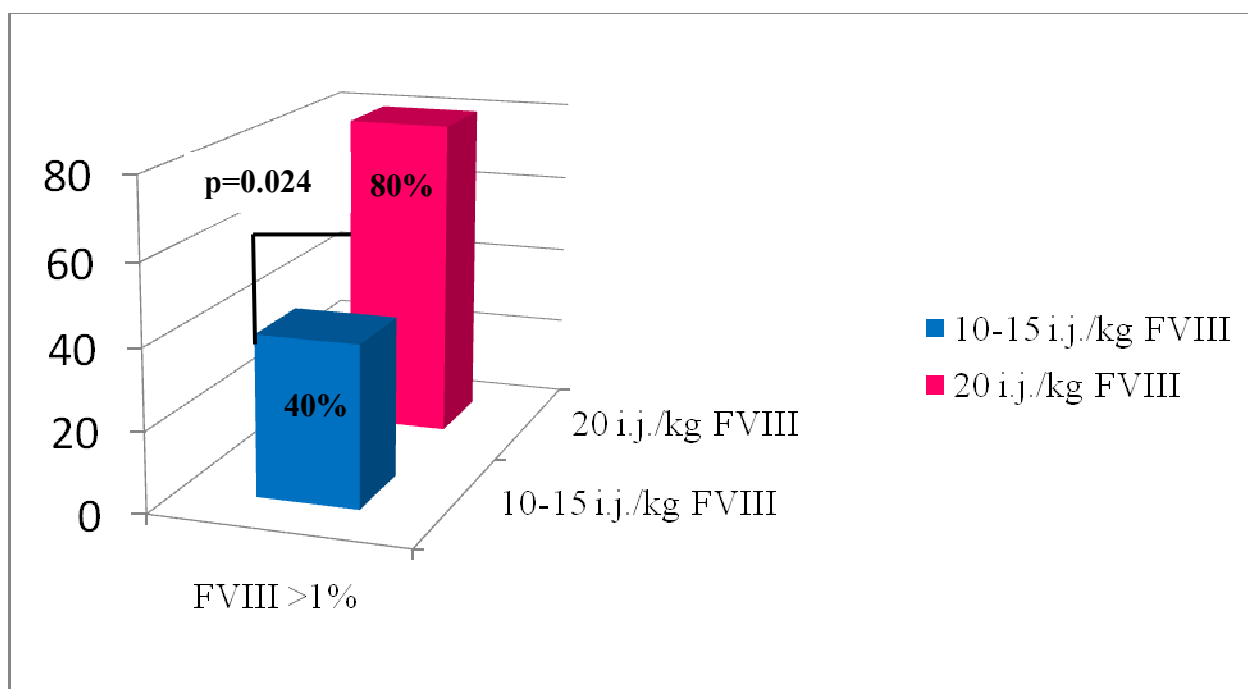


Tabela 9: Značajnost promene nivoa FVIII/IX >1% u odnosu na period praćenja i tip terapije kod bolesnika sa hemofilijom

Grupe ispitanika	Nivo FVIII/IX > 1%		p
	% ispitanika pre Th	% ispitanika posle 3 meseca praćenja	
Pune doze profilakse	0	80	
Intermedijarne doze profilakse	0	40	
„On demand“	0	0	
Značajnost promene nivoa FVIII/IX >1%: Puna vs Intermedijarna doza profilakse			0.024
Značajnost promene nivoa FVIII/IX >1%: Puna doza profilakse vs „on demand“			0.012
Značajnost promene nivoa FVIII/IX >1%: Intermedijarna doza profilakse vs „on demand“			0.046

2.2. Test za određivanje potencijala endogenog trombina (ETP)

U ovoj studiji bolesnicima je određivan test potencijala endogenog trombina (ETP) inicijalno, 20 minuta nakon prve aplikacije koncentrata faktora (kod bolesnika na profilaksi) i nakon tri meseca profilakse, odnosno praćenja. Merene su vrednosti količine stvorenog trombina (ETP.AUC.cal) i vrednosti maksimalnog zgrušavanja (ETP.Cmax.cal), izražene u procentima u odnosu na vrednosti normalne plazme.

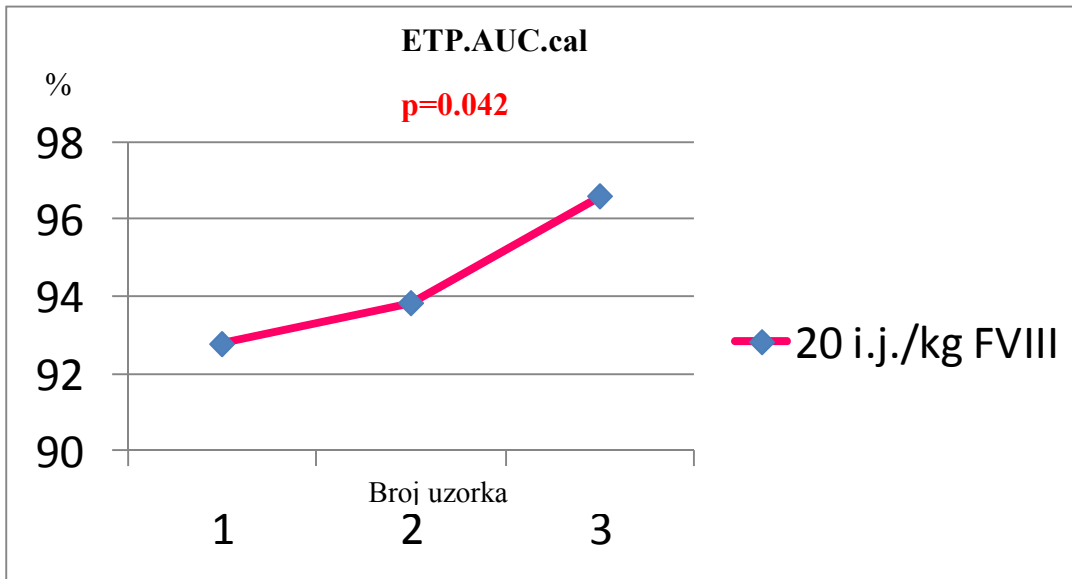
U grupi bolesnika koji su primali pune doze profilaktičke terapije, srednja vrednost ETP.AUC.cal izmerena inicijalno, pre započinjanja terapije, iznosila je 92.7700, srednja vrednost

ETP.AUC.cal izmerena 20 minuta nakon aplikovanja prve doze terapije iznosila je 93.8300, dok je srednja vrednost ETP.AUC.cal izmerena 3 meseca nakon redovne profilakse u punim dozama koncentrata faktora iznosila 96.5900. Dokazana je značajna statistička razlika između srednjih vrednosti ETP.AUC.cal izmerenih inicijalno i nakon tri meseca profilakse punim dozama koncentrata faktora, **p=0.042**. Naime, vrednosti ETP.AUC.cal nakon tri meseca redovne profilakse u punim dozama bile su značajno veće u odnosu na inicijalne vrednosti, odnosno količina stvorenog trombina bila je značajno veća nakon tri meseca profilakse punim dozama koncentrata faktora (Tabela 10, Grafikon 4).

Tabela 10: Značajnost razlike srednjih vrednosti ETP.AUC.cal pre terapije i posle tri meseca profilakse punim dozama koncentrata faktora kod bolesnika sa hemofilijom

Vreme uzimanja uzorka kod bolesnika na profilaksi punim dozama faktora	ETP. AUC.cal (%)	SD	p
Pre Th	92.7700	35.45620	
20 minuta nakon prve i.v. aplikacije faktora	93.8300	31.50118	
Posle 3 meseca profilakse	96.5900	35.3396	
Značajnost razlike ETP.AUC.cal Pre Th i posle 3 meseca Th			0.042

Grafikon 4: Grafički prikaz značajnosti razlike srednjih vrednosti ETP.AUC.cal pre i posle 3 meseca profilakse punim dozama faktora – 20 i.j./kg 3 x nedeljno kod bolesnika sa hemofilijom

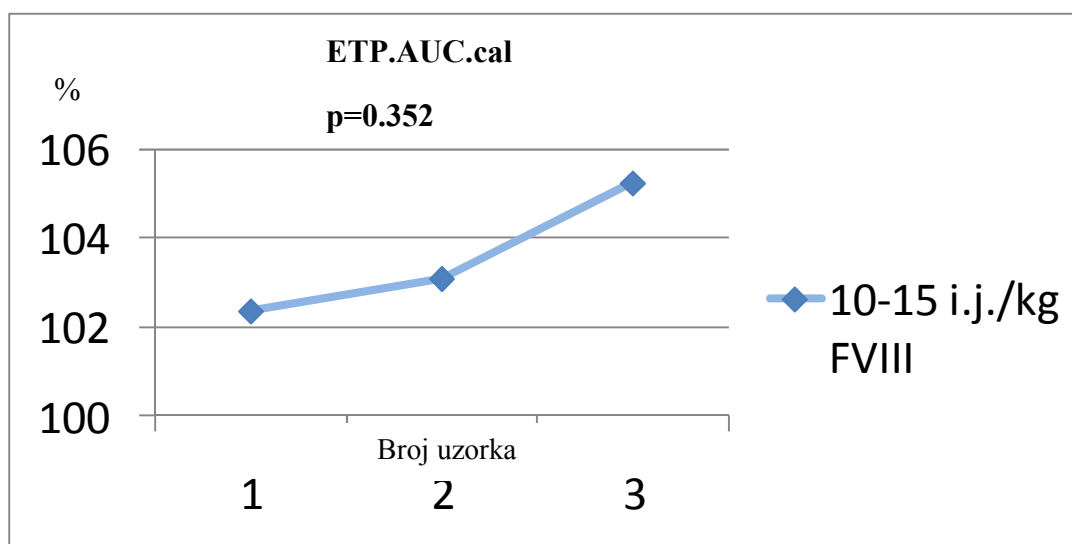


Kod bolesnika koji su primali intermedijarne doze koncentrata faktora, srednja vrednost ETP.AUC.cal pre terapije bila je 102.3600, 20 minuta nakon aplikacije faktora srednja vrednost ETP.AUC.cal je iznosila 103.0900, a srednja vrednost ETP.AUC.cal posle tri meseca profilakse intermedijarnim dozama iznosila je 105.2400. Međutim, u ovoj grupi bolesnika, nije bilo statistički značajne razlike u srednjim vrednostima ETP.AUC.cal pre i nakon tri meseca profilakričke terapije intermedijarnim dozama faktora, $p=0.352$. Količina stvorenog trombina nije bila značajno veća nakon tri meseca profilakse faktorom u dozi od 10-15 i.j./kg tri x nedeljno u odnosu na inicijalne vrednosti (Tabela 11, Grafikon 5).

Tabela 11: Značajnost razlike srednjih vrednosti ETP.AUC.cal pre terapije i posle tri meseca profilakse intermedijarnim dozama koncentrata faktora kod bolesnika sa hemofilijom

Vreme uzimanja uzorka kod bolesnika na profilaksi intermedijarnim dozama faktora	ETP. AUC.cal (%)	SD	p
Pre Th	102.3600	12.26394	
20 minuta nakon prve i.v. aplikacije faktora	103.0900	13.20783	
Posle 3 meseca profilakse	105.2400	12.59436	
Značajnost razlike ETP.AUC.cal Pre Th i posle 3 meseca Th			0.352

Grafikon 5: Grafički prikaz značajnosti razlike srednjih vrednosti ETP.AUC.cal pre i posle 3 meseca profilakse intermedijarnim dozama faktora – 10-15 i.j./kg 3 x nedeljno kod bolesnika sa hemofilijom



U grupu bolesnika na “on demand” terapiji, takođe nije bilo značajne razlike u srednjim vrednostima ETP.AUC.cal, inicijalnim i nakon 3 meseca praćenja (91.635 vs 93.7250, p=0.561) što je i bio očekivani rezultat (Tabela 12).

Tabela 12: Značajnost razlike srednjih vrednosti ETP.AUC.cal inicijalno i posle tri meseca praćenja bolesnika sa hemofilijomna „on demand“ terapiji

Vreme uzimanja uzorka kod bolesnika na „on demand“ terapiji	ETP. AUC.cal (%)	SD	p
Inicijalno	91.635	21.2198	
Posle 3 meseca praćenja	93.7250	16.03342	
Značajnost razlike ETP.AUC.cal inicijalno i posle 3 meseca praćenja			0.561

Za razliku od ETP.AUC.cal, srednje vrednosti ETP.Cmax.cal (izražene u % vrednosti normalne plazme), odnosno vrednosti maksimalne koagulacije, nisu se međusobno značajno razlikovale ni u jednoj grupi bolesnika u odnosu na vreme kada su uzeti uzorci plazme.

Kod bolesnika koji su bili na punim dozama profilaktičke terapije, srednje vrednosti ETP.Cmax.cal pre terapije iznosile su: inicijalno – 91.7800, nakon 20 minuta od aplikovanja koncentrata faktora – 94.4400 i posle tri meseca profilakse – 98.7500. Nije bilo statistički nznačajne razlike između inicijalne vrednosti i vrednosti ETP.Cmax.cal nakon 3 meseca profilaktičke terapije punim dozama koncentrata faktora, p=0.123 (Tabela 13).

Tabela 13: Značajnost razlike srednjih vrednosti ETP.Cmax.cal pre terapije i posle tri meseca profilakse punim dozama koncentrata faktora kod bolesnika sa hemofilijom

Vreme uzimanja uzorka kod bolesnika na profilaksi punim dozama faktora	ETP.Cmax.cal (%)	SD	p
Pre Th	91.7800	23.75822	
20 minuta nakon prve i.v. aplikacije faktora	94.4400	18.54068	
Posle 3 meseca profilakse	98.7500	19.36543	
Značajnost razlike Pre Th i posle 3 meseca Th			0.123

U grupi bolesnika koji su primali intermedijarne doze koncentrata faktora, srednje vrednosti ETP.Cmax.cal iznosile su: inicijalno – 99.1700, 20 minuta nakon i.v. davanja faktora – 100.8400 i posle 3 meseca profilakse intermedijarnim dozama koncentrata faktora - 101.6300. Nije bilo statistički značajne razlike u ovoj grupi bolesnika između srednjih vrednosti ETP.Cmax.cal u uzorcima plazme koji su uzeti inicijalno i posle tri meseca profilakse, $p=0.305$ (Tabela 14).

Tabela 14: Značajnost razlike srednjih vrednosti ETP.Cmax.cal pre terapije i posle tri meseca profilakse intermedijarnim dozama koncentrata faktora kod bolesnika sa hemofilijom

Vreme uzimanja uzorka kod bolesnika na profilaksi intermedijarnim dozama faktora	ETP. Cmax.cal (%)	SD	p
Pre Th	99.1700	8.7633	
20 minuta nakon prve i.v. aplikacije faktora	100.8400	10.31500	
Posle 3 meseca profilakse	101.6300	8.17944	
Značajnost razlike ETP.Cmax.cal Pre Th i posle 3 meseca Th			0.305

Razlika srednjih vrednosti ETP.Cmax.cal kod bolesnika na „on demand“ terapiji nije bila statistički značajna u uzorcima plazme koji su uzeti inicijalno - 92.1450 i posle tri meseca praćenja - 92.6050, $p=0.916$ (Tabela 15).

Tabela 15: Značajnost razlike srednjih vrednosti ETP.Cmax.cal inicijalno i posle tri meseca praćenja bolesnika sa hemofilijom na „on demand“ terapiji

Vreme uzimanja uzorka kod bolesnika na „on demand“ terapiji	ETP. Cmax.cal (%)	SD	p
Inicijalno	92.1450	20.76226	
Posle 3 meseca praćenja	92.6050	13.12450	
Značajnost razlike ETP.Cmax.cal inicijalno i posle 3 meseca praćenja			0.916

U ovom istraživanju, rezultati testova ETP dokazali su značajno povećanje ETP.AUC.cal (povećanje količine stvorenog trombina) kod bolesnika sa hemofilijom A nakon tri meseca redovne primene profilaktičke terapije koncentratom faktora VIII u dozi od 20 i.j./kg tri x nedeljno.

2.3. Testovi rotacione tromboelastometrije (ROTEM)

Svim bolesnicima u ovom istraživanju određivani su testovi rotacione tromboelastometrije (ROTEM): inicijalno, 20 minuta nakon davanja prve doze koncentrata faktora (kod bolesnika na profilaksi) i tri meseca nakon profilakse, odnosno praćenja. U svakom uzorku plazme određivan je FIBTEM, EXTEM i INTEM, a za svaki od ovih testova mereni su: CT, CFT, MCF i ML. Testovi FIBTEM i EXTEM bili su u granicama normale kod svih ispitanika, što je bio očekivani rezultat. S obzirom da grupu ispitanika čine bolesnici sa hemofilijom, odnosno deficitom faktora unutrašnjeg puta koagulacije – FVIII ili FIX, od posebnog značaja imale su vrednosti INTEM testa, tačnije vrednost CT u INTEM testu kojim se meri vreme potrebno za stvaranje trombina i započinjanja koagulacije procesom polimerizacije

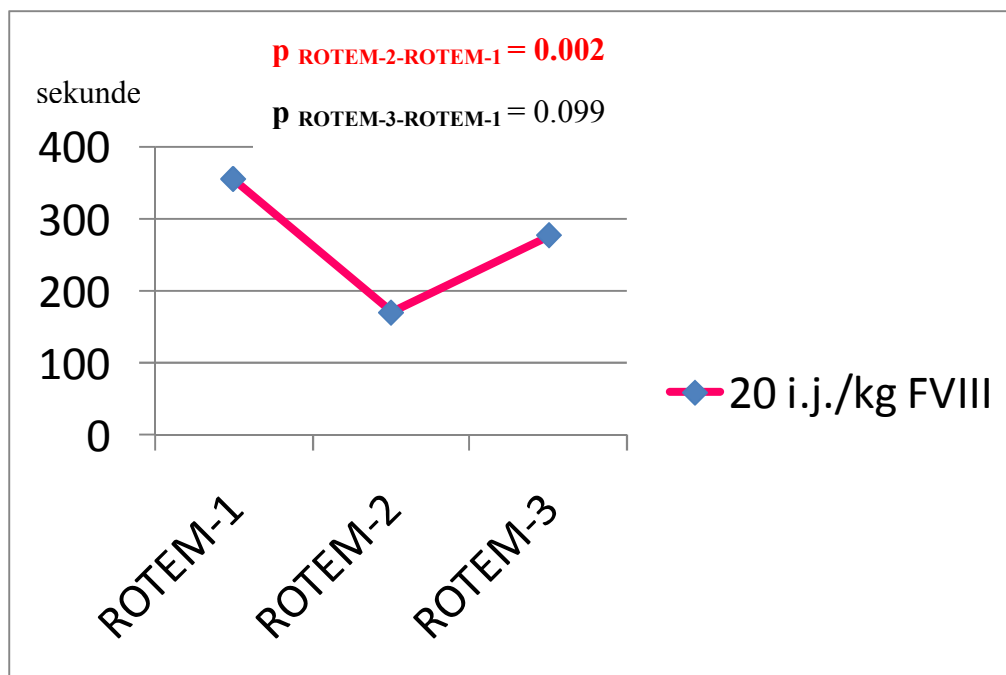
fibrina. Zbog pojednostavljivanja preglednosti podataka, CT u INTEM testu metodom ROTEM, izražen u sekundama (s) obeleženi su sa: ROTEM-1 – uzorci krvi uzeti inicijalno, ROTEM-2 – uzorci krvi uzeti 20 minuta nakon prve i.v.aplikacije koncentrata faktora kod bolesnika na profilaktičkoj terapiji i ROTEM-3 – uzorci krvi uzeti 3 meseca nakon primene profilaktičke terapije, odnosno nakon praćenja kod bolesnika na „on demand“ terapiji.

U grupi bolesnika koji su primali pune doze profilaktičke terapije, srednja vrednosti ROTEM-1 iznosila je 355.20s, srednja vrednost ROTEM-2 – 170.60s i izmerena srednja vrednost ROTEM-3 bila je 277.60s. Razlika srednjih vrednosti ROTEM-2 i ROTEM-1 bila je statistički značajna, $p=0.002$, ali razlika srednjih vrednosti ROTEM-3 i ROTEM-1 nije bila statistički značajna, $p=0.099$ (Tabela 16, Gafikon 6). Dokazana je statistički značajno skraćen ROTEM-2 (20 minuta nakon aplikovanja faktora) u odnosu na vrednosti ROTEM-1 (vrednosti pre aplikovanja faktora), ali nije dokazana statistička značajnost u vrednostima ROTEM-3 (tri meseca posle profilakse punim dozama faktora) i ROTEM-1.

Tabela 16: Značajnost razlike srednjih vrednosti ROTEM pre terapije i posle tri meseca profilakse punim dozama koncentrata faktora kod bolesnika sa hemofilijom

ROTEM	Srednje vrednosti ROTEM (s)	SD	p
ROTEM-1	355.20	61.235	
ROTEM-2	170.60	13.483	
ROTEM-3	277.60	71.444	
Značajnost razlike ROTEM-2 i ROTEM-1			0.002
Značajnost razlike ROTEM-3 i ROTEM-1			0.099

Grafikon 6: Grafički prikaz razlike srednjih vrednosti ROTEM-1, 2 i 3 kod bolesnika sa hemofilijom na profilaksi punim dozama faktora – 20 i.j./kg 3 x nedeljno

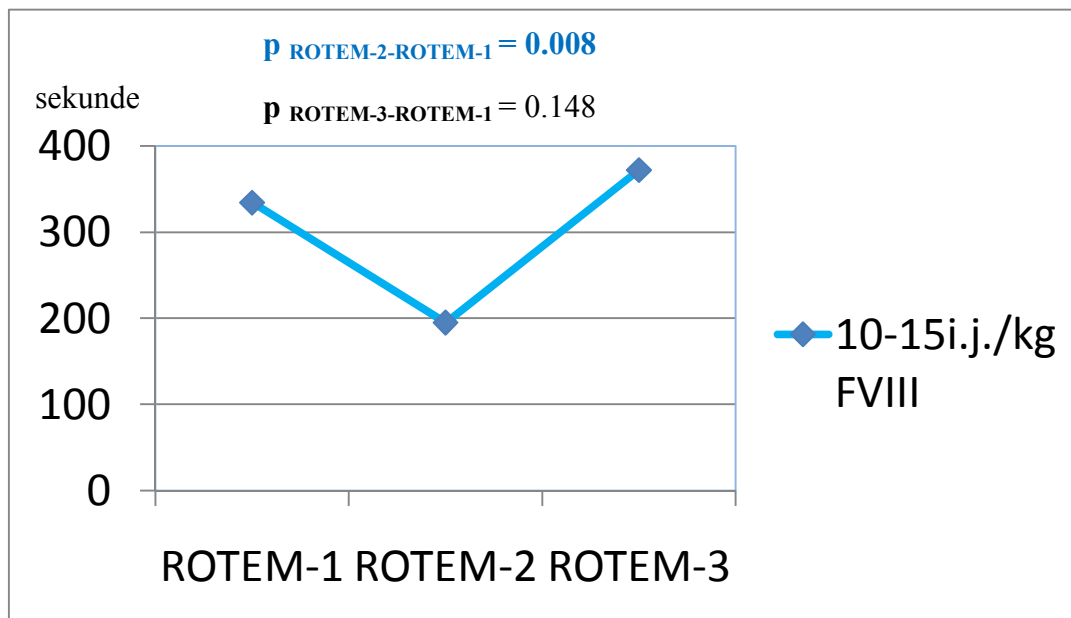


U grupi bolesnika koji su primali intermedijarne doze profilatičke terapije koncentratom faktora, srednje vrednosti ROTEM su bile sledeće: ROTEM-1 – 334.40, ROTEM-2 – 195.20 I ROTEM-3 – 372.20. Razlika srednjih vrednosti ROTEM-2 i ROTEM-1 takođe je bila statistički značajna, $p=0.008$, dok razlika srednjih vrednosti ROTEM-3 i ROTEM-1 nije imala statističku značajnost, $p=0.148$. ROTEM se značajno skraćivao 20 minuta nakon aplikovanja faktora, ali nakon tri meseca profilakse intermedijarnim dozama značajnost razlike ROTEM u odnosu na inicijalne vrednosti nije bila statistički značajna (Tabela 17, Grafikon 7).

Tabela 17: Značajnost razlike srednjih vrednosti ROTEM pre terapije i posle tri meseca profilakse intermedijarnim dozama koncentrata faktora kod bolesnika sa hemofilijom

ROTEM	Srednje vrednosti ROTEM (s)	SD	p
ROTEM-1	334.40	60.855	
ROTEM-2	195.20	23.910	
ROTEM-3	372.20	76.588	
Značajnost razlike ROTEM-2 i ROTEM-1			0.008
Značajnost razlike ROTEM-3 i ROTEM-1			0.148

Grafikon 7: Grafički prikaz razlike srednjih vrednosti ROTEM-1, 2 i 3 kod bolesnika sa hemofilijom na profilaksi intermedijarnim dozama faktora – 10-15 i.j./kg 3 x nedeljno

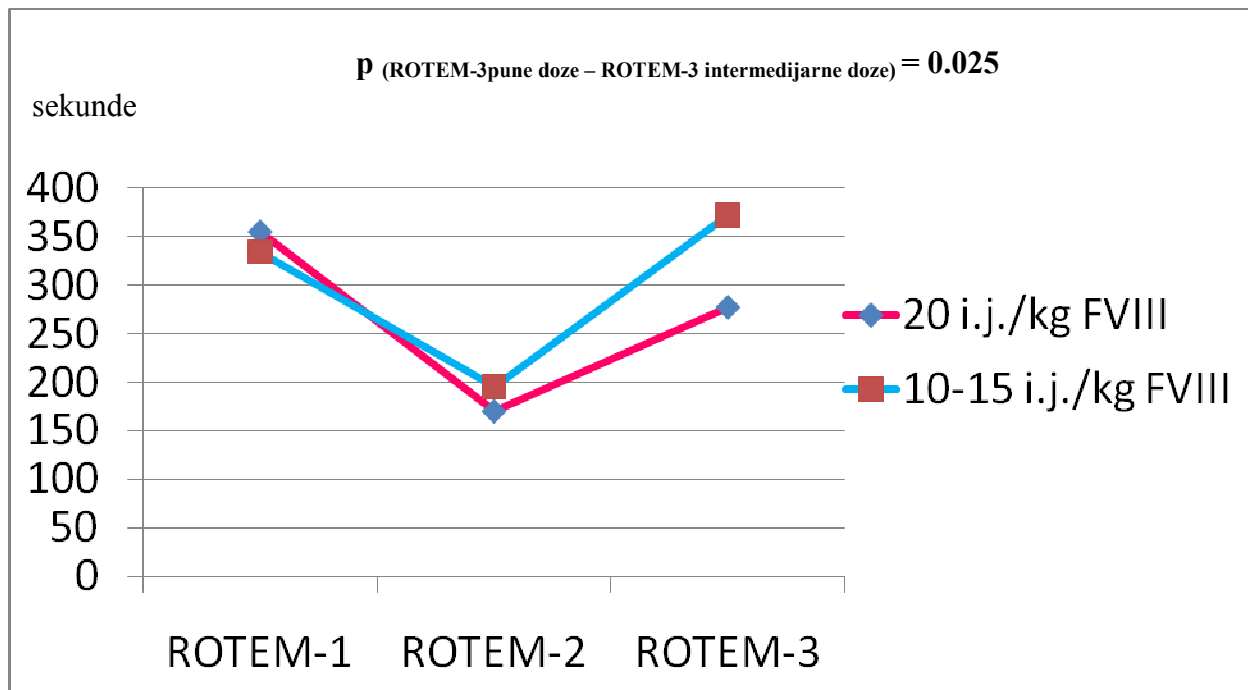


Međutim, dokazana je statistički značajna razlika u srednjim vrednostima ROTEM-3 (277.60 vs 372.20) između bolesnika na punoj i intermedijarnoj dozi profilakse, odnosno bolesnici koji su primali pune doze profilaktičke terapije koncentratom faktora imali su značajno manje vrednosti ROTEM nakon tri meseca terapije u odnosu na bolesnike koji su primali intermedijarne doze profilakse, **p=0.025** (Tabela 18, Grafikon 8).

Tabela 18: Značajnost razlike srednjih vrednosti ROTEM-3 između bolesnika sa hemofilijom koji su primali pune doze i bolesnika koji su primali intermedijarne doze profilaktičke terapije koncentratom faktora

ROTEM	Srednje vrednosti ROTEM (s)	SD	p
ROTEM-3 Bolesnici na punoj dozi profilakse faktorom	277.60	71.444	
ROTEM-3 Bolesnici na intermedijarnoj dozi profilakse faktorom	372.20	76.588	
Značajnost razlike srednje vrednosti ROTEM-3 bolesnika na punoj dozi i intermedijarnoj dozi profilakse faktorom			0.025

Grafikon 8: Grafički prikaz razlike srednjih vrednosti ROTEM-3 između bolesnika sa hemofilijom na profilaksi punim dozama – 20 i.j./kg i intermedijarnim dozama faktora – 10-15 i.j./kg 3 x nedeljno



Kod bolesnika lečenih samo “on demand”, srednja vrednost ROTEM-1 iznosila je 291.40 dok je srednja vrednost ROTEM-3 bila 307.40, odnosno između ovih vrednosti nije bilo statistički značajne razlike, $p=0.252$ (Tabela 19)

Tabela 19: Značajnost razlike srednjih vrednosti ROTEM-3 i ROTEM-1 kod bolesnika sa hemofilijom na „on demand“ terapiji

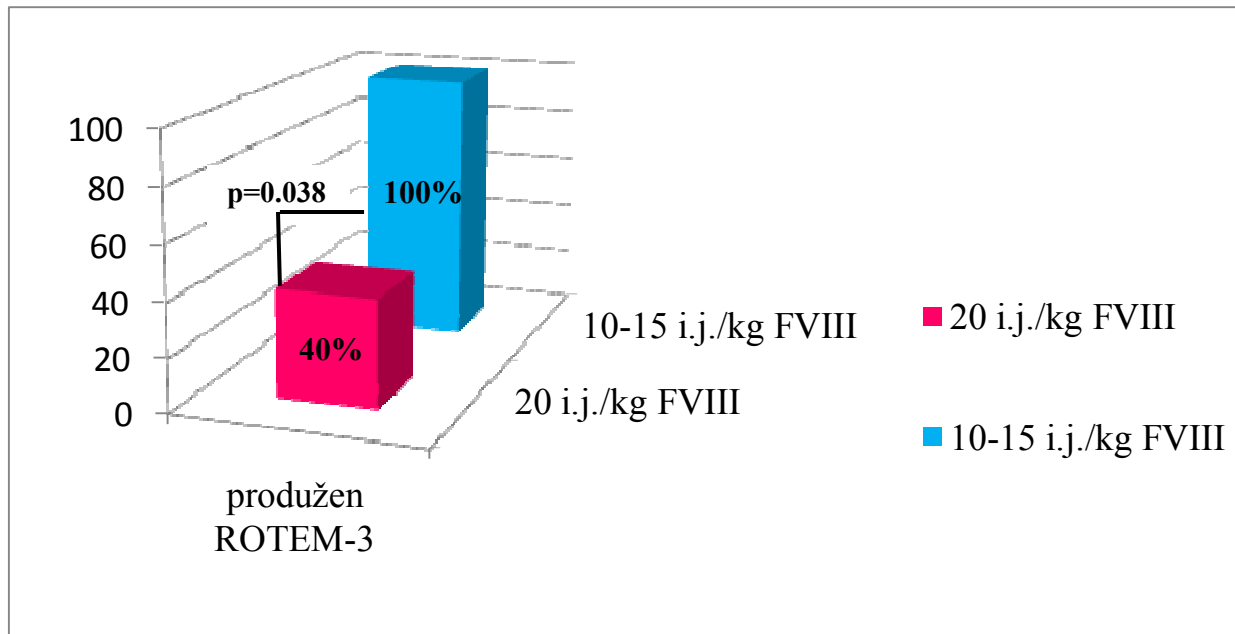
ROTEM	Srednje vrednosti ROTEM (s)	SD	p
ROTEM-3	307.40	59.186	
ROTEM-1	291.40	67.902	
Značajnost razlike ROTEM-3 – ROTEM-1 bolesnika na „on demand“ terapiji			0.252

U grupi bolesnika koji su primali punu dozu profilakse, nakon tri meseca terapije produžen ROTEM-3 imala su dva bolesnika, odnosno 40%, dok je u grupi koja je primala intermedijarne doze profilakse kao i u grupi na „on demand“ terapiji, ROTEM-3 bio produžen kod svih bolesnika iz date grupe, odnosno 100%. Zastupljenost bolesnika sa produženim ROTEM-3 je bila statistički značajno veća u grupi bolesnika koja je primala intermedijarne doze profilaktičke terapije u odnosu na grupu bolesnika koja je primala pune doze profilaktičke terapije koncentratom faktora, **p=0.038** (Tabela 20, Grafikon 9). Rezultati takođe pokazuju da su bolesnici na „on demand“ terapiji imali porast vrednosti COMP-2 što jasno ukazuje na značaj profilakse u očuvanju zglobova.

Tabela 20: Značajnost razlike u zastupljenosti produženih vrednosti ROTEM-3 između bolesnika sa hemofilijom na punim i intermedijarnim dozama profilakse

ROTEM	Puna doza profilakse	Intermedijarna doza profilakse	P
Produžen ROTEM-3 (%)	40	100	
Normalan ROTEM-3 (%)	60	0	
Značajnost razlike produženih vrednosti ROTEM-3 između bolesnika na intermedijarnim i punim dozama profilakse			0.038

Grafikon 9: Grafički prikaz zastupljenosti produženog ROTEM-3 (posle tri meseca profilakse) između bolesnika sa hemofilijom na punim i intermedijarnim dozama profilaktičke terapije



U ovoj studiji, ROTEM testovi su pokazali da postoji značajna razlika između vrednosti ROTEM-2 i ROTEM-1 u obe grupe bolesnika koji su na profilaktičkoj terapiji, bilo punim ili intermedijarnim dozama koncentrata faktora. Vrednosti ROTEM-3 su značajno niže u grupi bolesnika koja prima pune doze profilakse u odnosu na vrednosti ROTEM-3 kod bolesnika na intermedijarnim dozama profilakse, a takođe je i zastupljenost bolesnika sa produženim vrednostima ROTEM-3 značajno manja u grupi bolesnika koja prima pune doze profilaktičke terapije u odnosu na grupu bolesnika koja je na intermedijarnim dozama profilakse.

3. Biomarkeri razgradnje zglobne hrskavice

U ovom istraživanju ispitivan je značaj biomarkera koji nastaju procesom razgradnje zglobne hrskavice prilikom procesa oštećenja zgloba usled evidentnih ili okultnih krvarenja kod bolesnika sa hemofilijom. Procenjivan je značaj sledećih markera oštećenja zgloba, kao

degradacionih produkata zglobne hrskavice: COMP u serumu i CTX-II u urinu bolesnika sa hemofilijom. Upoređivane su koncentracije ovih biomarkera u odnosu na različite režime lečenja kao i u odnosu na visinu Pettersson skora, kojim se stepen destrukcije zgloba procenjuje metodom konvencionalne radiografije.

3.1. Oligometrični matriks protein hrskavice (COMP)

Razgradnjom zglobne hrskavice u serum se oslobađa njen degradacioni produkt iz ekstracelularnog matriksa – oligometrični matriks protein – COMP. Bolesnicima sa hemofilijom koji su obuhvaćeni istraživanjem u ovoj studiji, koncentracija COMP u serumu je određivana inicijalno i posle tri meseca profilaktičke terapije punim ili intermedijarnim dozama koncentrata faktora, odnosno nakon tri meseca praćenja kod bolesnika na “on demand” terapiji. Radi bolje preglednosti iznetih podataka, inicijalni nivo COMP obeležen je sa COMP-1 dok je COMP koji je određivan nakon tri meseca označen kao COMP-2. Vrednosti izmerene koncentracije COMP u serumu izražene su u U/l.

U grupi bolesnika koji su primali pune doze profilakse koncentratom faktora, srednja vrednost koncentracija COMP-2 je bila značajno niža u odnosu na COMP-1, 12.4 vs 16.5, **p=0.043**. Značajnost promene srednje vrednosti COMP-2 u odnosu na COMP-1 nije utvrđena u grupi bolesnika koji su primali intermedijarne doze profilaktičke terapije, kao ni u grupi bolesnika na “on demand” terapiji (Tabela 21).

Tabela 21: Značajnost razlike COMP-1 i COMP-2 u ispitivanim grupama bolesnika sa hemofilijom:

Grupe bolesnika u odnosu na režim lečenja	COMP-1 (x u U/l)	COMP-2 (x u U/l)	p
Puna doza profilakse	16.5	12.4	0.043
Intermedijarne doze profilakse	10.1	9.1	0.080
„On demand“	11.35	13.55	0.114

Dokazano je da je razlika u srednjim vrednostima između COMP-1 i COMP-2 grupe bolesnika koji su primali pune doze profilakse značajno veća u odnosu na razliku COMP-1 i COMP-2 u grupi bolesnika koji su bili na profilaksi intermedijarnim dozama, 4.64 vs 1.38, **p=0.028**. Takođe, dokazana je i značajnost razlike COMP-1 i COMP-2 između grupa bolesnika koji su primali pune doze profilakse i bolesnika na “on demand” terapiji, 4.64 vs -1.42, **p=0.010**, ali i značajnost razlike COMP-1 i COMP-2 između grupa bolesnika koji su primali intermedijarne doze profilakse i bolesnika na “on demand” terapiji, 1.38 vs -1.42, **p=0.020** (Tabela 22). Smanjenje koncentracije degradacionog produkta hrskavice u serumu – COMP u toku praćenja, bilo je značajno veće kod bolesnika na profilaktičkoj terapiji punim dozama faktora u odnosu kako na bolesnike koji su primali intermedijarne doze profilakse tako i u odnosu na bolesnike na “on demand” terapiji, ali su i bolesnici na profilaksi intermedijarnim dozama faktora imali značajno veće smanjenje koncentracije COMP u odnosu na bolesnike na “on demand” terapiji.

Tabela 22: Značajnost razlike srednjih vrednosti COMP-1 i COMP-2 u serumu kod bolesnika sa hemofilijom na različitim režimima lečenja

Grupe bolesnika u odnosu na režim lečenja	COMP-1 – COMP-2 (razlika u U/l)	SD	p
Puna doza profilakse	4.64	0.32	
Intermedijarne doze profilakse	1.38	0.34	
„On demand“	-1.42	0.69	
Značajnost razlike COMP-1 – COMP-2 između grupa na punoj dozi i intermedijarnoj dozi profilakse			0.028
Značajnost razlike COMP-1 – COMP-2 između grupa na punoj dozi profilakse i na „on demand“ terapiji			0.010
Značajnost razlike COMP-1 – COMP-2 između grupa na intermedijarnoj dozi profilakse i na „on demand“ terapiji			0.020

3.2. C-terminalni telopeptid kolagena tip II (CTX-II)

Degradacioni produkt kolagena zglobne hrskavice, CTX-II, određivan je u uzorcima jutarnjeg urina svim ispitanicima i to: inicijalno i posle tri meseca profilaktičke terapije koncentratom faktora u punim dozama ili intermedijarnim dozama, odnosno nakon tri meseca praćenja kod bolesnika na “on demand” terapiji. CTX-II u urinu koji uzet inicijalno označen je kao CTX-II-1 a CTX-II iz uzorka urina uzetog nakon tri meseca profilakse/praćenja obeležen je kao CTX-II-2. Vrednosti CTX-II izražene su u ng/mmol.

U grupi bolesnika koji su primali pune doze profilakse koncentratom faktora, srednja vrednost koncentracija CTX-II-2 je bila značajno niža u odnosu na CTX-II-1, 340.20 vs 482.34, **p=0.043**. Takođe je utvrđena značajnost promene srednje vrednosti CTX-II-2 u odnosu na CTX-II-1 i u grupi bolesnika koji su bili na profilaktičkoj terapiji intermedijarnim dozama, 253.81 vs 397.61, **p=0.048**. Značajnost promene srednje vrednosti CTX-II-2 u odnosu na CTX-II-1 nije utvrđena u u grupi bolesnika na “on demand” terapiji (Tabela 2).

Tabela 23: Značajnost razlike CTX-II-1 i CTX-II-2 u ispitivanim grupama bolesnika sa hemofilijom:

Grupe bolesnika u odnosu na režim lečenja	CTX-II-1 (x u ng/mmol)	CTX-II-2 (x u ng/mmol)	p
Puna doza profilakse	482.34	340.20	0.043
Intermedijarne doze profilakse	397.61	253.81	0.048
„On demand“	525.68	510.62	0.575

Dokazano je da je razlika u srednjim vrednostima između CTX-II-1 i CTX-II-2 grupe bolesnika koji su primali pune doze profilakse značajno veća u odnosu na razliku CTX-II-1 i CTX-II-2 u grupi bolesnika koji su lečeni “on demand”, 102.64 vs 10.36, **p=0.014**. Takođe je dokazana značajnost razlike CTX-II-1 i CTX-II-2 između grupa bolesnika na intermedijarnim dozama profilaktičke terapije i bolesnika na “on demand” terapiji, 93.38 vs 10.36, **p=0.027**. Međutim, nije dokazana značajnost razlike CTX-II-1 i CTX-II-2 između grupa bolesnika koji su primali pune doze profilakse i bolesnika na intermedijarnim dozama profilaktičke terapije, 102.64 vs 93.38, p=0.754 (Tabela 22). Smanjenje degradacionog produkta kolagena hrskavice – CTX-II je bilo značajno veće nakon tri meseca kod bolesnika koji su primali pune doze

profilaktičke terapije u odnosu na bolesnike na “on demand” terapije kao i kod bolesnika koji su primali intermedijarne doze profilaktičke terapije u odnosu na bolesnike na “on demand” terapiji, ali nije bio značajne razlike između grupa na punoj i intermedijarnoj dozi profilakse.

Tabela 23: Značajnost razlike srednjih vrednosti CTX-II-1 i CTX—II-2 u urinu kod bolesnika sa hemofilijom na različitim režimima lečenja

Grupe bolesnika u odnosu na režim lečenja	CTX-II-1 – CTXII-2 (x u ng/mmol)	SD	p
Puna doza profilakse	102.64	9.78	
Intermedijarne doze profilakse	93.38	10.34	
„On demand“	10.36	8.19	
Značajnost razlike CTX-II-1 – CTX-II-2 između grupa na punoj dozi i intermedijarnoj dozi profilakse			0.754
Značajnost razlike CTX-II-1 – CTX-II-2 između grupa na punoj dozi profilakse i na „on demand“ terapiji			0.014
Značajnost razlike CTX-II-1 – CTX-II-2 između grupa na intermedijarnoj dozi profilakse i na „on demand“ terapiji			0.027

Kao što se može videti, kod bolesnika koji su bili na “on demand” terapiji, srednje vrednosti COMP-2 (izmerene u uzorcima seruma posle tri meseca praćenja) su veće od inicijalnih vrednosti COMP-1 zbog čega i vrednosti razlika COPM-1 – COMP-2 ima negativan predznak, odnosno iznosi -1.42.

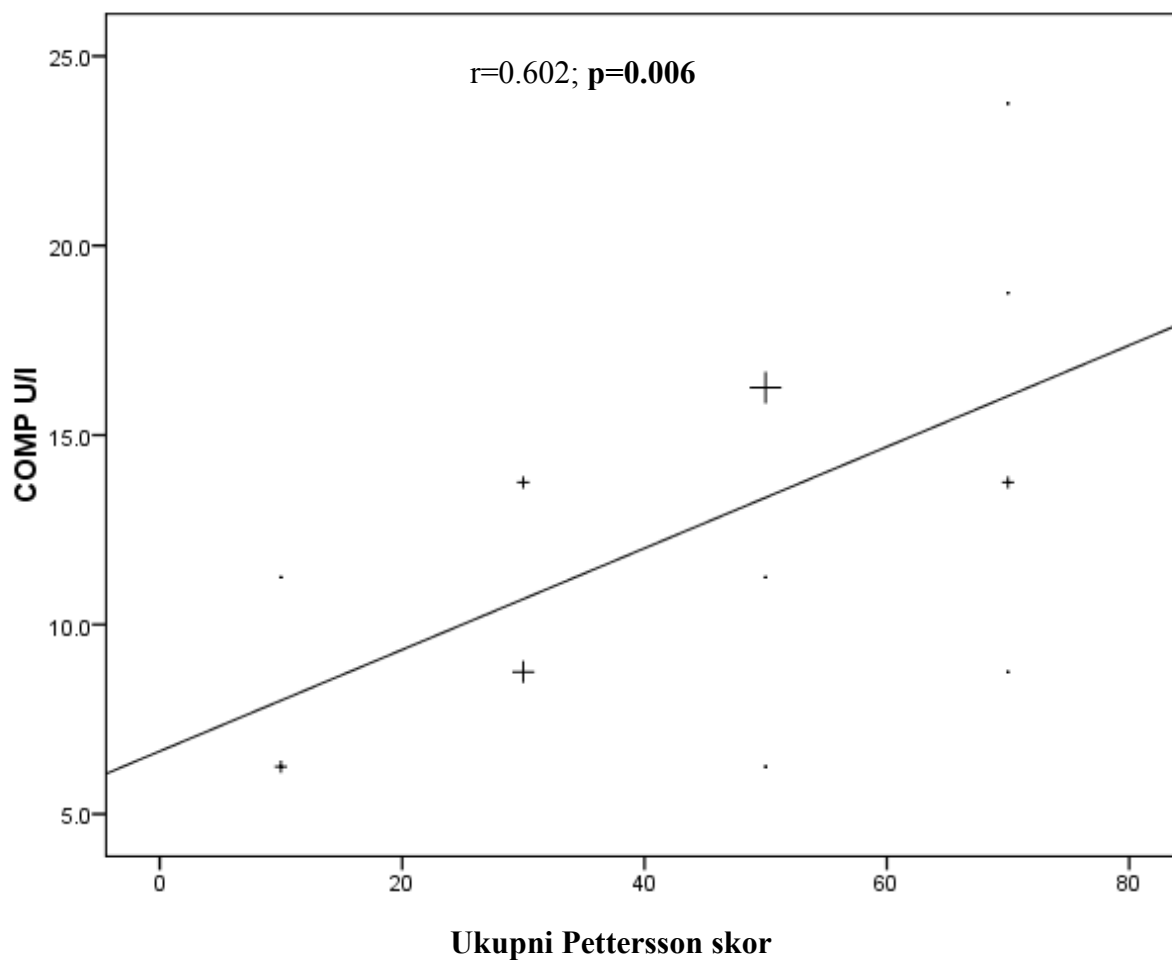
3.3. Analiza povezanosti biomarkera razgradnje hrskavice i Pettersson skora

Stepen oštećenja zgloba procenjivan je na osnovu radiografije zglobova kolena, lakatnih i skočnih zglobova i bodovanjem Pettersson skorom. Maksimalni broj bodova po zglobu je 13 a maksimalni ukupni Pettersson skor iznosi 78. U ovoj studiji rađena je procena povezanosti Pettersson skora (izražena u ukupnom broju bodova) i koncentracije biomarkera razgradnje hrskavice – COMP u serumu i CTX-II u urinu u inicijalno uzetim uzorcima svih bolesnika.

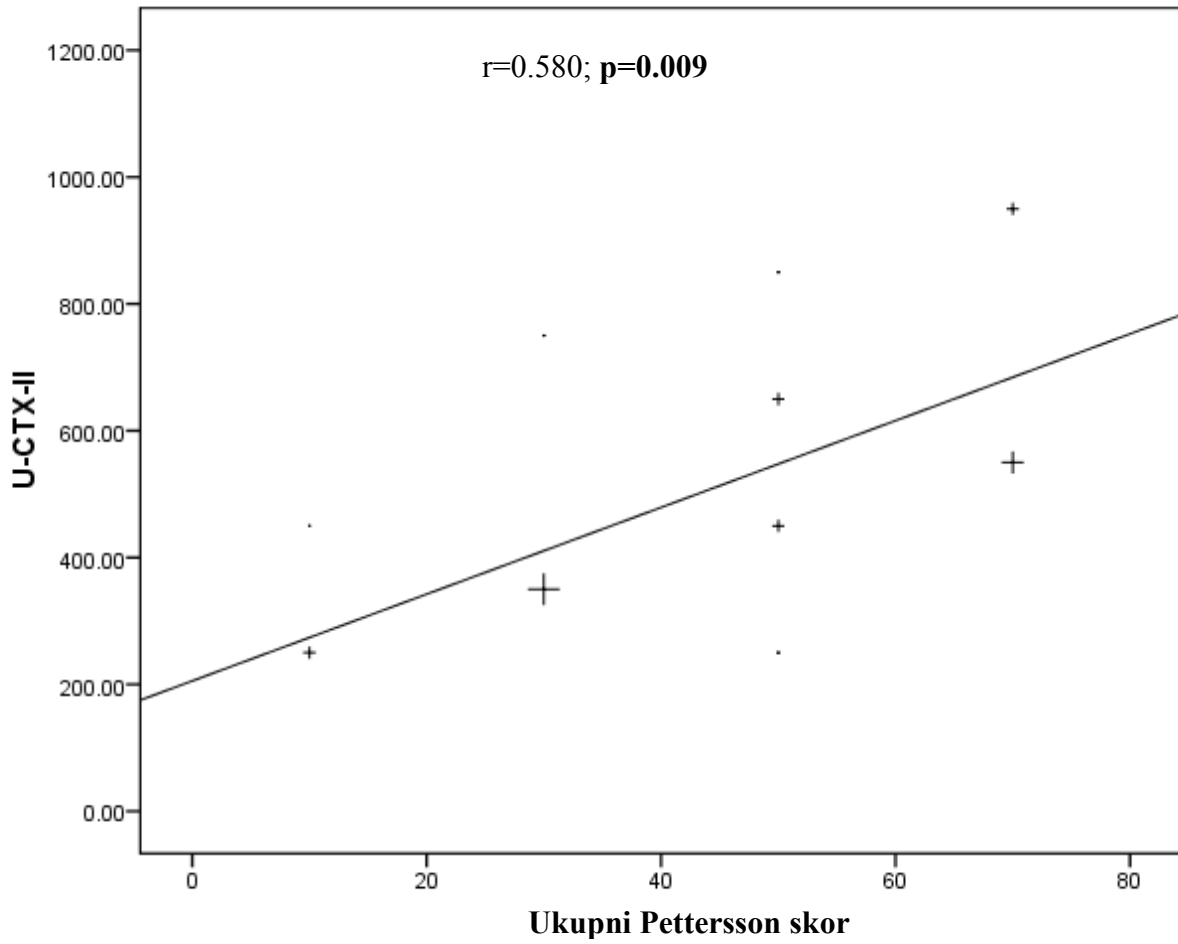
Utvrđeno je da postoji značajna pozitivna korelacija između vrednosti izmerene koncentracije COMP u serumu i broja bodova u Pettersson skoru, $r=0.602$, $p=0.006$ (Grafikon 10). Takođe je utvrđena i značajna pozitivna korelacije između koncentracije CTX-II u urinu i broja bodova u Pettersson skoru, $r=0.580$, $p=0.009$ (Grafikon 11).

U Pettersson skoru, jedna od komponenti skora, odnosno jedna od karakteristika koja se boduje jeste suženje zglobnog prostora (JSN – eng. “joint space narrowing”). U ovom istraživanju Pettersson-JSN je od svih komponenti skora bio najznačajnije povezan sa koncentracijom biomarkera degradacije hrskavice. Dokazana je značajna pozitivna korelacije između koncentracije COMP u serumu i prisustva Pettersson-JSN, $r=0.540$, $p=0.017$ (Grafikon 12). Takođe je dokazana i značajna pozitivna korelacije između koncentracije CTX-II u urinu i prisustva Pettersson-JSN, $r=0.583$, $p=0.009$ (Grafikon 13).

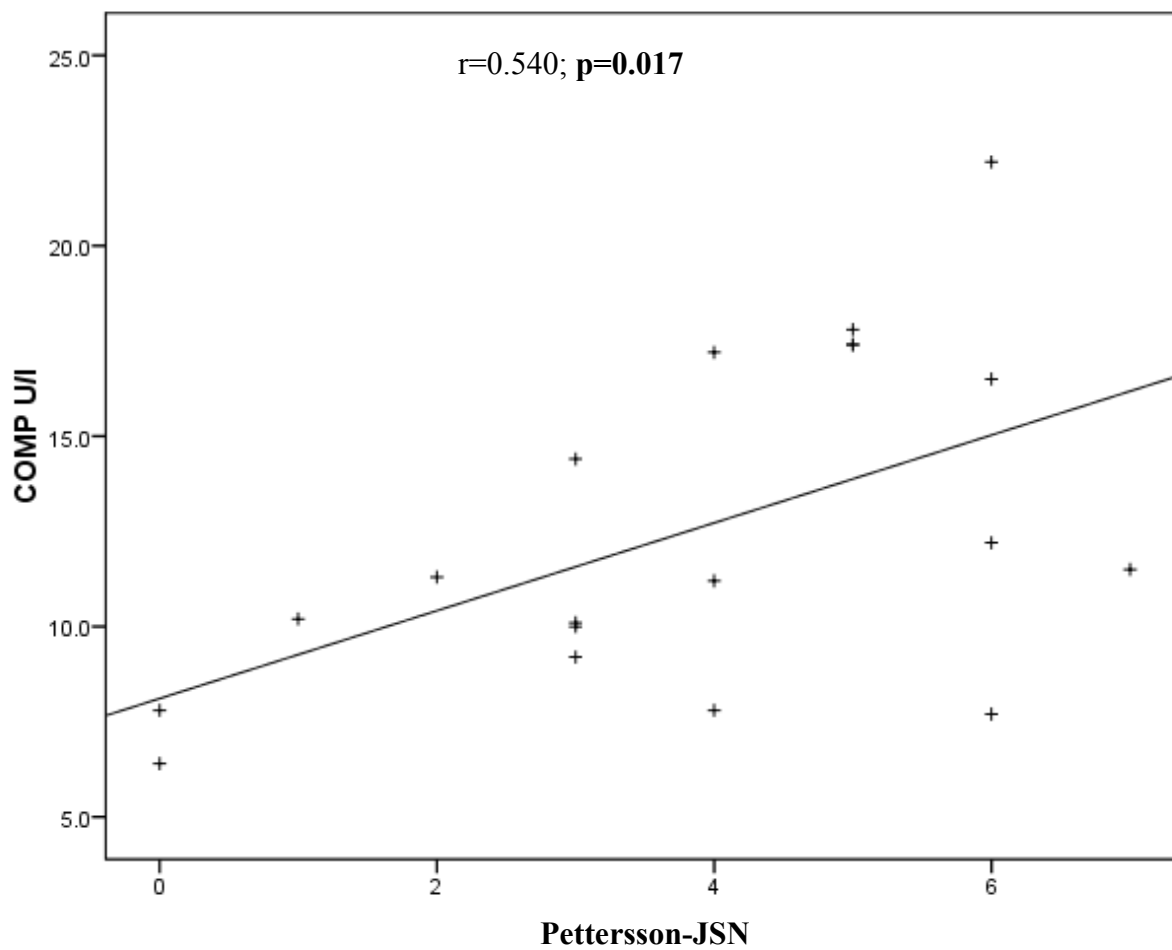
Grafikon 10: Korelacija COMP i ukupnog Peterson skora



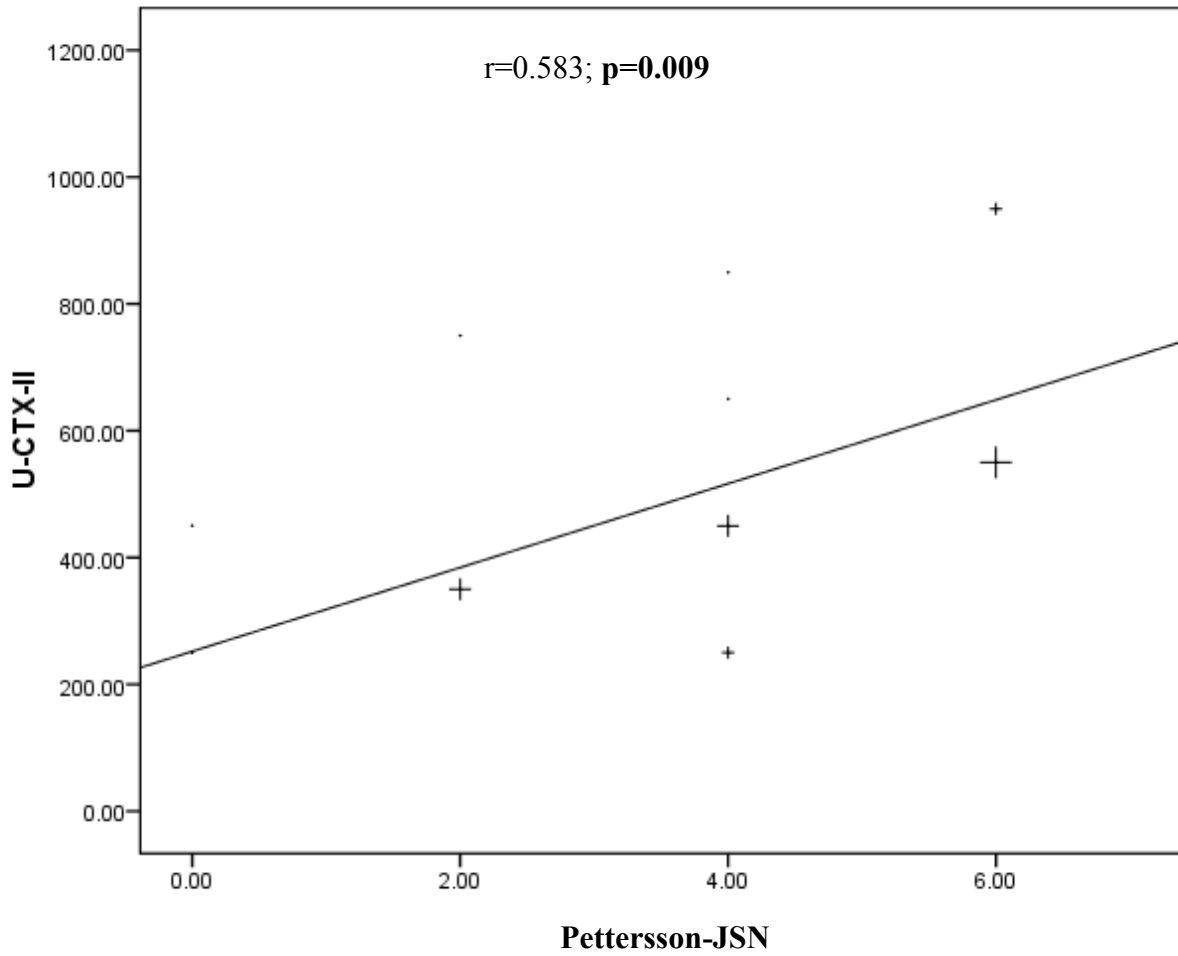
Grafikon 11: Korelacija CTX-II u urinu (U-CTX-II) i ukupnog Pettersson skora



Grafikon 12: Korelacija COMP i prisustva komponente Pettersson skora – suženje zglobnog prostora (Pettersson-JSN)



Grafikon 13: Korelacija CTX-II u urinu (U-CTX-II) i prisustva komponente Pettersson skora – suženje zglobnog prostora (Pettersson-JSN)



DISKUSIJA

Spontana, rekurentna krvarenja u zglobove predstavljaju glavnu odliku hemofilije koja dovodi do vodećeg uzroka morbiditeta ovih bolesnika, odnosno do pojave HA i invaliditeta [6,51,53]. Da bi se smanjila učestalost krvarenja u zglobove i prevenirao ili usporio razvoj HA, osmišljen je koncept primene profilaktičke terapije deficitnim faktorom (FVIII/IX). Zlatnim standardom smatra se profilaktički režim definisan od strane Švedske grupe – Nilsson i sar., koji podrazumeva primenu 20-40 i.j./kg tri x nedeljno koncentrata FVIII kod hemofilije A i 2 x nedeljno FIX kod bolesnika sa hemofilijom B [4,37-39]. Cilj profilaktičke terapije je da održava nivo faktora u plazmi iznad 1%, odnosno da bolesnike sa teškom hemofilijom prevede u grupu bolesnika sa srednje teškom hemofilijom i time smanji broj spontanih epizoda krvarenja u zglobove [35]. U novijoj literature, preporučene doze za profilaktičku terapiju deficitnim faktorom kreću se od 25-40 i.j./kg tri x nedeljno za hemofiliju A, odnosno dva x nedeljno za hemofiliju B [36]. S obzirom na visoke troškove primene profilakse, mnoge publikacije koje su se bavile temom profilaktičke terapije hemofilije sugerisale su da bi trebalo jasnije definisati minimum doze profilaktičke terapije koja bi bila efektivnija u odnosu na “on demand” tretman, čime bi primena profilakse bila dostupnija za širu primenu i u zemljama u razvoju [35,36]. Za sada najasnije definisana primena manjih doza profilaktičke terapije, takozvanih intermedijarnih doza, preporučena je od strane Holandske grupe – Van den Berg i sar., a to je doza od 15-25 i.j./kg dva do tri puta nedeljno [42-44].

U našoj studiji, u odnosu na režim lečenja, bolesnici su podeljeni u tri grupe. Grupa koja je primala profilaktičku terapiju u punim dozama, po preporukama Švedske grupe, a to je 20 i.j./kg tri x nedeljno. Takvih bolesnika bilo je 5 sa dijagnozom hemofilije A te je kao profilaksa primenjivan koncentrat FVIII. Grupa koja je primala intermedijarne doze profilakse obuhvatala je 5 bolesnika sa hemofilijom A i primenjivan je koncentrat FVIII u dozi 10-15 i.j./kg tri x nedeljno. Prosečna nedeljna doza primenjenog koncentrata FVIII u ovoj grupi iznosila je 32 i.j./kg. U profilaktičkoj primeni intermedijarnih doza faktora preporučenoj od navedene Holandske grupe, prosečna nedeljna doza iznosila je 35 i.j./kg, što je približno nedeljnoj dozi

naših bolesnika na intermedijarnim dozama profilakse. Grupu na “on demand” terapiji činilo je 10 bolesnika, 7 sa hemofilijom A i 3 sa hemofilijom B.

U rutinskim testovima hemostaze, promene srednjih vrednosti APTT testa nakon tri meseca profilakse, odnosno praćenja, nisu se značajni razlikovale kod naših ispitanika. Cilj profilaktičke terapije je održavanje nivoa FVIII/IX >1% u plazmi, što nije dovoljni za značajniju korekciju APTT. Međutim, bilo je značajne promene u postizanju željenog nivoa FVIII/IX >1% u odnosu na režim lečenja. U grupi koja je bila na redovnoj primeni profilaktičke terapije u punim dozama, 80 % bolesnika (4 od 5 bolesnika) je nakon tri meseca imalo plazmatski nivo FVIII >1%, dok je u grupi koja je bila na intermedijarnim dozama profilakse 40% (2 od 5 bolesnika) postiglo je željeni nivo FVIII>1%, što je bila statistički značajna razlika (p=0.038). U grupi bolesnika na “on demand” terapiji, očekivano, nijedan bolesnik (0%), nije postigao nivo FVIII/IX>1%. Značajna razlika u stopi bolesnika koji su nakon tri meseca postigli željeni nivo faktora >1% bila je između grupa na punim dozama profilakse i na “on demand” terapiji, p=0.012, ali dokazana je i značajna razlika između grupa na intermedijarnim dozama profilaakse i na “on demand” terapiji, p=0.042. Švedska grupa je pokazala da doza od 20-40 i.j./kg tri x nedeljno postiže cilj profilaktičke terapije, odnosno da održava nivo faktora >1% [37,38]. Holandska grupa u svom prikazu rezultata praćenja bolesnika na intermedijrnim dozama profilakse naznačila je da cilj studije nije bio u postizanju nivoa faktora >1% već da se smanji broj epizoda krvarenja a time i stepen HA u odnosu na bolesnike na “on demand” terapiji, tako da u odnosu na Švedsku grupu nisu komparirali nivo faktora >1% ove dve grupe bolesnika [42]. Holandska studija je postigla svoj cilj a to je da su intermedijrnim dozama profilakse značajno smanjili godišnji broj epizoda krvarenja a stepen HA meren Pettersson skorom bio je znatno manji u odnosu na bolesnike na “on demand” terapiji [42,44]. Takođe ni studija koja je poredila efikasnost profilaktičkih režima Švedske i Holandske grupe, odnosno profilakse u hemofiliji punim i intermedijarnim dozama, nije procenjivala razlike doznih režima u odnosu na nivo faktora >1%, već takođe u odnosu na godišnji broj epizoda krvarenja i na stepen HA bodovan Pettersson skorom, čime je dokazala značajnu razliku u korist profilaktičkog režima punim dozama Švedske grupe [44].

U nedavno publikovanim istraživanjima zapaženo je nivo FVIII/IX nije uvek u korelaciji sa težinom kliničke slike hemofilije, odnosno težine krvarenja [54]. Uočeno je da i bolesnici sa srednje teškom (FVIII/IX 1-5%) i blagom hemofilijom (FVIII/IX >5%) mogu imati epizode ozbiljnog krvarenja [54]. Takođe, sa druge strane, publikovane su studije koje su pokazale da oko 10% bolesnika sa teškom hemofilijom (FVIII/IX <1%) klinički se ispoljavaju kao blaga hemofilija i ne razvijaju HA [55]. Podela hemofilije na tešku, srednje tešku i blagu u odnosu na nivo FVIII/IX u plazmi nije uvek u korelaciji sa fenotipskim ispoljavanjem kliničke slike [55-57]. Testovi koji procenjuju koagulacioni status određivanjem generacije trombina pokazali su se značajno senzitivnijim u korelaciji sa težinom kliničke slike kod bolesnika sa hemofilijom u odnosu na nivo FVIII/IX [54, 55,57]

U našem istraživanju, koagulacioni status procenjivan je testovima endogenog trombin potencijala - ETP i rotacionom tromboelastometrijom - ROTEM. ETP.AUC.cal, kojim se meri ukupna količina stvorenog trombina, bio je značajno veći nakon tri meseca profilaktičke terapije u grupi koja je primala pune doze u odnosu na inicijalne vrednosti, pre započinjanja profilakse, $p=0.042$. Značajnih promena ETP.AUC.cal nije bilo nakon tri meseca profilaktičke terapije u grupi na intermedijarnim dozama koncentrata FVIII. Vrednosti ETP.Cmax.cal, koje odražavaju maksimalnu postignutu koagulaciju, nisu se značajno promenile nakon tri meseca profilaktičke terapije u odnosu na inicijalne vrednosti pre početka profilakse, kako u grupi bolesnika na punim dozama, tako ni u grupi na intermedijarnim dozama profilakse koncentratom FVIII. Bolesnici na "on demand" terapiji kao kontrolna grupa, nisu imali značajne promene ETP.AUC.cal i ETP.Cmax nakon tri meseca praćenja. U malom broju studija koje su procenjivale značaj ETP testova kod bolesnika sa hemofilijom, takođe je zapaženo da se prilikom supstitucione terapije koncentratom faktora značajno poboljšava vrednost ETP.AUC.cal, bez značajnih promena u ETP.Cmax.cal [57]. U odsustvu FVIII ili IX (kao što je slučaj kod bolesnika sa hemofilijom), onemogućeno je stvaranje kompleksa FVIIIa-FIXa a time i stvaranje dodatnih količina FXa neophodnih za stvaranje kompleksa FVa-FXa koji dovodi do porasta generacije trombina u fazi propagacije [56]. Primenom FVIII/IX opisanim putem dolazi do porasta generacije trombina, odnosno do povećanja njegove ukupne količine, što se odražava kroz vrednost ETP.AUC.cal [57,58]. Međutim, supstituciona terapija faktorom koja održava nivo plazmatskog FVIII/IX nešto iznad 1% je i dalje niska vrednost zbog čega nema značajnije promene u maksimalno postignutoj

koagulaciji izraženoj preko vrednosti ETP.Cmax.cal [57,58]. Za sada, nijedna studija nije poredila promene ETP testova u odnosu na različite dozne profilaktičke režime.

ROTEM test procenjuje koagulacioni status ne samo kroz proces stvaranja trombina već i kroz proces polimerizacije fibrina i stabilizovanja polimerizovanog fibrin [59]. Kod bolesnika sa hemofiljom produženo je CT, odnosno vreme potrebno za formiranje trombina i započinjanje polimerizacije fibrin, u INTEM testu koji odražava unutrašnji put koagulacije. ROTEM se određuje iz pune (citratne) krvi, ne zahteva nikakvu pripremu uzorka u smislu centrifugiranja i izdvajanja plazme [60]. Može se uraditi odmah po vađenju uzorka što mu daje prednost u brzom praćenju dejstva susptitucione terapije koncentratom faktora zbog čega je i našao primenu u praćenju efikasnosti lečenja bolesnika sa hemofiljom [61,62]. U našem istraživanju ROTEM (preciznije CT u INTEM-u) je određivan inicijalno svim ispitanicima – ROTEM-1, nakon 20 min od aplikovanja prve doze koncentrata FVIII prilikom započinjanja profilakse punim ili intermedijarnim dozama – ROTEM-2, kao i tri meseca nakon profilaktičke terapije (pre primanja sledejuće doze), odnosno tri meseca nakon praćenja bolesnika na “on demand” terapiji – ROTEM-3. Srednja vrednost ROTEM-2 je bila statistički značajno veća od ROTEM-1, kako u grupi na punim dozama profilakse, $p=0.002$, tako i u grupi na intermedijarnim dozama profilakse, $p=0.008$. Međutim, ni u jednoj od ovih grupa nije bilo značajne razlike između srednjih vrednosti ROTEM-3 i ROTEM-1, odnosno nakon tri meseca profilakse punim/intermedijarnim dozama koncentrata faktora VIII nije bilo statistički značajne promene ROTEM u odnosu na inicijalne vrednosti pre započinjanja profilakse. Ono što je značajno, ovim istraživanjem je dokazana statistička značajnost razlike srednjih vrednosti ROTEM-3 između grupa na punim i intermedijarnim dozama profilakse, $p=0.025$. Nakon tri meseca profilakse, bolesnici koji su primali pune doze koncentrata FVIII imali su značajno kraće vreme CT u INTEM testu u odnosu na bolesnike koji su primali intermedijarne doze. Dokazano je da je nakon tri meseca profilaktičke terapije punim dozama koncentrata FVIII, 40% (2) bolesnika iz ove grupe imalo produžen ROTEM (CT u INTEM-u), dok je u grupi sa intermedijarnim dozama nakon tri meseca profilakse svih 100% (5) imalo produžen ROTEM, što je bila statistički značajna razlika, $p=0.038$. Naravno, promene u vrednostima ROTEM testa nije bilo u grupi na “on demand” terapiji. U literaturi, primena ROTEM testa kod bolesnika sa hemofiljom opisana je kod praćenja efikasnosti primenjene doze koncentrata faktora u slučajevima krvarenja, međutim nisu

publikovane studije koje porede vrednosti ROTEM testa u različitim doznim režimima profilaktičke terapije.

Biomarkeri oštećenja zgloba

Oštećenje zgloba je posledica kombinovanog procesa koji obuhvata i sintezu i degradaciju komponenti matriksa u različitim zglobnim tkivima kao što su hrskavica i kost [52]. Nastaje kao posledica čestih, ponavljanih krvarenja u zglobove kod bolesnika sa hemofilijom [45]. U ovoj studiji, istraživan je značaj određivanja biomarkera degradacije zglobne hrskavice u proceni oštećenja zgloba i to: COMP u serumu, koji predstavlja degradacioni produkt nekolagenog matriksa hrskavice i CTX-II u urinu koji nastaje tokom degradacije kolagena zglobne hrskavice. Promena koncentracija degradacionih biomarkera hrskavice upoređivana je u odnosu na različite režime lečenja bolesnika sa hemofilijom obuhvaćenih ovom studijom. Takođe su degradacioni biomarkeri hrskavice upoređivani i u odnosu na standardni radiografski skor oštećenja zgloba – Pettersson skor, bodovanjem zglobnih oštećenja koja se uočavaju na konvencionalnoj radiografiji zglobova: kolena, lakatnih i skočnih zglobova.

U ovom istraživanju, dokazano je da su srednje vrednosti COMP u serumu nakon tri meseca profilaktičke terapije punim dozama koncentrata FVIII u ovoj grupi bolesnika značajno niže u odnosu na vrednosti izmerene pre početka profilakse, $p=0.043$. Značajnost promene srednjih vrednosti COMP u serumu nakon tri meseca profilakse intermedijarnim dozama, odnosno nakon tri meseca praćenja bolesnika na „on demand“ terapiji, u odnosu na inicijalne vrednosti, nije dokazana u ovim grupama bolesnika. Razlika srednjih vrednosti COMP u uzorcima uzetim inicijalno i nakon tri meseca profilakse, odnosno praćenja, bila je značajna između grupa bolesnika na punim i intermedijarnim dozama profilakse, odnosno razlika između inicijalnih vrednosti COMP u serumu i vrednosti nakon tri meseca bila je značajno veća u grupi koja je primala pune doze u odnosu na grupu koja je primala intermedijarne doze profilakse, $p=0.028$. Razlika između ove dve vrednosti COMP bila je takođe značajna i između grupa bolesnika koji su primali punu dozu profilakse i bolesnika na „on demand“ terapiji, $p=0.010$, ali i između grupa bolesnika na intermedijarnim dozama profilakse i bolesnika na „on demand“ terapiji, $p=0.020$. Srednje vrednosti CTX-II u urinu u grupi bolesnika koja je primala pune doze

profilaktičke terapije, nakon tri meseca profilakse bile su značajno manje u odnosu na vrednosti pre započinjanja profilakse, $p=0.043$. Takođe i u grupi koja je primala intermedijarne doze profilakse, srednje vrednosti CTX-II su bile značajno niže nakon tri meseca profilakse u odnosu na inicijalne vrednosti, $p=0.048$. Dokazano je da je razlika srednjih vrednosti CTX-II u uzorcima uzetim pre započinjanja profilakse i nakon tri meseca praćenja statistički značajno veća u grupi bolesnika na profilaksi punim dozama koncentrata FVIII u odnosu na grupu na „on demand“ terapiji, $p=0.014$. Razlika srednjih vrednosti CTX-II zmerenih inicijalno i nakon tri meseca profilakse, odnosno praćenja, dokazana je između grupa bolesnika na profilaksi intermedijarnim dozama i bolesnika na „on demand“ terapiji, $p=0.027$. Međutim, značajnost razlike vrednosti CTX-II nije dokazana između grupa bolesnika na punim i bolesnika na intermedijarnim dozama profilakse. Koncentracija COMP u serumu bila je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa visinom ukupnog Pettersson skora, $p=0.006$, a takođe je i koncentracija CTX-II u urinu bila u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ukupnim Pettersson skorom, $p=0.009$. Ovim je dokazano da je visina koncentracije degradacionih biomarkera hrskavice - COMP i CTX-II značajan prediktor visine Pettersson skora, odnosno da bolesnici sa višim Pettersson skorom imaju i veću razgradnju zglobne hrskavice koja se reflektuje kroz visinu koncentracije degradacionih produkata hrskavice. Ovim istraživanjem je dokazano da su biomarkeri oštećenja zgloba bili u značajnoj korelaciji u odnosu na prisustvo komponente Pettersson skora – JSN (suženje zglobnog prostora). Naime, visina koncentracije COMP u serumu bila je u značajnoj korelaciji sa prisustvom Pettersson-JSN, $p=0.017$. Takođe je visina koncentracije CTX-II u urinu bila u značajnoj korelaciji sa prisustvom Pettersson-JSN, $p=0.009$.

Za sada jedina publikovana studija koja je istraživala uticaj različitih režima profilakse na razvoj HA pokazala je da bolesnici na punim dozama profilakse imaju značajno manji Pettersson skor u odnosu na bolesnike na intermedijarnim dozama profilakse [44]. Takođe je i Holandska grupa istraživača pokazala da bolesnici na intermedijarnim dozama profilakse imaju značajno manji Pettersson skor u odnosu na bolesnike na „on demand“ terapiji [42,44]. Međutim, u dosadašnjoj literaturi nema podataka o praćenju koncentracije biomarkera oštećenja zgloba u odnosu na različite režime lečenja. Svi dostupni podaci odnose se na uticaj različitih režima lečenja na razvoj HA koja je procenjena bodovanjem po Pettersson skoru [37,38, 42-44]. Jedina studija koja je procenjivala značajnost povezanosti biomarkera oštećenja zgloba i visine

Pettersson skora kod bolesnika sa hemofilijom jeste studija Jansen i sar. [52]. Ova studija je na uzorku od 36 bolesnika sa hemofilijom (A i B) pokazala postojanje statističke značajnosti korelacije biomarkera COMP u serumu i CTX-II u urinu sa visinom ukupnog Pettersson skora. Takođe su utvrdili i postojanje značajne korelacije između biomarkera pojačane sinteze hrskavice – hondroitin sulfata 846 (CS-846) i visine ukupnog Pettersson skora kod bolesnika sa hemofilijom, međutim ovaj biomarker nije rađen u našem istraživanju [52]. Jansen i sar. su uočili i značajnost korelacije COMP u serumu i CTX-II u urinu sa prisustvom komponente Pettersson skora-JSN, koje je potvrđeno i našim istraživanjem. Ovu povezanost biomarkera sa Pettersson-JSN objasnili su činjenicom da oštećenje zgloba kod bolesnika sa hemofilijom uglavnom se javlja na kolenima, laktovima i skočnim zglobovima. Ovi zglobovi su relativno veliki zglobovi i značajno doprinose visini koncentracije izlučenih biomarkera oštećenja zgloba u cirkulaciju. Zglob kuka je takođe veliki zglob, ali njegova zahvaćenost u HA je pre izuzetak nego pravilo [52]. Međutim, ni studija Jansen i sar. nije se bavila uticajem različitih režima profilakse/lečenja na koncentraciju biomarkera oštećenja zgloba.

Ova studija je pokazala da kod bolesnika sa hemofilijom, primena profilaktičke terapije u punim dozama značajno poboljšava testove hemostaze, koagulacioni status bolesnika i smanjuje produkte degradacije zglobne hrskavice u odnosu na profilaksu intermedijarnim dozama. Međutim, u odnosu na navedene parametre, primena profilakse intermedijarnim dozama faktora ima prednost u odnosu na „on demand“ terapiju. Biomarkeri degradacije zglobne hrskavice, kao što su COMP u serumu i CTX-II u urinu, jesu značajni prediktori visine Pettersson skora kojim se boduje stepen oštećenja zgloba. Pettersson skor zahteva radiografiju zglobova što isključuje mogućnost učestalog praćenja razvoja HA. Takođe, Pettersson skor obuhvata bodovanje oštećenja zglobova kolena, lakatnih i skočnih zglobova. Biomarkeri oštećenja zgloba mogu se odrediti iz uzoraka lako dostupnih bioloških tečnosti kao što su krv i urin što daje mogućnost učestalijeg praćenja progresije HA i efikasnosti terapije, a takođe predstavljaju markere oštećenja ne samo zglobova kolena, laktova i skočnih zglobova već degradacione produkte hrskavice svih, pa i manjih zglobova zahvaćenih HA.

ZAKLJUČAK

1. Utvrđeno je da ne postoji značajna promena vrednosti APTT testa između ispitivanih grupa bolesnika koji su podvrgnuti različitim režimima lečenja, a to je: profilaksa punim dozama koncentrata faktora, profilaksa intermedijarnim dozama faktora i terapija „on demand“.
2. Dokazano je da bolesnici koji su na punoj dozi profilaktičke terapije imaju značajno veću stopu postizanja nivoa faktora $>1\%$ u odnosu na bolesnike na intermedijarnim dozama profilakse ($p=0.024$), dok je ova stopa bila značajno veća kod bolesnika na intermedijarnim dozama profilakse u odnosu na bolesnike na „on demand“ terapiji ($p=0.042$).
3. Testovima ispitivanja koagulacionog statusa dokazano je:
 - a) Vrednosti ETP.AUC.cal bile su značajno veće kod bolesnika na punim profilaktičkim dozama nakon tri meseca u odnosu na vrednosti pre započinjanja profilakse ($p=0.042$), međutim, nije bilo značajne razlike vrednosti ETP.AUC.cal u grupama bolesnika na intermedijarnim dozama profilakse i na „on demand“ terapiji.
 - b) Vrednosti ETP.AUC.cal nakon tri meseca profilakse/praćenja nisu se značajno razlikovale između grupa na različitim režimima lečenja.
 - c) Vrednosti ETP.Cmax.cal nakon tri meseca profilakse/praćenja nisu se značajno razlikovale kako unutar iste grupe bolesnika tako i između grupa bolesnika na različitim režimima lečenja.
 - d) ROTEM test (CT-INTEM) kod bolesnika na punim dozama profilakse bio je značajno kraći 20 min nakon aplikovanja prve doze profilakse u odnosu na vrednosti pre započinjanja profilakse ($p=0.002$), kao i kod bolesnika na intermedijarnim dozama profilakse ($p=0.008$).

- e) ROTEM test (CT-INTEM) kod bolesnika na punim dozama profilakse nije bio značajno kraći nakon tri meseca profilakse u odnosu na inicijalne vrednosti ($p=0.099$), kao ni u grupi na intermedijarnim dozama profilakse ($p=0.148$).
 - f) ROTEM test (CT-INTEM) nakon tri meseca profikalse bio je značajno kraći u grupi bolesnika koji su primali pune doze u odnosu na bolesnike koji su primali intermedijarne doze profilakse ($p=0.025$).
 - g) Stopa produženog ROTEM testa (CT-INTEM) nakon tri meseca profilakse bila je značajno veća kod bolesnika koji su primali intermedijarne doze (100%) u odnosu na bolesnike koji su primali pune doze (40%) profilaktičke terapije ($p=0.038$).
4. Ispitivanjem koncentracija biomarkera oštećenja zgloba dokazano je:
- a) Koncentracija COMP u serumu bila je značajno niža nakon tri meseca profilakse punim dozama faktora u odnosu na vrednosti pre započinjanja profilakse ($p=0.043$), dok značajnost vrednosti COMP nakon ttri meseca profilakse/praćenja nije nađena u grupi bolesnika na intermedijarnim dozama profilakse kao i kod bolesnika na „on demand“ terapiji.
 - b) Razlika inicijalnih vrednosti COMP u serumu i vrednosti nakon tri meseca profilakse/praćenja, bila je značajna između grupa bolesnika: pune doze profilakse u odnosu na intermedijarne doze profilakse ($p=0.028$); pune doze profilakse u odnosu na „on demand“ ($p=0.010$); intermedijarne doze profilakse u odnosu na „on demand“ ($p=0.020$).
 - c) Vrednosti CTX-II u urinu bile su značajno manje posle tri meseca profilakse u odnosu na vrednosti pre započinjanja terapije u grupi koja je primala pune doze ($p=0.043$), kao i u grupi koja je primala intermedijarne doze profilakse ($p=0.048$).
 - d) Razlika inicijalnih vrednosti CTX-II u urinu i vrednosti nakon tri meseca profilakse/praćenja, bila je značajno niža u grupi bolesnika sa punom dozom profilakse u odnosu na „on demand“ ($p=0.014$) i intermedijarnom dozom

profilakse u odnosu na „on demand“ ($p=0.027$); međutim, nije bilo značajne razlike između grupa na punim i intermedijarnim dozama profilakse.

5. Ispitivanjem korelacije biomarkera i Pettersson skora dokazana je:
 - a) Značajna pozitivna korelacija između koncentracije COMP u serumu i ukupnog Pettersson skora ($p=0.006$) za celu grupu bolesnika sa hemofilijom.
 - b) Značajna pozitivna korelacija između koncentracije CTX-II u urinu i ukupnog Pettersson skora ($p=0.009$) za celu grupu bolesnika.
 - c) Značajna pozitivna korelacija između koncentracije COMP u serumu i prisustva komponente Pettersson skora – JSN ($p=0.017$) za celu grupu bolesnika.
 - d) Značajna pozitivna korelacija između koncentracije CTX-II u urinu i prisustva komponente Pettersson skora – JSN ($p=0.009$).
6. Rezultati ovog ispitivanja su pokazali da bolesnici na punim dozama profilaktičke terapije imaju bolji koagulacioni status i manju koncentraciju biomarkera oštećenja zgloba u odnosu na bolesnike koji primaju intermedijarne doze profilakse, ali bolesnici na intermedijarnim dozama profilaktičke terapije imaju bolje parametre koagulacionog statusa i manje koncentracije degradacionih produkata oštećenja zgloba u odnosu na bolesnike na „on demand“ terapiji.
7. Ovim istraživanjem dokazan je značaj biomarkera degradacije hrskavice u proceni oštećenja zgloba kod HA i efikasnosti profilakse u zavisnosti od doze primenjenog koncentrata faktora i lečenja „on demand“.

LITERATURA:

1. Franchini M, Mannucci PM. Past, present and future of haemophilia: a narrative review. *Orphanet J of Rare Dis* 2012; 7 (1) :24.
2. Guidelines for the management of hemophilia. World Federation of Hemophilia, 2005.
3. Feldman BM, Funk S, Lundin B, Lundin B, Doria AS, Blanchette V. Musculoskeletal measurement tools from the International Prophylaxis Study Group (IPSG). *Haemophilia* 2008; 14 (suppl. 3): 162-169.
4. Blanchette VS, Manco-Jonson M., Santagistino E., Ljungs R. Optimizing factor prophylaxis for the haemophilia population: where do we stand? *Haemophilia* 2004; 10 (suppl. 4): 97-104.
5. Negrier C, Goudemand J, Lambert T. Haemophylic arthropathy from A to Z. *Haemophilia* 2008; 14 (supl 4): 1-2.
6. Lafeber F, Miosec P, Valentino LA. Physiopathology of haemophilic arthropathy. *Haemophilia* 2008; 14 (supl 4): 3-9.
7. Cromwell C, Alderot LM: History of hemophilia. In: Rodriguez-Merchan EC, Valentino LA, editors. *Current and future issues in haemophilia care*. Oxford, Wiley-Blackwell 2011: 3-5.
8. Ingram GIC. The history of haemophilia. *J Clin Path* 1976; 29: 469-479.
9. Duaglas S. Hystorical Review: Coagulation history, Oxford 1951-53. *Br J Haematol* 1999; 107: 22-32.
10. Elezović I: Fibrinoliza i fibrinogenoliza u akutnoj leukemiji. Doktorka teza Medicinski Fakultet, 1993.
11. Roberts HR: Oscar Ratnoff: his contributions to the golden era of coagulation research. *Br J Haematol* 2003; 122: 180—198.
12. MacFarlan RG: An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature* 1964; 202: 498-499.
13. Hoffman M., Monroe D.M: A Cell-based Model of Hemostasis. *Tromb Haemost.* 2001; 85: 958-965.

14. Davie EW, Rattnof OD: Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964; 145: 1310-1312.
15. Gailani D, Broze GJ: Factor XI activation by thrombin and factor XIa. *Semin Thromb Hemost* 1993; 19: 396-404.
16. Osterud B, Rapaport SI: Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5260-5264.
17. Diaz-Ricart M, Estebanell E, Lozano M, Aznar-Salatti J, White JG, Ordinas A, Escolar G. Thrombin facilitates primary platelet adhesion onto vascular surfaces in the absence of plasma adhesive proteins: studies under flow conditions. *Haematologica* 2000; 85(3): 280-288.
18. Hung DT, Wong YH, Vu TK, Coughlin SR. The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1992; 267(29): 20831-20834.
19. Monkovic D, Tracy PB: Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Biochemistry* 1990; 29: 1118-1128.
20. Monkovic DD, Tracy PB: Functional characterization of human platelet-released factor V and its activation by factor Xa and thrombin. *J Biol Chem* 1990; 265: 17132-17140.
21. Hultin MB: Modulation of thrombin-mediated activation of factor VIII:C by calcium ions, phospholipid and platelets. *Blood* 1985; 66: 53-58.
22. Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. *Essential Haematology*. Chapter 24. 5th edition. Oxford, Wiley-Blackwell 2006: 290-302.
23. Rossetti LC, Radic CP, Abelleiro MM, Larripa IB, De Brasi CD. Eighteen years of molecular genotyping the hemophilia inversion hotspot: from Southern Blot to Inverse Shifting-PCR. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 7271-7285.
24. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312: 326-330.
25. Fujita PA, Rhead B, Zweig AS, Hinrichs AS, Karolchik D, Cline MS, et al. The UCSC genome browser database. *Nuc Acids Res* 2010; 39: 876-882.

26. Furie B, Furie BC: Molecular basis of blood coagulation. In: Hofman et al, editors. Hematology, Basic Principles and Practice, Churchill Livingstone, 4th ed. 2005; 1931-1953.
27. Elezovic I. Acquired haemophilia. Acta Clinica 2011; 3: 138-145.
28. Lozier JN, Kessler CM. Clinical aspects and therapy of haemophilia. In: Hofman et al, editors. Hematology, Basic Principles and Practice, Churchill Livingstone, 4th ed. 2005; 1883-1904.
29. Peerlinck K, Jacquemin M. Characterization of inhibitors in congenital haemophilia. In: Rodriguez-Merchan EC, Lee CA, editors. Inhibitors in patients with haemophilia. Oxford, Blackwell Publishing 2002: 9-13.
30. Van den Bom J. Epidemiology of inhibitors. In: Rodriguez-Merchan EC, Valentino LA, editors. Current and future issues in haemophilia care. Oxford, Wiley-Blackwell 2011: 60-67.
31. Elezovic I. Etiopathogenesis of inhibitors in haemophilia. Acta Clinica 2011: 94-108.
32. Elezovic I. Treatment of patients with haemophilia and inhibitors. Acta Clinica 2011: 119-128.
33. Kreuz W. Immune tolerance and choice of concentrates. In: Rodriguez-Merchan EC, Lee CA, editors. Inhibitors in patients with haemophilia. Oxford, Blackwell Publishing 2002: 55-58.
34. Blatny J, Mathew P. Immune tolerance induction program. In: Rodriguez-Merchan EC, Valentino LA, editors. Current and future issues in haemophilia care. Oxford, Wiley-Blackwell 2011: 91-96.
35. Berntorp E, Astermark, Bjorman S, Bnchette VS, Fisher K, Giangarde PLF, et al. Consensus perspectives on prophylactic therapy for haemophilia: summary statement. Haemophilia 2003; 3 (suppl. 1): 1-4.
36. Berntorp F. Prophylactic therapy for haemophilia: early experience. Haemophilia 2003; 9 (suppl. 1): 5-9.
37. Nilsson IM, Hedner U, Ahlberg A. Haemophilia prophylaxis in Sweden. Acta Paediatr Scand 1976; 65: 129-135.

38. Nilsson IM, Berntorp F, Lofqvist T, Pettersson H. Twenty five years' experience of prophylactic treatment in severe hemophilia A and B. *J Intern Med* 1992; 232: 25-32.
39. Shapiro AD. A global view on prophylaxis: possibilities and consequences. *Haemophilia* 2003; 9 (suppl. 1): 10-18.
40. Hay CRM. Prophylaxis in adults with haemophilia. *Haemophilia* 2007; 13 (suppl 2): 10-15.
41. Blachette VS, McCredy M, Achonu C, Abdolell M, Rivards G, Manco-Johnson MJ. A survey of factor prophylaxis in boys with haemophilia followed in North American haemophilia treatment centres. *Haemophilia* 2003; 9 (suppl. 1): 19-26.
42. Van den Berg HM, Fisher K, Mauser-Bunschoten EP, Beek FJA, Roosendaal G, van der Bom JG, Nieuwehuis HK. Long-term outcome of individualized prophylactic treatment of children with severe haemophilia. *Br J Haem* 2001; 112; 561-565.
43. Fischer K, van der Bom JG, Mauser-Bunschoten EP, Roosendaal G, Prejs R, Grobbee DE, van den Berg HM. Changes in treatment strategies for severe haemophilia over the last 3 decades: effects on clotting factor consumption and arthropathy. *Haemophilia*. 2001; 7(5): 446-52.
44. Fisher K, Astermark J, van der Bom JG, Ljung R, Berntrop E, Grobbee DE, van den Berg HM. Prophylactic treatment for severe haemophilia: comparison of an intermediate-dose to high-dose regimen. *Haemophilia* 2002; 8: 753-760.
45. Valentino LA, Hakobyan N. Experimental studies in hemarthrosis, synovitis and arthropathy. In: Rodriguez-Merchan EC, Valentino LA, editors. *Current and future issues in haemophilia care*. Oxford, Wiley-Blackwell 2011: 113-116.
46. Valentino LA. Blood-induced joint disease: the pathophysiology of hemophilic arthropathy. *J Thromb Haem* 2010; 8: 1895-1902.
47. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 1-16.
48. Skoumal M, Kolarz G, Klingler A. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein. *Scand J Rheumatol* 2003; 32: 156-161.
49. Eyre D. Collagen articular cartilage. *Arthritis Res* 2002; 4: 30-35.

50. Brass FL: The molecular basis of platelet activation. In: Hofman et al, editors. Hematology, Basic Principles and Practice, Churchill Livingstone, 4th ed. 2005; 1899-1914.
51. Rodriguez-Merchan EC. Musculoskeletal complications of hemophilia. HSSJ 2010; 6: 37-42.
52. Jansen NWD, Roosendaal G, Lundin B, Heijnen I, Mauser-Bunschoten E, Bijlsma JWJ, et al. The combination of the biomarkers urinary c-terminal telopeptide of type II collagen, serum cartilage oligomeric matrix protein, and serum chondroitin sulfate 846 reflects cartilage damage in hemophilic arthropathy. Arthritis Rheum 2009; 60 (1): 290-298.
53. Kilcoyne RF, Nuss R. Radiological evaluation of hemophilic arthropathy. Sem Thromb Hem 2003; 29(1): 43-48.
54. Beltran-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR, Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. Haemophilia 2005; 11: 326-334.
55. Dargaud Y, Negrier C. Thrombin generation testing in haemophilia comprehensive care centres.
56. Brummel-Ziedins KE, Whelihan MF, Gissel M, Mann KG, Rivard E. Thrombin generation and bleeding in haemophilia A. Haemophilia 2009; 15: 1118-1125.
57. Trossaert 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 Haem 2007; 6: 486-493.
58. Varadi K, Turecek PL, Shwarz HP. Thrombin generation assay and other universal tests for monitoring haemophilia patients. Haemophilia 2004; 10 (suppl. 2): 17-21.
59. Simoni P, Spiezia L, Radu C, Bertini D. New rotation thromboelastography (ROTEM) in thrombotic and haemorrhagic disorders: light and shadows. Hem Meet rep 2008; 2 (1): 6-7).
60. Luddington RJ. Thromboelastography/thromboelastometry. Clin Lab Haem 2005; 27: 81-90.

61. Dehmel H, Werwitzke S, Trummer A, Ganser A, Tiede A. Thromboelastographic monitoring of recombinant factor VIIIa in acquired haemophilia. *Haemophilia* 2008; 14: 736-742.
62. Rugeri L, Levrat A, David JS, Delecroix E, Floccard B, Gros A et al: Diagnosis of early coagulation abnormalities in trauma patients by rotation thromboelastography. *J Thromb Haem* 2006; 5: 289-295.

BIOGRAFIJA

Dr Irena Đunić rođena je 04.11.1967.god. u Čačku. Osnovnu u srednju školu završila je u Loznici. Medicinski fakultet upisala je 1986.god, a diplomirala 1992.god. sa prosečnom ocenom 8.07.

Nakon obavljenog obaveznog lekarskog staža i položenog državnog ispita zaposlila se u Medicinskom Centru, Loznica, gde je dobila specijalizaciju Interne Medicine aprila 1999.godine, a specijalistički ispit položila 14.01.2003.god sa odličnim uspehom. Marta 2003.god. zaposlila se u Institutu za hematologiju, Klinički Centar Srbije, gde radi kao internista-hematolog. Magistarsku tezu pod naslovom „POREMEĆAJI HEMOSTAZE U MONOKLONSKIM GAMAPATIJAMA“ odbranila je 28.03.2007.godine, mentor: Prof.dr Ivo Elezović. Rad iz uže specijalizacije pod nazivom: „SERUMSKA KONCENTRACIJA C-TERMINALNOG TELOPEPTIDA KOLAGENA I KAO MARKERA OSTEOLITIČKIH LEZIJA KOD BOLESNIKA SA MULTIPLIM MIJELOMOM“, odbranila je 28.01.2009.god., mentor: Prof dr Ivo Elezović.

Autor je više stručnih radova objavljenih u referentnim stranim i domaćim časopisima.

Veće naučnih oblasti medicinskih nauka na sednici održanoj 01. februara 2011.godine odobrilo je izradu doktorske disertacije dr Ireni Đunić sa temom: „ZNAČAJ BIOMARKERA U PROCENI OŠTEĆENJA ZGLOBA KOD BOLESNIKA SA HEMOFILIJOM“, a za mentora je određen Prof.dr Ivo Elezović.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Irena Djunić

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ZNAČAJ BIOMARKERA U PROCENI OŠTEĆENJA ZGLOBA KOD BOLESNIKA SA
HEMOFILIJOM

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 04.10.2013.

Irena Djunić

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ZNAČAJ BIOMARKERA U PROCENI OŠTEĆENJA ZGLOBA KOD BOLESNIKA SA
HEMOFILIJOM

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1 Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 04. 10. 2013.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Irena Djunić

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада "ZNAČAJ BIOMARKERA U PROCENI OŠTEĆENJA ZGLOBA KOD BOLESNIKA SA HEMOFILIJOM"

Ментор Prof. dr Ivo Elezović

Потписани IRENA ĐUNIĆ

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 04. 10. 2013.

Irena Djunić