

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Dr Danijela Miković

**Korelacija ukupnog hemostatskog potencijala
i fibrinolize zavisne od trombinom aktiviranog
inhibitora fibrinolize sa težinom krvarenja
i odgovorom na terapiju u hemofiliji A**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL FACULTY

Dr. Danijela Miković

The correlation between overall haemostatic potential and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor dependent fibrinolysis with bleeding severity and treatment response in haemophilia A

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2014

Mentor doktorske disertacije:

Prof. dr Ivo Elezović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor doktorske disertacije:

Doc. dr Jovan Antović, Univerzitetska bolnica i institut Karolinska
Univerziteta u Stokholmu

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

1. Prof. dr Dragana Janić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu –
predsednik komisije
2. Prof. dr Nada Suvajdžić Vuković, Medicinski fakultet Univerziteta u
Beogradu – član komisije
3. NS dr sci. Dragica Radojković, Institut za molekularnu genetiku i
genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu – član komisije

Korelacija ukupnog hemostatskog potencijala i fibrinolize zavisne od trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize sa težinom krvarenja i odgovorom na terapiju u hemofiliji A

REZIME

Uvod. Hemofilija A je urođena koagulopatija koja se karakteriše smanjenim stvaranjem trombina, poremećajem stvaranja i stabilnosti koagulumuma i ubrzanom fibrinolizom. Opisana je varijabilnost u težini kliničke slike i odgovora na terapiju kod bolesnika sa hemofilijom A koji imaju isti nivo FVIII. Mehanizam koji je u osnovi ove varijabilnosti nije razjašnjen, ali se smatra da mogu uticati brojni faktori kompleksnog sistema hemostaze. Određivanje aktivnosti FVIII jednostepenim koagulacijskim testom ili hromogenom testom se standardno koristi za dijagnozu i klasifikaciju hemofilije A kao i za praćenje terapije koncentratom FVIII. Međutim, ovi testovi nisu uvek i u potpunosti pozdani za procenu težine krvarenja i odgovora na terapiju. Zato se ispituje uloga testova globalne hemostaze za ovu namenu u cilju dobijanja dodatnih, klinički korisnih podataka. Trombinom aktivirani inhibitor fibrinolize (TAFI) je molekul koji direktno povezuje procese koagulacije i fibrinolize. Poznato je da ubrzana fibrinoliza doprinosi povećanoj tendenciji krvarenja kod hemofilije A što može biti posledica poremećaja aktivacije TAFI usled smanjenog stvaranja trombina.

Cilj. Cilj studije je bio ispitivanje: a) značaja ukupnog hemostatskog potencijala (UHP) u proceni težine krvarenja i odgovora na terapiju kod bolesnika sa hemofilijom A, b) uticaja faktora trombofilije na ukupni hemostatski potencijal i kliničku težinu hemofilije A i c) nivoa i aktivnosti TAFI kod bolesnika sa hemofilijom A i d) uticaj fibrinolize zavisne od TAFI na težinu krvarenja i odgovor na terapiju.

Materijal i metode. Ova studija je obuhvatila 76 bolesnika sa hemofilijom A i 30 zdravih muškaraca koji su činili kontrolnu grupu. U odnosu na stepen deficita FVIII:C bolesnici su podeljeni u grupe sa teškim (<1 IJ/dl), umerenim (1-5 IJ/dl) i blagim (>5-<40 IJ/dl) oblikom hemofilije A. Na osnovu učestalosti spontanijih krvarenja u zglobove bolesnici su podeljeni na grupu sa klinički teškim (>3 hemartroze godišnje) i klinički blagim

(≤ 3 hemartroze godišnje) oblikom bolesti. Kod 38 bolesnika sa hemofilijom A ispitivanje je izvršeno posle primene koncentrata FVIII u dozi od 1000-2000 IJ za zaustavljanje krvarenja u zglob. Za laboratorijsko ispitivanje FVIII:C je korišćen jednostepeni koagulacijski test. Za ispitivanje globalne hemostaze korišćen je test ukupnog hemostatskog potencijala (UHP). Analizirani je parametar UHP za procenu globalne hemostaze kao i parametri za procenu fibrinolize (vreme lize koaguluma – VLK i VLK dif). Ispitana je i koncentracija proenzima TAFI i procenjen stepen aktivacije TAFI na osnovu koncentracije kompleksa aktivne i inaktivirane forme TAFI (TAFIa/TAFIai) primenom ELISA testova. Ispitana je aktivnost faktora koagulacije i prisustvo faktora trombofilije. U uzorku posle terapije ispitane su vrednosti FVIII:C, TAFI, TAFIa/TAFIai i UHP i upoređene su sa odgovarajućim vrednostima pre terapije koncentratom FVIII.

Rezultati. Vrednosti UHP su bile značajno različite između grupa bolesnika sa teškom (n=56), umerenom (n=9) i blagom (n=11) hemofilijom A. Pokazana je direktna korelacija vrednosti FVIII:C i UHP. Vrednosti UHP su bile značajno niže u klinički teškom obliku hemofilije A (n=56) u odnosu na klinički blag oblik.

Posle terapije izmerene su značajno veće vrednosti FVIII:C i UHP u odnosu na vrednosti pre terapije. Utvrđena je značajna korelacija doze koncentrata FVIII i nivoa FVIII:C posle terapije ali nema korelacije doze i vrednosti UHP posle terapije. Varijabilnost u terapijskom odgovoru između bolesnika koji su primili istu dozu leka je posledica individualnih razlika u farmakokinetici koncentrata i različitog uticaja leka na globalni hemostatski status.

Nema razlike u učestalosti faktora trombofilije između grupe bolesnika sa hemofilijom A i kontrolne grupe. Vrednosti UHP u grupi bolesnika sa hemofilijom A nisu bile značajno različite u odnosu na prisustvo trombofilije. Nije pokazana značajna razlika učestalosti faktora trombofilije u odnosu na kliničku težinu bolesti. Naši rezultati ne ukazuju na protektivni uticaj faktora trombofilije na kliničku težinu hemofilije A.

Fibrinoliza i fibrinoliza zavisna od TAFI su ubrzane u hemofiliji A. Vrednosti VLK i VLK dif su bile značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, vrednosti TAFI i TAFIa/TAFIai su bile značajno veće u grupi bolesnika sa hemofilijom A u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednosti VLK su bile značajno niže u klinički teškom u odnosu na

klinički blag oblik hemofilije A, a nema značajne razlike za vrednosti VLK dif, TAFI i TAFIa/TAFIai. Nema korelacije vrednosti TAFI i TAFIa/TAFIai sa kliničkom težinom hemofilije A.

Primena terapije popravlja fibrinolizu i vrednosti VLK i VLK dif posle terapije su bile značajno veće nego pre terapije. Nema značajne razlike vrednosti TAFI pre i posle terapije, dok su vrednosti TAFIa/TAFIai bile su značajno veće posle terapije što ukazuje na povećanu aktivaciju TAFI. Ove promene zavise od nivoa FVIII:C i UHP i dokazana je korelacije nivoa FVIII:C i UHP sa vrednostima VLK, VLK dif i TAFIa/TAFIai posle terapije. Stepem poboljšanja fibrinolize i aktivacije TAFI ne zavise od doze koncentrata. Nije prisutna korelacije vrednosti TAFI i TAFIa/TAFIai sa odgovorom na terapiju koncentratom FVIII.

Zaključak. Na osnovu iznetih rezultata može se zaključiti da se test UHP može koristiti za procenu stepena težine hemofilije A i odgovora na terapiju koncentratom FVIII. Test UHP nije zamena za određivanje FVIII:C već pruža dodatne, klinički relevantne podatka za procenu kliničke težine i individualnog odgovora na terapiju što može biti od posebnog značaja kod dela bolesnika sa hemofilijom A. Prisustvo faktora trombofilije ne utiče na vrednosti UHP i težinu krvarenja kod bolesnika sa hemofilijom A. Kod bolesnika sa hemofilijom A povećana je koncentracija proenzima TAFI i povećana je aktivacija TAFI. Iako se fibrinoliza značajno razlikuje između klinički teškog i klinički blagog oblika hemofilije A nivo proenzima TAFI i stepen aktivacije TAFI ne koreliraju sa težinom krvarenja. Terapija koncentratom FVIII dovodi do pojačane aktivacije TAFI i korekcije ubrzane fibrinolize ali vrednosti TAFI i TAFIa/TAFIai ne mogu koristiti kao prediktori terapijskog odgovora u hemofiliji A.

Ključne reči: hemofilija, ukupni hemostatski potencijal, TAFI, težina krvarenja, odgovor na terapiju

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Hematologija

The correlation between overall haemostatic potential and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor dependent fibrinolysis with bleeding severity and treatment response in haemophilia A

ABSTRACT

Introduction. Haemophilia A is inherited coagulopathy characterized by impaired thrombin generation, disturbed clot formation and stability, and by increased fibrinolysis. It is observed that patients with similar FVIII levels show different bleeding severity response to treatment. The mechanism behind this variability is not completely clear, but it seems that other factors of the complex haemostatic system may have influence. Determination of factor FVIII activity by one-stage coagulation or chromogenic assay is usually used for diagnosis and classification of haemophilia A as well as for monitoring of treatment with FVIII concentrate. However, those assays do not always and fully accurately reflect bleeding severity and responses to treatments. For that reason the role of global haemostasis assays is investigated in order to obtain additional, clinically useful information. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) represents direct molecular connection between blood coagulation and fibrinolysis. It has been recognized that increased fibrinolysis influences the severity of bleeding in haemophilia A and altered TAFI activation due to decreased thrombin generation might also contribute.

Aim. The aim of the study was to investigate: a) the importance of overall haemostatic potential (OHP) in evaluation of bleeding severity and response to treatment in patients with haemophilia A, b) the influence of thrombophilia on overall haemostatic potential and clinical severity in haemophilia A, c) TAFI level and activity in haemophilia A and d) the influence of TAFI dependent fibrinolysis on bleeding severity and treatment response.

Material and methods. Seventy-six patients with haemophilia A and 30 healthy males representing a control group were included in the study. Depending on FVIII:C levels haemophilia A patients were grouped as severe (< 1 IJ/dl), moderate (1-5 IJ/dl) or mild (>1-<40 IJ/dl). According to the number of spontaneous haemarthroses patients were grouped as clinically severe (>3 haemarthroses the per year) or clinically mild (\leq 3

hemartroze godišnje). In 38 patients with haemophilia A investigation was also performed after on-demand treatment of haemarthrosis with 1000-2000 IU FVIII concentrate. Laboratory investigation of FVIII:C was performed by one-stage clotting assay. Global haemostasis was assessed by overall haemostatic potential (OHP) assay. Parameters of global haemostasis (OHP) and fibrinolysis (clot lysis time – CLT and CLT dif) were analyzed. Concentration of proenzyme TAFI and concentration of complex of active and inactive form of the TAFI (TAFIa/TAFIai) was determined using ELISA method. Laboratory investigation of coagulation factor activity and presence of thrombophilia risk factors were performed. In the posttreatment samples FVIII:C, TAFI, TAFIa/TAFIai and OHP levels were determined and compared with corresponding pretreatment levels.

Results. OHP levels differed significantly among patients with severe (n=56), moderate (n=9) and mild (n=11) haemophilia A. Significant correlations between FVIII levels and OHP ($r=0,78$, $p<0,0001$) was observed. OHP level was significantly lower ($p<0,0001$) in patients with clinically severe (n=56) and clinically mild (n=20) form of haemophilia A.

Significantly higher posttreatment levels of FVIII:C ($p<0,0001$) and OHP ($p<0,0001$) were measured when compared with pretreatment values. Correlation was observed between doses of FVIII concentrate and posttreatment FVIII:C level ($r=0,54$; $p<0,0001$), but there was no correlation between doses and post-treatment OHP levels. Variable individual response to treatment even in patient who received the same FVIII concentrate dose is the result of individual varying pharmacokinetic and varying influence on global haemostasis.

Frequency of thrombophilia was not significantly different between haemophilia A patients and control. OHP levels did not differ in the groups of haemophilia A patients with and without thrombophilia. There was also no difference in the frequency of thrombophilia in relation to bleeding severity in haemophilia A patients. Our results did not indicate protective effect of thrombophilia factors on clinical severity of haemophilia A.

Fibrinolysis and TAFI dependent fibrinolysis were increased in haemophilia A. Significantly lower level of CLT ($p<0,0001$) and CLT dif ($p<0,0001$) were observed when compared with the control. In haemophilia A levels of TAFI ($p<0,0001$) and TAFIa/TAFIai ($p<0,0001$) were significantly higher than in control. CLT levels were significantly lower

($p < 0,01$) in patients with clinically severe compared with clinically mild haemophilia A, but there was no difference for CLT dif, TAFI and TAFIa/TAFIai levels. There was no correlation between TAFI and TAFIa/TAFIai values and clinical severity of haemophilia A. Treatment improves fibrinolysis and significant increase of VLK and VLK dif levels was observed after therapy. TAFI levels were not different before and after treatment while TAFIa/TAFIai levels were significantly higher after treatment and indicated increased TAFI activation. Those changes are dependent on FVIII:C and OHP levels since correlation of FVIII:C and OHP with CLT, CLT dif and TAFIa/TAFIai values was observed after therapy. Fibrinolysis improvement and increased TAFI activation were not dose dependent. There was no correlation between TAFI and TAFIa/TAFIai values and response to treatment.

Conclusion. Based on presented results it may be suggested that OHP assay may be useful in the evaluation of bleeding severity in haemophilia A and the response to therapy with FVIII concentrate. However, determination of OHP cannot replace the FVIII:C measurement, but OHP assay may be an additional tool for the assessment of bleeding severity and monitoring of treatment which could be of particular benefit for some patients. The influence of thrombophilia factors on OHP levels and bleeding severity in patients with haemophilia A was not observed. TAFI level is higher in patients with haemophilia A. Higher TAFIa/TAFIai level indicates increase of TAFI activation in patients with haemophilia A. Despite significant difference in fibrinolysis between clinically severe and clinically mild haemophilia A, TAFI and TAFIa/TAFIai levels do not correlate with bleeding severity. Treatment with FVIII concentrate increases TAFI activation and improves fibrinolysis but TAFI and TAFIa/TAFIai levels can not be used as a predictor of response to therapy in patients with haemophilia A.

Key words: haemophilia, overall haemostatic potential, TAFI, bleeding severity, response to treatment

Science field: Medicine

Specific science field: Haematology

SADRŽAJ

UVOD	1
Hemostaza	1
Krvni sudovi	1
Trombociti	2
Sistem koagulacije	3
Ćelijski model koagulacije	5
Uloga trombina	8
Inhibitori koagulacije	9
Sistem fibrinolize	10
Trombinom aktivirani inhibitor fibrinolize	11
Hemofilija	13
Etiologija	14
Nasleđivanje	14
Patofiziologija	15
Klinička slika	16
Procena težine kliničke slike	17
Dijagnoza	18
Terapija	19
Procena odgovora na terapiju	22
Trombofilija u hemofiliji	23
Testovi za ispitivanje hemostaze	24
Skrining testovi	24
Specijalni testovi	25
Ispitivanje faktora koagulacije	25
Ispitivanje trombofilije	26
Ispitivanje TAFI	27
Globalni testovi hemostaze	28

Test za merenje ukupnog hemostatskog potencijala	32
Globalni testovi hemostaze u hemofiliji	33
CILJ	35
MATERIJAL I METODE	36
Ispitanici	36
Bolesnici sa hemofilijom A	36
Klasifikacija prema težini oboljenja	37
Terapija koncentratom FVIII	37
Kontrolna grupa	37
Uzimanje uzoraka krvi	38
Metode ispitivanja	39
Ispitivanje ukupnog hemostatskog potencijala	39
Ispitivanje TAFI	41
Ispitivanje proenzima TAFI	41
Ispitivanje kompleksa aktivne i inaktivne forme TAFI	42
Testovi koagulacije	43
Ispitivanje aktivnosti faktora VIII	44
Ispitivanje inhibitora faktora VIII	44
Ispitivanje aktivnosti faktora IX, XI i XII	45
Ispitivanje aktivnosti faktora II, V, VII i X	45
Ispitivanje koncentracije fibrinogena	46
Ispitivanje aktivnosti von Willebrandovog faktora	46
Ispitivanje koncentracije antigena von Willebrandovog faktora	47
Ispitivanje aktivnosti antitrombina	47
Ispitivanje aktivnosti proteina C	48
Ispitivanje aktivnosti proteina S	48
Ispitivanje rezistencije na aktivirani protein C	49

Ispitivanje lupus antikoagulansa	49
Molekularno genetički testovi	50
Ispitivanje mutacija FV Leiden, FII G20210A I MTHFR C677T	50
Statistička obrada podataka	51
REZULTATI	53
Raspodela bolesnika sa hemofilijom A prema stepenu deficita FVIII:C	53
Rezultati ispitivanja FVIII:C i UHP u grupi bolesnika sa hemofilijom A i kontrolnoj grupi	53
Raspodela bolesnika sa hemofilijom A prema kliničkoj težini bolesti	57
Rezultati ispitivanja FVIII:C i UHP u proceni kliničke težine hemofilije A	57
Rezultati ispitivanja FVIII:C i UHP u proceni odgovora na terapiju	59
Rezultati ispitivanja trombofilije	66
Učestalost faktora trombofilije u grupi bolesnika sa hemofilijom A i kontrolnoj grupi	66
Uticaj faktora trombofilije na UHP u grupi bolesnika sa hemofilijom A i kontrolnoj grupi	67
Uticaj faktora trombofilije na kliničku težinu hemofilije A	70
Rezultati ispitivanja fibrinolize	72
Rezultati ispitivanja VLK i TAFI u grupi bolesnika sa hemofilijom A i kontrolnoj grupi	72
Rezultati ispitivanja VLK i TAFI u proceni kliničke težine hemofilije A	75
Rezultati ispitivanja VLK i TAFI u proceni odgovora na terapiju	79
DISKUSIJA	88
ZAKLJUČAK	112
LITERATURA	115

LISTA SKRAĆENICA

NO	azot monoksid
PGI ₂	prostaciklin
PAF	faktor stimulacije trombocita
TF	tkivni faktor
TFPI	inhibitor tkivnog puta
vWF	von Willebrandov faktor
GP	glikoprotein
ADP	adenozin difosfat
TXA ₂	tromboksan A ₂
Ca ²⁺	joni kalcijuma
FII-XIII	faktori koagulacije II-XIII
FIIa-XIIIa	aktivirani faktori koagulacije II-XIII
VMK	visoko molekularni kininogen
PT	protrombinsko vreme
APTT	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme
AT	antitrombin
TM	trombomodulin
PC	protein C
PS	protein S
APC	aktivirani protein C
Fbg	fibrinogen
Fb mon	fibrin monomeri
Fb pol	fibrin polimeri
FDP	fibrin degradacioni produkti
t-PA	tkivni aktivator plazminogena
PAI-1	inhibitor aktivatora plazminogena 1
PI	inhibitori plazmina
TAFI	trombinom aktivirani inhibitor fibrinolize
EPCR	endotelijalni protein C receptor
u-PA	urokinaza
u-PAR	specifični membranski receptor za urokinazu
PAI-2	inhibitor aktivatora plazminogena 2
TAFIa	aktivirani TAFI
TAFIai	inaktivirani TAFI
Arg	arginin
Lys	lizin
FVIII:C	koagulacijska aktivnost FVIII
BJ	Bethesda jedinica
FVL	faktor V Leiden
MTHFR	metilen tetrahidrofolat reduktaza
TT	trombinsko vreme

rFVIIa	rekombinantni aktivirani faktor VII
aPCC	aktivirani protrombin kompleks koncentrat
vWF:Akt	aktivnost von Willebrandovog faktora
vWF:Ag	koncentracija antigena von Willebrandovog faktora
LA	lupus antikoagulans
Thr	treonin
Ile	izoleucin
Ala	alanin
TAFIa/TAFIai	kompleks aktivne i inaktivne forme TAFI
TGT	test generacije trombina
CAT	kalibrisana automatizovana trombografija
ETP	endogeni trombin potencijal
TEG [®]	automatizovana tromboelastografija
ROTEM [®]	rotaciona tromboelastometrija
t_lag	vreme do početka stvaranja trombina
t_max	vreme do dostizanja maksimalnog nivoa trombina
C_max	maksimalan nivo trombina
R	vreme koagulacije
k	brzina koagulacije
α	kinetika polimerizacije fibrina
MA	maksimalna amplituda
CL	vreme lize koaguluma
CT	vreme koagulacije
CFT	vreme formiranja koaguluma
MCF	maksimalna čvrstina koaguluma
ML	maksimalna liza koaguluma
AKK	analiza krive koaguluma
UHP	ukupni hemostatski potencijal
UKP	ukupni koagulacijski potencijal
UFP	ukupni fibrinolitiki potencijal
VLK	vreme lize koaguluma
VLK dif	skraćenje vremena lize koaguluma posle dodavanja specifičnog inhibitora TAFI
TMB	tetra metil benzidin
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
PCR	reakcija lančanog umnožavanja DNK (<i>polimerase chain reaction</i>)
RFLP	razlika u dužini restrikcionih fragmenata (<i>restriction fragment length polymorphisms</i>)
X	aritmetička sredina
Med	medijana
Min-Max	interval varijacije
SD	standardna devijacija
SE	standardna greška aritmetičke sredine
vs	versus

UVOD

HEMOSTAZA

Hemostaza je jedan od najznačajnijih sistema za održavanje homeostaze ljudskog organizma, koji ima dve primarne funkcije: da obezbedi tečno stanje krvi u cirkulaciji i da zaustavi krvarenje na mestu oštećenja krvnog suda. Sistem hemostaze takođe održava delikatnu ravnotežu između pojave krvarenja i tromboze, što zahteva da bude vrlo precizno regulisan. Normalna hemostaza zavisi od kompleksne interakcije sledećih komponenta: krvni sudovi, trombociti, sistem koagulacije i sistem fibrinolize (1).

Krvni sudovi

Normalna građa zida krvnih sudova je prirodna barijera koja sprečava izlazak krvi iz krvnih sudova. Vaskularni endotel utiče na funkcionisanje svih komponenta hemostaze, u fiziološkim uslovima i u uslovima povrede zida krvnog suda (2).

U fiziološkim uslovima endotel je tromboresistentan, ne reaguje sa trombocitima niti sa faktorima koagulacije i obezbeđuje fiziološku barijeru između trombocita i trombogenih struktura subendotela. Endotelske ćelije negativnim naelektrisanjem odbijaju trombocite, a takođe sintetišu azot monoksid (NO) i prostaciklin (PGI₂) koji su snažni inhibitori adhezije i agregacije trombocita. NO i PGI₂ deluju vazodilatatorno i tako dovode do povećanja protoka krvi i smanjenja nagomilavanja trombocita i faktora koagulacije (2, 3).

Usled povrede dolazi do refleksnog grča mišića zida krvnog suda i vazokonstrikcije, što sprečava oticanje krvi i dovodi do nakupljanja trombocita i faktora koagulacije na mestu povrede. Vazokonstrikcija nastaje usled refleksnog grča mišića zida krvnog suda i delovanjem vazokonstriktornih supstanci, među kojima je veoma značajan endotelin-1 koji se sintetišu u endotelu (1). Posle povrede trombociti se vezuju za subendotel putem adhezivnih proteina koji se takođe sintetišu u endotelu. Endotelske ćelije ispoljavaju protrombotička svojstva usled aktivacije medijatorima iz oštećenog tkiva kada se oslobađa

faktor stimulacije trombocita (PAF) i eksprimira tkivni faktor (TF). Antifibrinolitički efekat je rezultat pojačane sekrecije inhibitora aktivatora plazminogena. Takođe, endotel doprinosi ograničavanju stvaranja ugruška na mestu povrede. Endotelske ćelije sintetisu aktivatore plazminogena i tako ispoljavaju profibrinolitički efekat (2). Trombomodulin na membrani endotelskih ćelija je kofaktor trombina u aktivaciji inhibitora koagulacije proteina C, a endotelske ćelije stimulišu antikoagulantno delovanje antitrombina i inhibitora tkivnog puta (TFPI) koji se koncentrišu na površini endotela vezivanjem za heparan sulfat i druge glikozaminoglikane (4, 5).

Trombociti

Trombociti su male ćelije, promera 2-3 μm , bez jedra, diskoidnog oblika koje se u cirkulaciji nalaze u neaktivnom obliku, pojedinačni i neadherirani (6). Posle povrede dolazi do adhezije trombocita na subendotel putem adhezivnih proteina, od kojih su najznačajniji von Willebrandov faktor (vWF) i kolagen, koji se vezuju za receptore na glikoproteinima (GP) membrane trombocita. Inicijalni kontakt se ostvaruje vezivanjem vWF i receptora na GPIb-V-IX, koji ne vezuje vWF iz plazme već samo vWF vezan za kolagen subendotela. Ova interakcija omogućava vezivanje kolagena za receptor na GPVI. Zajedničkim delovanjem kompleksa vWF/GPIb-V-IX i kolagen/GPVI započinje aktivacija trombocita. Aktivacija dovodi do ekspresije GPIIb/IIIa na membrani trombocita, koji vezuje vWF, fibronektin i laminin što dovodi do snažne adhezije trombocita (7).

Dalja aktivacija trombocita se odvija delovanjem agonista trombocita od kojih su najznačajniji adenzin difosfat (ADP) koji se odlobađa u procesu sekrecije, tromboksan A2 (TXA2) koji se sintetise u aktiviranim trombocitima i trombin koji nastaje u procesu koagulacije. Agonisti deluju putem receptora koji su na membrani trombocita povezani sa G (Gq, Gi, G13) proteinima što pokreće intracelularne signale koji stimulišu oslobađanje jona kalcijuma (Ca^{2+}) iz intracelularnih depoa i povećanja nivoa Ca^{2+} u citoplazmi. To dovodi do promene oblika trombocita, sekrecije sadržaja trombocitnih granula, agregacije trombocita i stvaranja trombocitnog ugruška (1, 8).

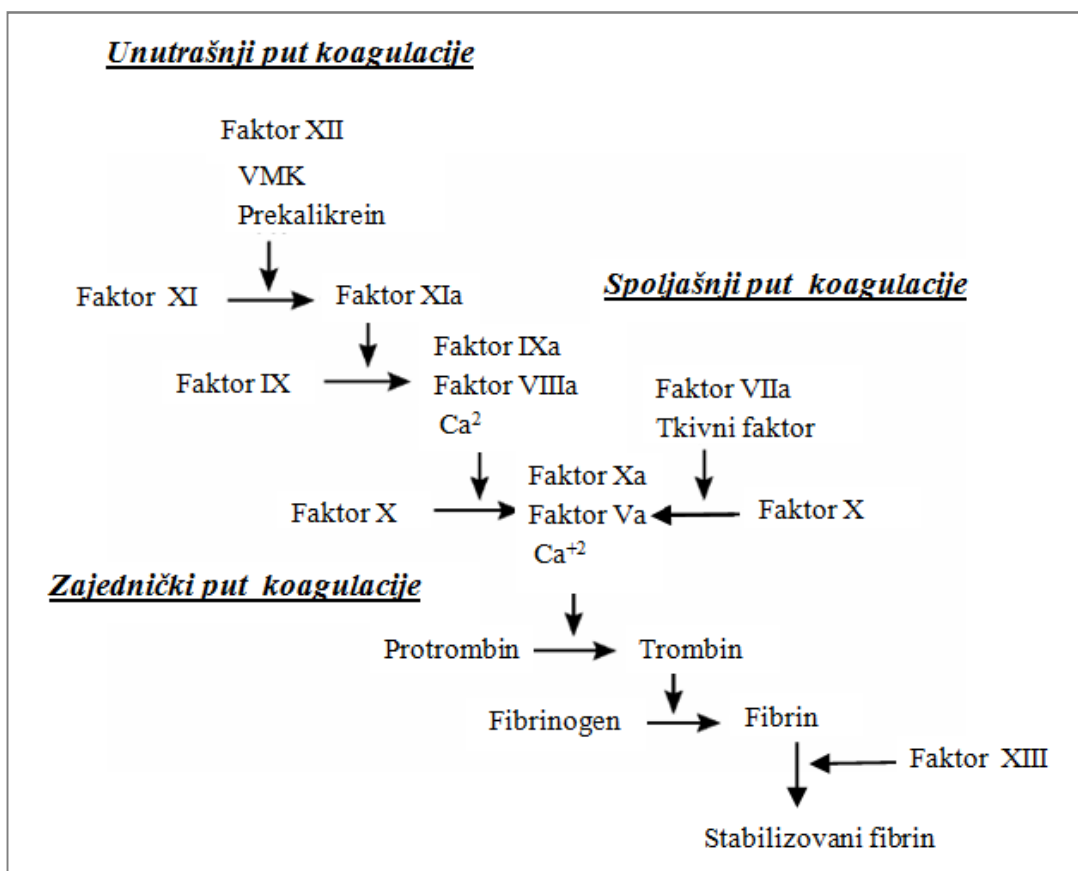
Usled reorganizacije citoskeleta trombociti postaju sferični, na membrani se formiraju pseudopode što doprinosi adheziji i agregaciji. Pri tome, delovanjem kontraktilnih sila stimuliše se sekrecija biološki aktivnih molekula i pojačava vazokonstrikcija, aktivacija trombocita i proces koagulacije (5). α -granule trombocita sadrže vWF, fibrinogen i faktor (F) V koagulacije, a guste granula sadrže ADP, Ca^{2+} i serotonin koji doprinose aktivaciji trombocita (9). Za razliku od adhezije, agregacija se odvija samo na prethodno aktiviranim trombocitima kada je došlo do promena konformacije receptora na GPIIb/IIIa. Vezivanjem fibinogena i vWF za receptore na GPIIb/IIIa dolazi do međusobnog povezivanja aktiviranih trombocita iz cirkulacije i do stvaranja trombocitnog ugruška (10).

Aktivacija trombocita i koagulacije su komplementarni procesi (11). Trombin je snažan aktivator trombocita, a na membrani aktiviranih trombocita nastaju enzimski kompleksi koji ubrzavaju proces koagulacije i tako se stabilizuje trombocitni ugrušak.

Sistem koagulacije

Za zaustavljanje krvarenja neophodna je aktivacija sistema koagulacije na mestu povrede krvnog suda i stvaranje fibrina koji stabilizuje trombocitni ugrušak (1). Klasična teorija koagulacije, koju je opisao Paul Morawitz 1905. godine, podrazumevala je interakciju četiri faktora: protrombina, Ca^{2+} i fibrinogena u plazmi i trombokinaze na membrani trombocita i leukocita (12). Tokom 20. veka otkriveni su novi faktori koagulacije, a 1964. godine dve nezavisne grupe naučnika su opisale novi model koagulacije, model "vodopada" kako su ga nazvali Davie i Ratnoff (13) i model "kaskade" kako ga je nazvao Macfarlane (14). Oba modela opisuju proces koagulacije kao seriju proteolitičkih reakcija gde prethodno aktivirani faktor koagulacije aktivira sledeći u nizu i tako dolazi do stvaranja trombina. Macfarlane je za obeležavanje faktora koagulacije koristio Romansku numeričku nomenklaturu preporučenu od strane Internacionalnog komiteta za nomenklaturu faktora koagulacije, koja se i sada koristi. Termin kaskadni model koagulacije se zadržao do danas, a model je bio aktuelan sve do početka devedesetih godina 20. veka. Originalni kaskadni model je modifikovan u skladu sa novim saznanjima (shema 1). Istraživači iz Oksforda 1955. godine su opisali dva puta aktivacije sistema

koagulacije, unutrašnji i spoljašnji, koji se spajaju u zajedničkom putu. Takođe, zapaženo je da neki faktori koagulacije nemaju enzimsku aktivnost već deluju kao kofaktori (15).



Shema 1. Kaskadni model koagulacije krvi (<http://mp.bmjournals.com/cgi/content-nw/full/55/2/127/F1>)

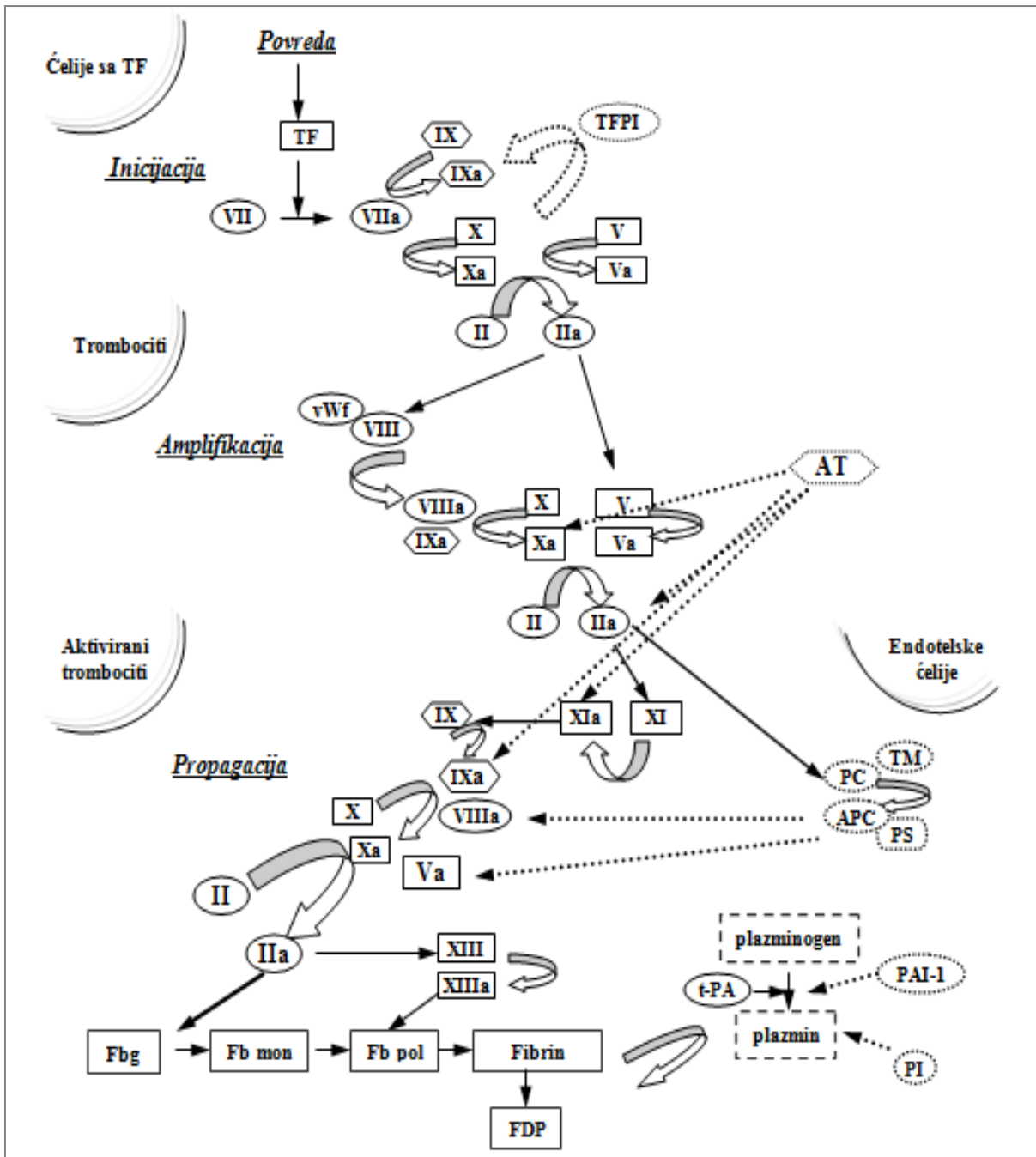
Unutrašnji put koagulacije započinje na mestu povrede pretvaranjem FXII u aktivirani FXII (FXIIa) u kontaktu sa kolagenom i drugim negativno naelektisanim površinama. FXIIa u prisustvu kofaktora visoko molekularnog kininogen (VMK) i kalikreina aktivira FXI u FXIa, koji aktivira FIX u FIXa. FIXa u prisustvu kofaktora FVIIIa aktivira FX u FXa. *Spoljašnji put koagulacije* započinje izlaganjem TF na mestu povrede i vezivanjem sa FVII ili FVIIa. Kompleks FVIIa-TF aktivira FX u FXa. Delovanjem FXa, nastalog u unutrašnjim i spoljašnjim putu, pokreće se *zajednički put koagulacije*. FXa u prisustvu kofaktora FVa pretvara protrombin u trombin. Delovanjem trombina iz fibrinogena nastaje fibrin, a iz FXIII nastaje FXIIIa koji zatim stabilizuje fibrinski ugrušak (1, 15).

Kaskadni model je bio prekretnica u razumevanju procesa koagulacije ali je uočeno da ovaj model ne može u potpunosti da objasni kompleksne procese hemostaze *in vivo*. On se još uvek koristi da se na jednostavan način objasni primena skrining testova koagulacije. Tako se testom protrombinskog vremena (PT) meri aktivnost spoljašnjeg puta koagulacije, a unutrašnji put koagulacije se procenjuje testom aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTT). Oba testa procenjuju aktivnost zajedničkog puta koagulacije (16).

Nekoliko ključnih saznanja je dovelo do revizije kaskadnog modela koagulacije. Zapaženo je da je kompleks FVIIa-TF primarni fiziološki aktivator sistema koagulacije *in vivo* kao i da kompleks FVIIa-TF aktivira ne samo FX, već i FIX (17). Opisan je TFPI koji inhibira kompleks FVIIa-TF pre nego što se stvori dovoljno FXa za hemostazu (18). Zapažanje da trombin može direktno aktivirati FXI na membrani aktiviranih trombocita (19) ukazalo je da je uloga unutrašnjeg puta u aktivaciji koagulacije *in vivo* zanemarljiva, a da je trombin glavni fiziološki aktivator FXI. Ovo je u skladu sa kliničkim opažanjem da je deficit FXI praćen hemoragijskim sindromom, a da deficiti FXII, VMK i prekalikreina nisu. Ova saznanja su ukazala da je proces koagulacije znatno kompleksniji, da su putevi aktivacije blisko povezani i međusobno zavisni, a čitav sistem je regulisan nizom interakcija faktora koagulacije (20). Godine 2001. predložen je revidirani model koagulacije gde specifični receptori na ćelijskim membranama, putem lokalizacije reakcija faktora koagulacije, imaju dominantnu ulogu u regulaciji procesa koagulacije (21).

Ćelijski model koagulacije

Ćelijski model koagulacije podrazumeva tri faze koje se međusobno prepliću (21): 1) inicijalnu fazu koja se odvija usled ekspresije TF, 2) fazu amplifikacije u kojoj dolazi do aktivacije trombocita i faktora koagulacije i 3) fazu propagacije gde se delovanjem kompleksa aktiviranih faktora koagulacije stvaraju velike količine trombina (shema 2).



Shema 2. Ćelijski model koagulacije i fibrinolize

—► aktivacija ili stimulacija ► inhibicija ili degradacija

(reprodukovano uz saglasnost Aleksandre Antović. Doktorska teza, Karolinska press 2004.)

Inicijalna faza. Proces koagulacije započinje na ćelijama koje eksprimiraju TF, koje se u fiziološkim uslovima nalaze ekstravaskularno, a posle povrede bivaju izložene cirkulišućoj krvi. TF je transmembranski protein, receptor i kofaktor za FVII, čije delovanje počinje vezivanjem sa FVIIa koji predstavlja ~1-2% od ukupne količine FVII u plazmi. TF takođe vezuje i FVII koji zatim podleže aktivaciji delovanjem koagulacijskih i/ili nekoagulacijskih proteaza (17). Kompleks FVIIa-TF aktivira male količine FX i FIX, a nastali FXa i FIXa imaju različitu ulogu u procesu koagulacije (22). Aktivnost FXa je vezana za površinu ćelija koje eksprimiraju TF jer FXa u plazmi biva neposredno neutralisan delovanjem inhibitora TFPI i antitrombina. FXa na membrani ćelija aktivira FV iz plazme i vezuje ga, stvarajući kompleks protrombinaze koji dovodi do nastanka malih količina trombina. Ova inicijalna količina trombina nije dovoljna za formiranje stabilnog fibrinskog ugruška, ali ima značajnu ulogu u fazi amplifikacije. Nasuprot tome, FIXa nema značajnu ulogu u inicijalnoj fazi. FIXa difunduje na susedne aktivirane trombocite, jer TFPI ne inhibira FIXa a antitrombin ga sporo inhibira. FIXa se vezuje za receptor na membrani trombocita gde ispoljava svoju funkciju u daljem toku procesa koagulacije (21).

Faza amplifikacije se odvija na membrani trombocita gde delovanjem trombina nastalog u inicijalnoj fazi dolazi do aktivacije trombocita i sistema koagulacije. Vezivanje za adhezivne proteine subendotela lokalizuje trombocite u blizini ćelija nosilaca TF i omogućava njihovu aktivaciju delovanjem trombina (7). Trombin takođe aktivira FV, FVIII i FXI i tako pokreće mehanizme koji dovode do amplifikacije (23). Iz α -granula aktiviranih trombocita se oslobađa FV, a delovanjem FXa i trombina nastaje FVa koji ostaje vezan za membranu trombocita. Kompleks FVIII-vWF se vezuje za trombocite, trombin odvajava vWF iz kompleksa i aktivira FVIII u FVIIIa koji ostaje vezan za površinu trombocita. Trombin aktivira FXI u FXIa koji se vezuje za receptor na membrani trombocita (21).

Faza propagacije se odvija na membrani aktiviranih trombocita gde prisustvo specifičnih fosfolipida omogućava efikasno formiranje enzimskih kompleksa koji ubrzavaju proces koagulacije i dovode do stvaranja velikih količina trombina (11). Na membrani trombocita nalaze se receptori za FIXa, FXa i FXIa. FXIa se vezuje za površinu trombocita i aktivira dodatne količine FIX. FIXa, nastao u inicijalnoj fazi i delovanjem FXIa, se na trombocitima povezuje sa kofaktorom FVIIIa i stvara kompleks tenaze koji je

glavni aktivator FX. FXa se vezuje sa kofaktorom FVa u kompleks protrombinaze i pretvara protrombin u trombin. Trombin cepa molekule fibrinogena, odvajajući fibrinopeptide A i B i tako nastaju fibrinski monomeri čijom polimerizacijom nastaje fibrin. Trombin omogućava stabilizaciju fibrinskog ugruška aktivacijom FXIII u FXIIIa koji dovodi do povezivanja fibrinskih vlakana kao i aktivacijom trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize (TAFI) što sprečava prevremenu razgradnju ugruška (21, 23).

Ćelijski model je omogućio razumevanje nekih aspekata hemostaze za koje kaskadni model nema adekvatno objašnjenje. Ovaj model ukazuje da su oba puta aktivacije neophodna u procesu koagulacije ali da imaju različite uloge koje se odvijaju na specifičnim ćelijama. Takođe, ovaj model objašnjava zašto kod hemofilije aktivacija FX delovanjem FVIIa-TF ne može kompenzovati izostanak aktivacije FX delovanjem FIXa-FVIIIa na trombocitima. Sa jedne strane TFPI inhibira kompleks FVIIa-TF pre nego što se stvori dovoljno FXa za hemostazu, a sa druge strane TFPI i antitrombin inhibiraju FXa u plazmi i onemogućavaju njegov prelazak sa ćelija nosilaca TF na aktivirane trombocite. Međutim, ćelijski model ne objašnjava kako kod deficita FVII može doći do stvaranja fibrina. Moguće objašnjenje je da ovaj model prikazuje najefikasniji put stvaranja trombina, ali da postoji alternativni put koji može delom kompenzovati deficit FVII (24).

Uloga trombina

Trombin je centralni enzim sistema koagulacije i svoje delovanje ostvaruje nizom mehanizama pozitivne i negativne povratne sprege. Za razliku od drugih faktora koagulacije trombin difunduje kroz ugrušak, dolazi u kontakt sa brojnim supstratima na površini ćelija ili u intersticijalnom prostoru i ostvaruje kompleksnu biološku ulogu (23).

Trombin je snažan agonist trombocita i snažan aktivator sistema koagulacije. Jedan od mehanizama pozitivne povratne sprege indukovani trombinom i esencijalan za hemostazu je stvaranje FVa i FVIIIa, kofaktora u enzimskim kompleksima na membrani aktiviranih trombocita, koji ~300 000 puta ubrzavaju proces koagulacije. Trombin je jedinstven među faktorima koagulacije jer usled vezivanja za trombomodulin menja konformaciju, gubi prokoagulantna i stiče antikoagulantna svojstva. Trombin tada aktivira protein C koji

inaktivira FVa i FVIIIa i tako se ostvaruje mehanizam negativne povratne sprege kojim trombin kontroliše sopstveno stvaranje (4,11).

Trombin ima centralnu ulogu u stvaranju i očuvanju stabilnosti koaguluma. Za stvaranje fibrina dovoljne su male količine trombina, <5% od ukupne količine stvorenog trombina u procesu koagulacije. Oko ~95% trombina nastaje posle stvaranja fibrina što se ostvaruje delovanjem FXIa unutar koaguluma (25). Smatra se da trombin nastao unutar koaguluma ima ulogu u održavanju stabilnosti ugruška aktivacijom FXIII i TAFI. S obzirom na lokalizaciju, aktivacija TAFI inhibira plazmin unutar koaguluma što je posebno značajno jer plazmin formiran unutar ugruška ima najveći uticaj na lizu koaguluma (26).

Trombin takođe učestvuje u procesu zarastanja rane i to direktno, delujući kao snažan faktor hemotakse i mitogeneze na glatke mišićne ćelije, fibroblaste, makrofage i endotelne ćelije i indirektno putem aktivacije trombocita i sekrecije faktora rasta (1).

Inhibitori koagulacije

Sistem koagulacije ima veliki biološki potencijal i neophodna je precizna regulacija da bi se proces odvijao samo na mestu oštećenja krvnog suda. Efikasna regulacija se ostvaruje delovanjem inhibitora koagulacije i sistema fibrinolize (shema 2). Inhibitori koagulacije inaktiviraju aktivirane faktore koagulacije koji dospevaju u plazmu ili na membranu neoštećenih endotelskih ćelija. Delovanjem čitavog niza inhibitora od kojih su najznačajniji antitrombin, protein C i TFPI sprečava se sistemska aktivacija koagulacije (1).

Antitrombin direktno inhibira aktivirane faktore koagulacije sa enzimskim delovanjem, a posebno trombin, FXa i FIXa. Inhibicija se odvija stvaranjem stabilnih kompleksa enzima sa antitrombinom koji se eliminišu delovanjem ćelija retikuloendotelskog sistema. Antitrombin je glavni inhibitor trombina jer uklanja najveći deo trombina stvorenog u procesu hemostaze. Inhibiciji trombina i drugih aktiviranih faktora koagulacije doprinose i heparin kofaktor II, inhibitor proteina C i proteaza nexin I (5).

Kontrola tkivnog puta aktivacije koagulacije se odvija delovanjem TFPI koji prvo vezuje i inhibira FXa, a zatim i kompleks FVIIa-TF i tako inhibira aktivaciju FX (27).

Najznačajniji mehanizam negativne povratne sprege u procesu koagulacije se odvija delovanjem proteina C. Trombin koji difunduje do neoštećenih endotelskih ćelija vezuje se za trombomodulin, membranski glikoprotein endotelskih ćelija (21). Komplex trombin-trombomodulin aktivira protein C, a aktivacija je efikasnija kada je protein C lokalizovan na membrani endotelskih ćelija vezivanjem za endotelijalni protein C receptor (EPCR). Aktivirani protein C, u prisustvu kofaktora proteina S, inaktivira FVa i FVIIIa i tako efikasno inhibira aktivnost sistema koagulacije. Takođe, kompleks trombin-trombomodulin aktivira TAFI i tako utiče inhibitorno i na proces fibrinolize (4).

Sistem fibrinolize

Za normalno funkcionisanje procesa hemostaze neophodno je održavanje delikatne ravnoteže između sistema koagulacije i fibrinolize. Fibrinoliza omogućava uklanjanje depozita fibrina iz cirkulacije i tako obezbeđuje tečno stanje krvi, a posle povrede ograničava formiranje ugruška, omogućava njegovo uklanjanje i rekanalizaciju krvnog suda. Sistem fibrinolize (shema 2) se sastoji od proenzima plazminogena iz koga nastaje centralni enzim fibrinolize plazmin, aktivatora plazminogena i inhibitora fibrinolize (1).

Među aktivatorima plazminogena su najvažniji tkivni aktivator plazminogena (t-PA) koji se prevashodno sintetiše u endotelskim ćelijama i urokinaza (u-PA) koja se sintetiše u više vrsta ćelija između ostalih u epiteljskim ćelijama i fibroblastima. Stvaranje fibrina pokreće inicijalnu fazu fibrinolize gde delovanjem t-PA oslobođenog iz endotelskih ćelija na plazminogen nastaju ograničene količine enzima plazmina. Ove količine plazmina u daljem toku stimulišu sopstveno stvaranje ograničenom proteolizom fibrina i stvaranjem C-terminalnih ostataka lizina koja su vezna mesta za plazminogen i t-PA (shema 3). Stvaranjem kompleksa plazminogena i t-PA na molekulima fibrina povećava se efikasnost stvaranja plazmina ~1000 puta. Takođe, plazmin ograničenom proteolizom transformiše nativni Glu-plazminogen u Lys-plazminogen koji je bolji supstrat za aktivaciju delovanjem t-PA. Na ovaj način fibrinoliza iz inicijalne faze prelazi u fazu propagacije. Plazmin zatim razlaže fibrin i nastaju fibrin degradacioni produkti koji mogu delovati inhibitorno na funkciju trombocita i ispoljiti imunomodulatorne efekte (28, 29, 30).

Plazmin koji nastaje delovanjem t-PA je primarno uključen u razgradnju fibrina u cirkulaciji. Pored toga, plazmin se stvara i na površini endotelskih ćelija, monocita, makrofaga i neutrofila delovanjem u-PA vezanog za specifične membranske receptore (u-PAR). Plazmin koji nastaje na membrani ćelija aktivira enzime metaloproteinaze koji razgrađuju komponente međucelijskog prostora i aktiviraju faktore rasta koji dovode do migracije i proliferacije ćelija i tako učestvuju u procesu zarastanja rane (31).

Aktivnost sistema fibrinolize je regulisana inhibitorima, a najznačajniji su inhibitori aktivatora plazminogena (PAI-1 i PAI-2) i inhibitori plazmina (α 2-antiplazmin, α 2-makroglobulin). Inhibicija t-PA i u-PA se odvija delovanjem PAI-1, i u manjoj meri delovanjem PAI-2. α 2-antiplazmin je primarni inhibitor plazmina, a u manjem stepenu inhibira ga i α 2-makroglobulin. Inhibicija plazmina u cirkulaciji je brza, a plazmina vezanog za fibrin ili membrane je spora i tako se delovanje plazmina ograničava na mesto povrede (29, 30).

Trombinom aktivirani inhibitor fibrinolize

U fiziološkim uslovima procesi koagulacije i fibrinolize su precizno regulisani, a njihova molekularna veza doprinosi održavanju balansa u sistemu hemostaze. TAFI je molekul koji direktno povezuje sistem koagulacije i fibrinolize i koji posle aktivacije delovanjem trombina ispoljava snažno antifibrinolitičko delovanje. TAFI se sintetiše u jetri, megakariocitima i moguće u drugim ćelijama. U cirkulaciji se nalazi u plazmi, a ~0,1% količine TAFI se nalazi u α -granulama trombocita, iz kojih se oslobađa posle njihove aktivacije. Uprkos maloj koncentraciji, TAFI u trombocitima može imati značajnu ulogu u okviru tromba gde je prisutan veliki broj trombocita (32, 33).

Aktivacija proenzima TAFI se odvija proteolizom na poziciji Arg92 što dovodi do oslobađanja aktivacionog peptida i nastanka aktiviranog TAFI (TAFIa). Trombin je glavni fiziološki aktivator TAFI (33). Katalitička efikasnost trombina je mala tako da je za aktivaciju TAFI potrebna visoka koncentracija trombina koja nastaje u fazi propagacije koagulacije (34). Pokazano je da je aktivacija TAFI trombinom ~1000 puta veća u prisustvu trombomodulina, ali uloga trombomodulina zavisi od specifičnih okolnosti.

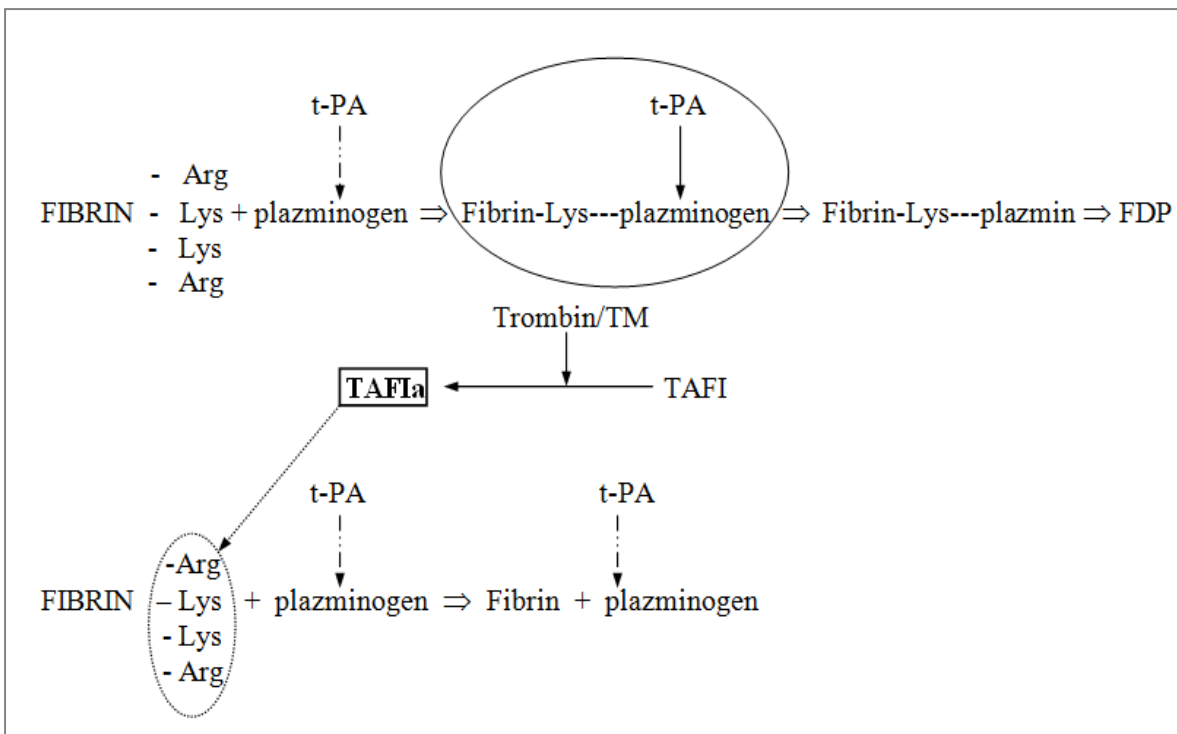
U malim krvnim sudovima visoka koncentracija trombomodulina, zbog visokog odnosa površine endotela i zapremine krvi, dovodi do brze aktivacije proteina C i manjeg stvaranja trombina kao i pojačane fibrinolize usled slabe aktivacije TAFI. U većim krvnim sudovima, zbog niske koncentracije trombomodulina, aktivira se mala količina proteina C i stvara se veća količina trombina pa je izraženija aktivacija TAFI i inhibicija fibrinolize (33).

Plazmin može aktivirati TAFI proteolizom na poziciji Arg 92. Katalitička efikasnost plazmina je mala, a povećava se ~15 puta u prisustvu glikozaminoglikana. Proteolizom molekula TAFI plazminom na pozicijama Arg 302, Lys327 i Arg 330 nastaje nekoliko malih fragmenta i jedan veći koji ne može biti transformisan u aktivan enzim. Ovo ukazuje da plazmin može uticati na aktivaciju TAFI i proces fibrinolize *in vivo* (35).

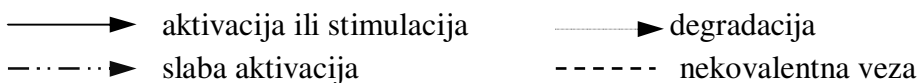
TAFIa inhibira fibrinolizu tako što blokira plazminom posredovani mehanizam pozitivne povratne sprege koji dovodi do prelaska fibrinolize iz inicijalne faze u fazu propagacije (shema 3). Naime, TAFIa uklanja vezna mesta za plazminogen i t-PA na površini parcijalno razgrađenog fibrina i blokira stvaranje Lys-plazminogena što dovodi do slabije aktivacije plazminogena delovanjem t-PA i stvaranja manjih količina plazmina.

Inhibicija fibrinolize je prisutna dok je koncentracija TAFIa iznad određenog "praga". Koncentracija TAFIa zavisi od velikog broja faktora kao što su nivo TAFI, brzina stvaranja i stabilnost TAFIa i koncentracija antiplazmina i t-PA (36). Ipak, delovanje TAFIa je dominantno regulisano njegovom termalnom nestabilnošću jer nisu opisani endogeni inhibitori TAFI. Biološki poluživot TAFIa na 37°C iznosi 7-8 minuta, posle čega dolazi do promene konformacije i stvaranja inaktivne forme molekula TAFI (TAFIai). Opisani su polimorfizmi gena za TAFI koji dovode do aminokiselinske supstitucije koja povećava stabilnost TAFIa, produžava poluživot na 15 minuta i pojačava njegovo delovanje (33).

Trombin je glavni fiziološki aktivator TAFI tako da poremećaji stvaranja trombina mogu imati uticaj na proces fibrinolize. Smatra se da smanjena aktivacija TAFI može doprineti većem stepenu izraženosti krvarenja, kao što je to slučaj kod hemofilije gde pored smanjenog stvaranja trombina i pojačana fibrinoliza doprinosi pojavi krvarenja (37, 38).



Shema 3. Uloga TAFI u procesu fibrinolize



(reprodukovano uz saglasnost Jovana Antovića. Doktorska teza, Karolinska press 2003.)

HEMOFILIJJA

Hemofilija A je urođena koagulopatija koja nastaje usled deficita koagulacijske aktivnosti FVIII. Učestalost hemofilije A je 50-100 obolelih na milion stanovnika. Ne postoje geografske, etničke ili rasom uslovljene varijacije učestalosti. Broj obolelih je u porastu usled napretka u dijagnozi i terapiji jer je poboljšan kvalitet i dužina života i oboleli osnivaju porodice i tako se povećava broj prenosilaca. Danas se smatra da uz adekvatno lečenje oboleli od hemofilije A mogu dostići dužinu života u opštoj populaciji (39, 40).

Etiologija

FVIII – gen i molekul. U osnovi hemofilije A je mutacija gena za FVIII koja dovodi do odsustva sinteze, smanjenja sinteze ili sinteze izmenjenog molekula FVIII. Gen za FVIII je lokalizovan na dugom kraku hromozoma X, zauzima 0,1% dužine X hromozoma i jedan je od najvećih gena u humanom genomu. Smatra se da su hepatociti i/ili ćelije retikuloendotelskog sistema primarno mesto sinteze FVIII. FVIII se u cirkulaciji nalazi u kompleksu sa vWF, koji je kodiran genom na autosomnom hromozomu 12, a sintetiše se u endotelskim ćelijama i megakariocitima. vWF štiti labilni molekul FVIII od proteolitičke razgradnje i ćelijske eliminacije. Uklanjanje FVIII iz cirkulacije se primarno dešava u jetri putem interakcije sa ćelijskim lipoproteinskim i heparan sulfat proteoglikanskim receptorima. Aktivacija FVIII se odvija proteolitičkim delovanjem trombina, a FVIIIa deluje kao kofaktor FIXa u aktivaciji FX na membrani aktiviranih trombocita (41, 42).

Mutacije gena za FVIII. Kloniranjem gena za FVIII omogućeno je ispitivanje mutacija koje su u osnovi hemofilije A. Do danas su kod velikog broja bolesnika identifikovane mutacije i formirane su baze podataka koje ukazuju na izuzetnu raznovrsnost mutacija. Kod ~80 % obolelih u osnovi su mali defekti gena, najčešće point mutacije. U preostalih 20% obolelih najčešće je prisutna mutacija inverzija intron 22, koja je u osnovi 45% slučajeva teške hemofilije A, a ređe su prisutne velike delecije, insercije i translokacije. Identifikacija mutacija je značajna zbog pružanja genetskog saveta, pouzdane procene statusa prenosioca i prenatalne dijagnoze hemofilije A. S obzirom na uticaj vrste mutacije na rizik nastanka inhibitora informacija o prisutnoj mutaciji može uticati na terapijski pristup (43).

Nasleđivanje

Hemofilija se nasleđuje recesivno genom koji se nalazi na X hromozomu tako da oboljevaju gotovo isključivo muškarci, a bolest prenose zdrave žene. Oboleli muškarci preko X hromozoma prenose mutirani gen svojim ćerkama, i one na taj način postaju prenosioci hemofilije, koju prenose svojim sinovima. Ako je u porodici otac oboleo od hemofilije svi sinovi će biti zdravi a sve ćerke prenosioci. Ako je u porodici majka

prenosilac hemofilije onda svaki sin ima 50% verovatnoću da bude bolestan a svaka ćerka 50% verovatnoću da bude prenosilac (40, 44).

Za hemofiliju je karakteristična česta pojava sporadičnih slučajeva oboljenja. U oko 30-50% slučajeva se hemofilija javlja u porodicama u kojima nema podataka o postojanju oboljenja (40). Sporadični slučajevi hemofilije mogu biti posledica (45): a) nasleđivanja statusa prenosioca kroz više generacija bez rađanja obolelog muškog deteta ili b) nove mutacije u jednom od gameta majčinih roditelja ili postzigotične mutacije.

Patofiziologija

Još uvek se istražuje kompleksni mehanizam kojim deficit prokoagulantne aktivnosti FVIII uslovljava pojavu krvarenja kod hemofilije A. Istraživanja (23, 24, 26) ukazuju da tri poremećaja u procesu hemostaze doprinose nastanku krvarenja i to: 1) smanjeno stvaranje trombina u inicijalnoj fazi koagulacije zbog niske koncentracije TF, 2) smanjeno stvaranje trombina u fazi propagacije koagulacije zbog deficita FVIII i 3) ubrzana fibrinoliza zbog smanjene aktivacije TAFI i FXIII.

U osnovi hemofilije A je poremećaj koagulacije. Za formiranje stabilnog koaguluma neophodna je odgovarajuća brzina stvaranja trombina u inicijalnoj fazi i stvaranje velikih količina trombina u fazi propagacije (23). Kod obolelih od hemofilije A krvarenja su najčešća u zglobovima i mišićima, a to su tkiva sa veoma malom količinom tkivnog faktora (46). S obzirom da se aktivacija sistema koagulacije ostvaruje delovanjem kompleksa FVIIa-TF na FX, kod hemofilije A je smanjeno stvaranje trombina u inicijalnoj fazi. Međutim, glavni poremećaj je smanjeno stvaranje trombina u fazi propagacije na membrani aktiviranih trombocita. U odsustvu FVIIIa izostaje formiranje kompleksa FIXa-FVIIIa koji je glavni aktivator FX. Zbog poremećaja aktivacije FX izostaje sekundarno stvaranje velike količine trombina u fazi propagacije (24).

U patogenezi krvarenja kod hemofilije A značajnu ulogu ima ubrzana fibrinoliza koja doprinosi prevremenoj razgradnji koaguluma. Na ulogu fibrinolize ukazuje pojava odloženih krvarenja tj. pojava krvarenja nekoliko sati ili dana posle povrede kao i efikasnost primene antifibrinolitika (32). Još uvek nije u potpunosti razjašnjeno šta je u

osnovi ubrzane fibrinolize kod hemofilije A ali su rezultati *in vitro* studija (37, 38) ukazali na poremećaj aktivacije TAFI. Ovi nalazi su u skladu sa podacima da je kod hemofilije A smanjeno stvaranje trombina koji je glavni fiziološki aktivator TAFI (47).

Klinička slika

Hemofilija A se klinički manifestuje krvarenjima koja su prisutna tokom celog života i mogu biti: a) spontana - najčešće u zglobove (hemartroze) i mišiće (hematomi) i b) traumatska – obilna krvarenja usled povrede, vađenja zuba ili hirurške intervencije. Kod osoba sa teškim oblikom hemofilije A simptomi krvarenja se često javljaju u prvim godinama života i najčešće se poklapaju sa početkom hodanja i većom fizičkom aktivnošću deteta. Karakteristična su spontana krvarenja u zglobove koja se često ponavljaju i dovode do trajnog oštećenja zglobova. Kod umerene hemofilije A spontana krvarenja su retka, najčešće su prisutna obilna krvarenja posle traume. Blagi oblik hemofilije A se najčešće klinički manifestuje obilnim krvarenjima posle povrede, vađenja zuba ili hirurške intervencije (39, 44).

Oko 80% svih krvarenja kod obolelih od hemofilije A su krvarenja u zglobove, a najčešće su zahvaćeni zglobovi kolena, laktovi i skočni zglobovi mada mogu biti zahvaćena i ramena, ručni zglobovi i kukovi. Ponavljana krvarenja dovode do ireverzibilnog oštećenja zglobova, hronične hemofilične artropatije, koja se manifestuje otokom i zadebljanjem zgloba, ograničenjem pokreta, atrofijom mišića i hroničnim bolom. Krvarenja u mišiće čine 10-20% svih krvarenja, a najčešće se javljaju posle traume i manifestuju se bolnim otokom. Krvarenje može izazvati rupturu mišića ili stvaranje ciste, a ponavljanim krvarenjem se razvija cistični pseudotumor koji dovodi do destrukcije okolne kosti. Znatno ređe se javljaju potkožni hematomi i mukozna krvarenja (48). Krvarenja kod obolelih od hemofilije A mogu biti životno ugrožavajuća. Najčešći uzrok smrti kod obolelih od hemofilije su intrakranijalna krvarenja koja mogu biti spontana ili posle traume i to vrlo često posle minimalne traume glave (49). Sublingvalni, peritonzilarni, retrofaringealni hematomi kao i hematomi jezika i vrata su retki, ali su vrlo opasni zbog mogućnosti ugušenja. Krvarenja

posle povreda, intramuskularnih injekcija, vađenja zuba i hirurških intervencija su produžena, praćena stvaranjem hematoma i usporenim zarastanjem rane (39).

Procena težine kliničke slike

Težina kliničke slike je uobičajeno u skladu sa stepenom sniženja koagulacijske aktivnosti FVIII (FVIII:C) i to je osnov za klasifikaciju težine hemofilije A prema preporukama Komiteta za standardizaciju Internacionalnog udruženja za trombozu i hemostazu (50) što je prikazano u tabeli 1.

Tabela 1. Težina kliničke slike u odnosu na vrednost FVIII:C (39, 50)

Oblik hemofilije	FVIII:C (IJ/dl)	Tip krvarenja
Teška	<1	Ponavljana spontana krvarenja u zglobove i mišiće
Umerena	1-5	Retka spontana krvarenja, a najčešće obilna krvarenja posle povrede ili operacije
Blaga	>5-<40	Obilna krvarenja posle velike povrede ili operacije

Međutim, uočeno je da težina krvarenja može značajno varirati kod bolesnika sa istim nivoom FVIII:C kao i kod bolesnika koji imaju identičnu mutaciju u osnovi oboljenja. U nekoliko studija (44, 51, 52) je dokumentovano prisustvo blage kliničke slike kod 10-15% bolesnika sa teškom hemofilijom A što se manifestovalo retkim spontanim krvarenjima, blagom artropatijom i manjom potrošnjom koncentrata. Takođe, opisano je da značajan broj bolesnika sa umerenom hemofilijom A (53), a retko i sa blagom hemofilijom A (54), imaju česta krvarenja i artropatiju. Ova zapažanja sugerišu da klinička težina ne zavisi samo od nivoa FVIII:C. Mehanizam u osnovi ove varijabilnosti je samo delimično razjašnjen. Pored dokazanog uticaja individualnih razlika u farmakokinetici koncentrata FVIII i prisustva faktora trombofilije opisuje se i uticaj vrste mutacije koji je u osnovi hemofilije A i drugih naslednih faktora (nivo činilaca koagulacije i fibrinolize, faktori

inflamacije i imunoregulacije) kao i faktora sredine (fizička aktivnost, način života, terapijski pristup) na težinu krvarenja kod hemofilije A (55).

Procena kliničke težine hemofilije A nije standardizovana. Kao parametri se koriste vreme pojave prvog krvarenja, učestalost krvarenja, prisustvo i stepen artropatije, potrošnja lekova ili kombinacija nekih od ovih parametara (51, 56, 57). Broj spontanih hemartroza u toku godine je najpogodniji parametar kod bolesnika koji primaju terapiju samo za zaustavljanje krvarenja (51). Međutim, primena profilakse je promenila klinički tok bolesti tako da se kod bolesnika na profilaksi kao parametar za procenu kliničke težine često koristi vreme pojave prvog krvarenja. Krvarenja kod bolesnika sa teškom hemofilijom se javljaju ranije, najčešće u uzrastu 6-8 meseci, kada deca postaju fizički aktivnija (57).

Identifikacija faktora koji doprinose pojavi učestalih krvarenja bi omogućila ranu procenu kliničke težine hemofilije A, a to bi doprinelo izboru optimalnog oblika lečenja na osnovu podataka o kliničkom fenotipu uz podatke o nivou FVIII:C. Tako bi bilo moguće identifikovati bolesnike sa klinički teškim oblikom bolesti kod kojih je opravdana primena rane profilaktičke terapije, a takođe i onih 10% bolesnika sa teškom hemofilijom A koji retko krvare i kojima profilaksa nije potrebna ili se njena primena može odložiti (55).

Dijagnoza

Dijagnoza hemofilije A se postavlja na osnovu podataka dobijenih anamnezom, fizičkim pregledom i laboratorijskim analizama. Na hemofiliju A ukazuju krvarenja od ranog detinjstva, spontana krvarenja u zglobove i mišiće, obilna krvarenja posle povrede, vađenja zuba ili hirurške intervencije kao i prisustvo hemofilije u porodici (39).

Karakterističan laboratorijski nalaz je produženo APTT uz normalne rezultate ostalih skrining testova. Kod blagih oblika hemofilije A i APTT može biti u granicama normalnih vrednosti jer je APTT obično produžen kada je nivo FVIII:C <25 IU/dl usled nedovoljne senzitivnosti reagensa. Zbog toga, ako anamnestički podaci ukazuju na prisustvo krvarenja treba ispitati FVIII:C i kada su rezultati skrining testova normalni. Za definitivnu dijagnozu hemofilije A potrebno je ispitivanje FVIII:C, koagulacijskim ili hromogenim testom.

Takođe, potrebno je uraditi testove za diferencijalnu dijagnozu u odnosu na von Willebrandovu bolest (58).

Ispitivanje inhibitora FVIII se vrši u toku redovne kontrole ili usled neadekvatnog odgovora na supstitucionu terapiju. Za merenje inhibitora koristi se Bethesda metod, odnosno Nijmegen modifikacija koja omogućava veću senzitivnost testiranja. (59).

Terapija

Krvarenje kod hemofilije A se može zaustaviti ili sprečiti primenom supstitucione terapije. Terapija izbora su koncentracije FVIII, humani i rekombinantni. Terapija se može primenjivati po potrebi tj. za zaustavljanje krvarenja ili u cilju profilakse krvarenja (39).

Lečenje krvarenja je najefikasnije ukoliko se terapija primeni sa pojavom prvih simptoma, najbolje u toku prva 2 sata. Neophodno je primeniti adekvatnu dozu i dovoljno dugo davati lek da bi se preveniralo trajno oštećenje zgloba (60). Inicijalna doza FVIII se određuje na osnovu hemostatskog nivoa za tip krvarenja i telesne mase bolesnika. Uobičajeno, primena 1 IJ FVIII po kilogramu (kg) povećava nivo FVIII:C u plazmi za ~2 IJ/dl (61), tako da se inicijalna doza izračunava množenjem polovine telesne mase izražene u kilogramima sa hemostatskim nivoom FVIII:C izraženim u procentima. Mnoga nacionalna i internacionalna udruženja (60, 62) su publikovala preporuke za lečenje hemofilije, a u Srbiji je Srpska lekarska grupa za hemofiliju publikovala Vodič za lečenje hemofilije (63), sa preporučenim hemostatskim nivoima FVIII:C zavisno od tipa krvarenja. U lečenju spontanih krvarenja hemostatski nivo iznosi 10-50% od nivoa kod zdrave osobe, a terapija se primenjuje do zaustavljanja krvarenja. Veći hemostatski nivo od 50-100% i duža primena terapije je potrebna kod životno ugrožavajućih krvarenja. Doza održavanja je obično pola inicijalne doze i primenjuje se na 8-12 sati, zavisno od poluživota FVIII u cirkulaciji, do zaustavljanja krvarenja (60, 63). U prevenciji krvarenja pri hirurškim intervencijama hemostatski nivo perioperativno iznosi 50-100%, a u postoperativnom periodu 30-50% i terapija se primenjuje do zarastanja rane.

Lečenje krvarenja po potrebi usporava razvoj artropatije ali ne može sprečiti njenu pojavu. Profilaktička terapija, regularnom primenom koncentrata FVIII, omogućava

prevenciju hemartroza i artropatije, normalan fizički razvoj i unapređenje kvaliteta života kod bolesnika sa teškim oblikom hemofilije A (64). Primarna profilaksa počinje pre pojave krvarenja ili posle prvog krvarenja u veliki zglob, obično u prve tri godine života. Sekundarna profilaksa počinje posle dva ili više krvarenja u velike zglobove dok još nema znakova artropatije. Rana profilaksa je terapija izbora kod teške hemofilije A. Sve više se primenjuje tercijarna profilaksa kod bolesnika sa artropatijom i čestim krvarenjima jer se tako usporava dalje oštećenje zglobova i popravljaju kvalitet života. Profilaksa se može primenjivati i inermitentno jer kratkotrajna profilaksa tokom 4-8 nedelja može prekinuti ciklus krvarenja (65). Međutim, primena profilakse je ograničena s obzirom na visoku cenu terapije, a radi se na razvoju strategija za smanjenje potrošnje koncentrata na osnovu individualnog pristupa u određivanju veličine i učestalost doze za profilaksu (66).

Ne postoji univerzalni pristup doziranju za primarnu profilaksu s obzirom na velike razlike u raspoloživosti koncentrata FVIII u različitim sredinama. Dva terapijska protokola se standardno koriste: 1) švedski model - primena 25-40 IJ/kg tri puta nedeljno da se obezbedi minimalan nivo FVIII:C od 1 IJ/dl, i 2) holandski model - primena 20-40 IJ/kg dva do tri puta nedeljno u zavisnosti od pojave krvarenja. Direktnim poređenjem je pokazana efikasnost oba protokola s tim da je kod bolesnika u Holandiji zapažen minimalan stepen artropatije uz dvostruko manju potrošnju koncentrata FVIII (67). Intenzitet profilakse i način otpočinjanja su još uvek predmet istraživanja zbog potrebe čestih intravenskih injekcija kod male dece, a nekada i potrebe implantacije centralnog venskog katetera što se može komplikovati infekcijom ili trombozom (60). Ovi problemi, kao i razlike u učestalosti krvarenja kod bolesnika sa teškom hemofilijom A, su naveli na "stepenasti" pristup koji je razvijen u Kanadi (68) i omogućava individualno prilagođavanje doze. Profilaksa započinje primenom 50 IJ/kg jednom nedeljno, a zatim se učestalost primene i doza koncentrata povećavaju u skladu sa pojavom krvarenja.

Preporuka je da protokol profilakse treba prilagoditi individualnim potrebama bolesnika i predlaže se primena minimalne doze koncentrata koja omogućava prevenciju krvarenja (60). U tom cilju je predložen model koji se bazira na individualnim karakteristikama farmakokinetike FVIII (66), a istražuje se i uloga globalnih testova hemostaze (69, 70) u proceni individualnog pristupa u hemofiliji A.

Izbor vrste koncentrata zavisi od bezbednosti preparata odnosno od rizika transmisije virusa i rizika pojave inhibitora koagulacije. *Humani koncentрати* se pripremaju frakcionisanjem pula plazme od velikog broja davalaca ali kao rezultat unapređenja pripreme koncentrata i metoda inaktivacije virusa više od 20 godina nije dokazana transmisija HCV i HIV infekcije usled primene koncentrata (71). Ipak, zbog rizika transmisije do sada nepoznatih virusa rezistentnih na metode virusne inaktivacije i mogućnosti prenosa priona putem krvi smatra se da se najveći stepen bezbednosti obezbeđuje primena rekombinantnih koncentrata. *Rekombinantni koncentрати* se proizvode metodama genetskog inženjeringa, ultravisoko su prečišćeni i nose najmanji rizik transmisije virusa. Zbog toga, kao i zbog odsustva dokaza povećanog rizika nastanka inhibitora pri njihovoj primeni, rekombinantni koncentрати FVIII su terapija izbora za bolesnike sa hemofilijom A (72). Međutim, visoka cena ovih koncentrata limitira njihovu primenu. U okolnostima ograničene dostupnosti rekombinantnih koncentrata FVIII treba ih prvenstveno primenjivati kod obolelih koji prethodno nisu primali supstitucionu terapiju, kao i kod onih koji su primali supstitucionu terapiju ali nisu inficirani virusima hepatitisa i virusom humane imunodeficijencije (60, 63).

Inhibitori FVIII. Inhibitori FVIII su patološka aloantitela koja nastaju imunizacijom obolelih od hemofilije A usled primene supstitucione terapije, a specifično neutrališu aktivnost FVIII. Učestalost pojave inhibitora kod teške hemofilije A je 25-30%, a kod blage i umerene hemofilije A iznosi 3-13%. (73).

Inhibitori su najteža komplikacija hemofilije A jer se krvarenja teže zaustavljaju, a lečenje je kompleksno i skupo. Krvarenja kod bolesnika sa titrom inhibitora <5 BJ/ml se leče primenom velikih doza koncentrata FVIII. Međutim, kada je titar inhibitora >5 BJ/ml ili nezavisno od titra kod bolesnika sa snažnim imunološkim odgovorom primenjuju se koncentрати sa by-pass efektom čija primena zaobilazi mesto delovanja FVIII u sistemu koagulacije. Koncentрати rekombinantnog aktiviranog FVII (rFVIIa) i aktiviranog protrombin kompleksa (aPCC) su efikasni u zaustavljanju 80-90% krvarenja (73, 74).

Intenzivno se istražuju faktori rizika i mogućnosti za prevenciju nastanka inhibitora. Među genetskim faktorima najveći značaj ima mutacija gena za FVIII i polimorfizam imunoregulatornih gena. Uticaj faktora sredine kao što su način primene leka, vreme prve

primene terapije, vrsta koncentrata, primena terapije u toku infekcije ili imunizacije nije razjašnjen jer su rezultati ispitivanja kontroverzni (75, 76).

Drugi i novi oblici lečenja. Dezmpresin se primenjuje u terapiji blagih i umerenih oblika hemofilije A za lečenje krvarenja kao i za prevenciju krvarenja pri vađenju zuba i hirurškim intervencijama. Antifibrinolitički lekovi se najčešće primenjuju kao dodatna terapija za prevenciju krvarenja pri vađenju zuba zbog izražene fibrinolize u usnoj duplji (77). Koncentrati FVIII sa dužim poluživotom se baziraju na prevenciji razgradnje molekula rekombinantnog FVIII usled vezivanja sa polietilen glikolom ili pegiliranim lipozomima ili fuzije sa imunoglobulinima ili albuminima. Prva ispitivanja ukazuju na mogućnost profilakse primenom leka 1-2 puta nedeljno (78). *Terapija genima* je pogodna za lečenje hemofilije s obzirom da veoma malo povećanje FVIII:C (~3–5 IJ/dl) u krvi značajno smanjuje učestalost krvarenja i eliminiše zahtevnu primenu profilakse. Terapija genima se sprovodi tako što se u somatske ćelije obolelog unosi normalan gen za FVIII pomoću virusa koji inficiraju ciljne ćelije koje zatim sintetišu FVIII. Preliminarni rezultati ukazuju da još uvek nije moguće postići stabilnu ekspresiju gena za FVIII i stabilno povećanje aktivnosti FVIII tako da se radi na unapređenju genske terapije (79).

Procena odgovora na terapiju

Za procenu odgovora na terapiju kod bolesnika sa hemofilijom A primenjuje se praćenje kliničkih i laboratorijskih parametara. Kliničkim pregledom se utvrđuje postojanje simptoma krvarenja kao i prisustvo i stepen oštećenja zglobova primenom standardizovanih kliničkih skorova (60).

Laboratorijska procena podrazumeva merenje FVIII:C, a najčešće se koristi jednostepeni koagulacijski test (58). Pri praćenju odgovora na terapiju treba uzeti u obzir individualne razlike u farmakokinetici FVIII. Najznačajniji laboratorijski parametri su porast FVIII:C 15-30 minuta posle infuzije koncentrata za procenu inicijalne doze i poluživot FVIII:C u plazmi za procenu učestalosti primene doze. Kod bolesnika koji primaju terapiju za zaustavljanje krvarenja nivo FVIII se meri pre i 30 minuta posle primene koncentrata, kada FVIII dostiže najveći nivo, pa se na osnovu rezultata doza leka

prilagođava preporučenom hemostatskom nivou FVIII:C za određeni tip krvarenja. Kod bolesnika na profilaksi cilj je da se FVIII:C održi na nivou ≥ 1 IJ/dl. Nivo FVIII:C se meri 48-72 sata posle poslednje doze koncentrata odnosno neposredno pred sledeću dozu i tako određuje najniži nivo FVIII:C. Ipak, prisutne su individualne varijacije tako da neki bolesnici krvare i kad je nivo FVIII:C >1 IJ/dl dok kod drugih krvarenja nema i kada je FVIII:C <1 IJ/dl. U slučaju neočekivane pojave krvarenja određivanje poluživota FVIII može biti korisno za individualnu procenu učestalosti primene profilaktičke doze, jer poluživot FVIII u plazmi varira u širokom rasponu od 7 do 20 sati. U odsustvu krvarenja nije uvek neophodno održavati nivo FVIII:C ≥ 1 IJ/dl (65, 80).

Tumačenje laboratorijskih rezultata u skladu sa kliničkim nalazima omogućava optimalan terapijski pristup. Treba imati u vidu ograničenja testiranja tj. mogućnost procene samo inicijalne faze koagulacije. To može biti u osnovi neslaganja vrednosti FVIII:C i kliničkog odgovora na terapiju jer se merenjem FVIII:C ne može proceniti uticaj leka na ukupni hemostatski status kod bolesnika sa hemofilijom A. Ako primena standardne doze leka nije klinički efikasna potrebno je uraditi testiranje na inhibitore. Za laboratorijsko praćenje terapije kod bolesnika sa inhibitorima ne postoje pouzdane metode. Ovo su situacije u kojima primena globalnih testova hemostaze može dati korisne dodatne podatke za praćenje odgovora na terapiju kod hemofilije A (60, 81).

Trombofilija u hemofiliji

Trombofilija se definiše kao sklonost za nastanak tromboze usled prisustva naslednih i stečenih faktora rizika. Među faktorima nasledne trombofilije najveći značaj imaju mutacije FVL sa učestalošću 3-7% u opštoj populaciji, FII G20210A sa učestalošću 1-6% i mutacija MTHFR 677TT koja može biti u osnovi hiperhomocisteinemije, a prisutna je kod 5-12 % osoba. Deficit inhibitora koagulacije antitrombina, proteina C i proteina S su snažni ali veoma retko prisutni nasledni faktori rizika za trombozu (82).

Varijabilnost težine kliničke slike kod hemofilije A, čak i kod osoba sa istom mutacijom u osnovi oboljenja, ukazuje na ulogu modulatornih faktora. Izraženost kliničkih manifestacija je rezultat poremećenog balansa u sistemu hemostaze uz delovanje brojnih

regulatornih proteina i bioloških procesa. Saznanja o visokoj učestalosti nekih naslednih faktora trombofilije, a posebno mutacije FVL, su podstakla ispitivanja trombofilije kod bolesnika sa hemofilijom A. Sistematski pregled literature (55), na osnovu 21 opisane studije, ne omogućava donošenje definitivnih zaključaka. Najviše podataka se odnosi na mutaciju FVL koja može imati uticaja na težinu kliničke slike kod hemofilije A. Što se tiče drugih faktora trombofilije nije moguće doneti relevantan zaključak. Smatra se da faktori trombofilije mogu uticati na klinički fenotip ali su oni u osnovi samo malog dela varijabilnosti. Potrebna su dalja istraživanja jer su studije rađene na malom broju bolesnika i različito su koncipirane po pitanju selekcije pacijenata i izbora testova za procenu trombofilije (83).

TESTOVI ZA ISPITIVANJE HEMOSTAZE

Laboratorijsko ispitivanje hemostaze se vrši u cilju dijagnoze poremećaja hemostaze kod bolesnika sa simptomima krvarenja ili tromboze, u pripremi za hiruršku intervenciju ili pre primene hemostatske terapije. Prvo se izvode skrining testovi, na osnovu čijih rezultata se procenjuje potreba za izvođenjem kao i izbor specijalnih testova (16).

Skrining testovi

Istovremena primena sledećih testova omogućava otkrivanje većine klinički značajnih poremećaja hemostaze: APTT, PT, trombinsko vreme (TT) i određivanje broja trombocita.

APTT je test kojim se meri aktivnost unutrašnjeg i zajedničkog puta koagulacije krvi. Test se koristi za dijagnozu deficita FXII, FXI, FX, FIX, FVIII, FV, FII i fibrinogena, prisustva inhibitora navedenih faktora koagulacije i lupus antikoagulansa kao i za praćenje terapije heparinom i direktnim inhibitorima trombina. PT je test kojim se meri aktivnost spoljašnjeg i zajedničkog puta koagulacije. Ovaj test se koristi za dijagnozu deficita FII, FV, FVII, FX i fibrinogena, za kontrolu oralne antikoagulantne terapije i procenu funkcije jetre. TT je test kojim se meri brzina pretvaranja fibrinogena u fibrin pod dejstvom

standardnog rastvora trombina i koristi se za dijagnozu hipo- i disfibrinogenemije, a produžen je u prisustvu heparina ili fibrin/fibrinogen degradacionih produkata (16).

Specijalni testovi

Ispitivanje faktora koagulacije

Aktivnost faktora koagulacije se najčešće meri jednostepenim koagulacijskim testovima s obzirom na jednostavno, automatizovano izvođenje. Za ispitivanje aktivnosti FVIII, FIX, FXI, FXII se meri sposobnost ispitivane plazme da koriguje APTT, a za FII, FV, FVII i FX da koriguje PT deficitne plazme koja sadrži <1 IJ/dl faktora koagulacije koji se ispituje i normalan nivo drugih faktora koagulacije(84). Za merenje fibrinogena se preporučuje koagulacijska metoda po Claussu koja se zasniva na TT testu, a za određivanje aktivnosti FXIII automatizovani hromogeni test (16). Za ispitivanje aktivnosti vWF (vWF:Akt) preporučuje se imunoturbidimetrijski test gde se koriste lateks čestice obložene antitelima na vWF (85).

Koncentracija antigena faktora koagulacije se ispituje imunohemijskim metodama kao što su imunoradiometrija, ELISA i druge. To omogućava procenu prirode oboljenja: da li se radi o odsustvu, smanjenoj sintezi ili sintezi izmenjenog molekula faktora koagulacije. Ispitivanje koncentracije antigena nije deo rutinskog ispitivanja osim ispitivanja koncentracije antigena vWF (vWF:Ag) za dijagnozu von Willebrandove bolesti (84).

Ispitivanje aktivnosti FVIII je neophodno za postavljanje dijagnoze, procenu težine hemofilije A, za procenu prisustva inhibitora FVIII, praćenje efikasnosti terapije i procenu aktivnosti FVIII u koncentrovanim preparatima. Jednostepeni koagulacijski test se najčešće koristi iako pokazuje značajan stepen varijabilnosti rezultata i visok koeficijent varijacije usled razlika u sastavu deficitne plazme i reagensa za APTT. Hromogeni dvostepeni test pokazuje veći stepen preciznosti, posebno za niske vrednosti FVIII:C, ali visoka cena ograničava njegovu primenu (58, 84). U većini slučajeva rezultati merenja različitim metodama daju ekvivalentne rezultate. Ipak, neslaganje rezultata merenja FVIII:C jednostepenim koagulacijskim testom i hromogenim testom je opisano kod približno

trećine bolesnika sa blagom hemofilijom A. To ima klinički značaj s obzirom da se na osnovu vrednosti FVIII:C vrši procena težine oboljenja, a posebno je značajna mogućnost izostanka postavljanja dijagnoze hemofilije A. U većini slučajeva vrednosti dobijene koagulacijskim testom su veće od vrednosti dobijenih hromogenim testom, a ređe je opisana suprotna pojava. Kada je prisutno neslaganje rezultata nije razjašnjeno koja od vrednosti FVIII:C reflektuje pravi klinički fenotip. Zato se preporučuje se da se kod bolesnika sa blagom hemofilijom A pri postavljanju dijagnoze urade obe vrste testa, kao i molekularno genetička ispitivanja za potvrdu dijagnoze (86).

Ispitivanje trombofilije

Laboratorijsko ispitivanje trombofilije je kompleksno jer pored koagulacijskih i hromogenih testova za procenu aktivnosti inhibitora koagulacije podrazumeva imunohemijska i molekularno genetička ispitivanja. Prema preporukama (87, 88) laboratorijski skrining trombofilije obuhvata ispitivanje deficita antitrombina, proteina C i proteina S, zatim prisustva rezistencije na APC, mutacija FVL i FII G20210A kao uzroka nasledne trombofilije, prisustva antifosfolipidnih antitela kao uzroka stečene trombofilije i hiperhomocisteinemije koja može biti nasledni ili stečeni poremećaj.

Deficiti inhibitora koagulacije se detektuju na osnovu snižene aktivnosti merene koagulacijskim ili hromogenim testiranjem. Aktivnost antitrombina i proteina C se ispituje hromogenim testovima, a aktivnost proteina S koagulacijskim testovima. Rezistencija na APC se ispituje testom APTT u uzorku plazme pre i posle dodavanja standardne količine APC. Za potvrdu pozitivnih i ispitivanje graničnih rezultata testiranja radi se detekcija mutacije FVL. Mutacije FVL i FII G20210A se detektuju molekularno genetičkim testovima. Prisustvo lupus antikoagulansa (LA) se detektuje na osnovu produženja testova koagulacije koji zavise od fosfolipida i njihove korekcije posle dodavanja fosfolipida, a antikardiolipinska i anti- β -2-glikoprotein-I antitela se detektuju ELISA testom. Hiperhomocisteinemija se dijagnostikuje imunohemijskim metodama (89).

Ispitivanje TAFI

Testovi za direktno ispitivanje TAFI su odnedavno na raspolaganju, dok je u ranijim studijama korišćeno vreme lize koaguluma za indirektnu procenu TAFI (37, 38). Za merenje nivoa proenzima TAFI koriste se: 1) funkcionalni testovi koji mere aktivnost TAFI posle egzogene aktivacije dodavanjem kompleksa trombin-trombomodulin i 2) imunološki testovi koji mere antigen TAFI primenom ELISA metode (90).

Funkcionalni testovi se izvode direktnim ili indirektnim metodama. Direktnim metodama se meri proteolitičko delovanje TAFIa na sintetske supstrate, a reakcija se detektuje hromatografskom, spektrofotometrijskom ili hromogenom metodom. Međutim, ove metode mere i aktivnost karboksipeptidaze N u plazmi. Čuvanje uzorka je kompleksno. Potrebno je da se posle aktivacije uzorak čuva na ledu i da se doda supstrat kako bi se sprečila degradacija labilnog molekula TAFIa. Prednosti funkcionalnih testova su merenje enzimske aktivnosti TAFIa bez uticaja polimorfizama TAFI gena i bez uticaja drugih formi TAFI prisutnih u plazmi. Indirektni funkcionalni testovi se zasnivaju na proceni uticaja TAFIa na vreme lize koaguluma sa i bez specifičnog inhibitora TAFI. Ova merenja nisu dovoljno senzitivna i pokazuju veliki stepen varijabilnosti. Zbog toga, kao i zbog kompleksnosti pripreme i čuvanja uzorka funkcionalni testovi se manje koriste (90).

Prednosti ELISA testova su jednostavnost izvođenja i izostanak uticaja karboksipeptidaze N na rezultate. Međutim, antitela u ELISA testovima imaju ukrštenu reaktivnost za brojne forme molekula TAFI u plazmi (91). Opisana je i različita senzitivnost za varijante TAFI usled polimorfizma TAFI gena od kojih su najvažniji Thr325Ile i Ala147Thr polimorfizmi. Reaktivnost antitela se odnosi na forme aktiviranog i inaktiviranog molekula TAFI (TAFI, TAFIa, TAFIai, produkti proteolize TAFIai, aktivacioni peptid). Iako je TAFI u plazmi predominantno prisutan u formi proenzima značajne količine aktiviranog i inaktiviranog molekula mogu biti prisutne kod bolesnika kod kojih je došlo da aktivacije sistema koagulacije i fibrinolize (90).

U novijem periodu razvijeni su ELISA testovi koji nisu osetljivi na polimorfizam TAFI gena (92) i koji omogućavaju merenje nivoa različitih formi TAFI. Ovim testovima se može meriti nivo proenzima TAFI kao i stepen aktivacije TAFI *in vivo* na osnovu

merjenja kompleksa aktivne i inaktivne forme TAFI (TAFIa/TAFIai) ili nivoa oslobođenog aktivacionog peptida (90). S obzirom na ova unapređenja ELISA testovi se sada najčešće koriste. Sa pojavom testova sa većom pouzdanošću merjenja TAFI najviše je ispitivana uloga TAFI u vaskularnim oboljenjima u cilju razvoja novog terapijskog pristupa (93). Takođe, ispitivana je i uloga TAFI kod bolesnika sa hemofilijom A (94, 95, 96).

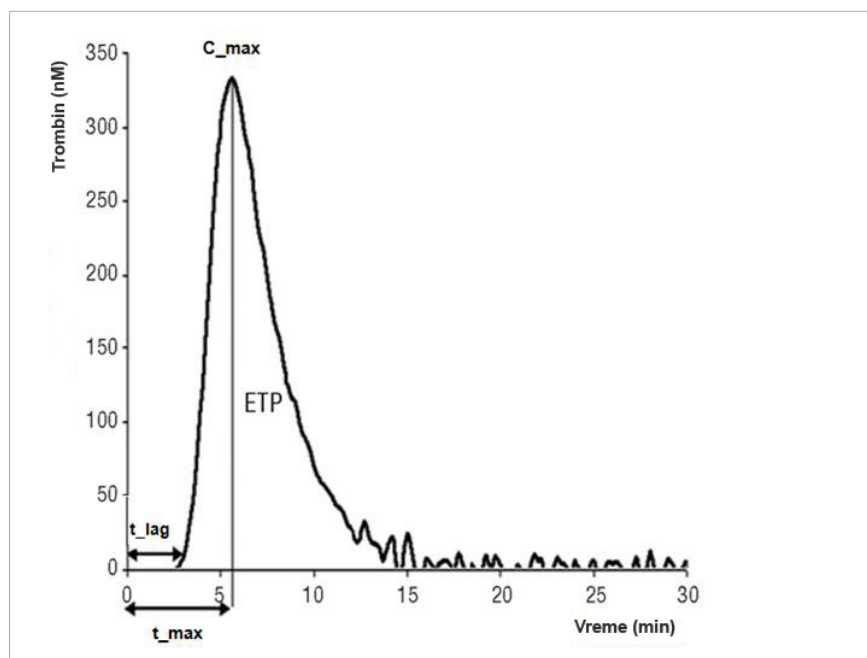
Globalni testovi hemostaze

Složenost sistema hemostaze doprinosi varijabilnosti kliničke slike i odgovora na terapiju kod bolesnika sa poremećajima hemostaze. Zato se intenzivno ispituje primena testova globalne hemostaze koji omogućavaju procenu uticaja brojnih činilaca na klinički tok i terapiju kod bolesnika sa sklonošću ka krvarenju ili trombozi (81, 97).

Standardni, specifični testovi su neophodni za postavljanje dijagnoze, procenu težine oboljenja i efikasnosti terapije. Međutim, APTT i PT i na njima zasnovani testovi za merenje aktivnosti faktora koagulacije pružaju samo delimičnu informaciju o hemostatskom statusu. Ovi testovi kao metodu detekcije koriste formiranje koaguluma i tako reflektuju delovanje <5% trombina nastalog u procesu koagulacije, a ne detektuju stvaranje >95% trombina posle formiranja koaguluma kada se odvija veliki broj reakcija koje značajno utiču na proces hemostaze (25). Takođe, ovim testovima se meri izolovana aktivnost sistema koagulacije u uzorku plazme, ne uzimajući u obzir kompleksnost procesa hemostaze *in vivo*. Zbog toga testovi koji se standardno koriste u nekim slučajevima nisu sasvim pouzdani pokazatelji individualne sklonosti ka krvarenju niti odgovora na terapiju kod bolesnika sa poremećajima hemostaze (51, 52, 53, 54).

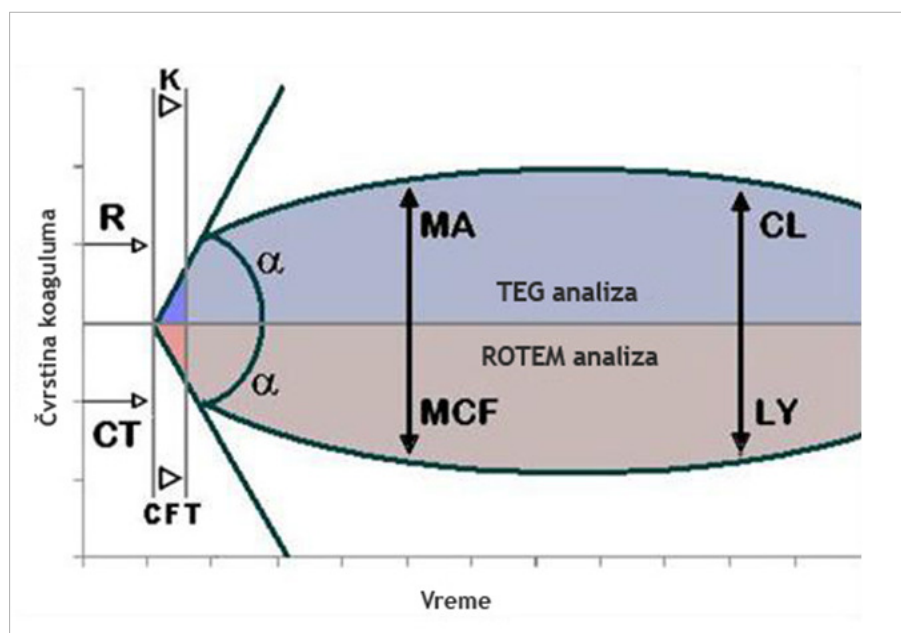
Ispituje se mogućnost merjenja dinamične interakcije komponenata hemostaze primenom globalnih testova. Ispitivanja se usmeravaju sa merjenja aktivnosti faktora koji nedostaje na merenje poremećene funkcije, bar onog dela koji je dostupan jer je lokalizovan u krvi. Testovi globalne hemostaze su poznati već nekoliko decenija, a primena novih tehnologija je pojednostavila primenu i obnovila interesovanje za korišćenje u kliničkoj praksi. Rezultati preliminarnih ispitivanja ukazuju da ovi testovi pružaju dodatne korisne informacije i da su komplementarni standardnim koagulacijskim testovima (81, 97, 98).

Test generacije trombina (TGT). Stvaranje trombina reflektuje uticaj svih komponenata hemostaze, tako da merenje stvaranja trombina doprinosi boljoj proceni kliničkog statusa i terapijskog efekta kod poremećaja hemostaze (99). Test generacije trombina je opisan 1953. godine, a zatim je unapređivan tako da se danas stvaranje trombina može meriti posle dodavanja specifičnog hromogenog ili fluorescentnog substrata u uzorak ispitivane plazme. Od komercijalnih testova najčešće se koriste kalibrisana automatizovana trombografija (CAT) gde se koristi fluorescentni substrat i endogeni trombin potencijal (ETP) gde se koristi hromogeni substrat (100, 101). TGT omogućava kontinuirano praćenje i vizuelizaciju procesa stvaranja trombina. Na osnovu dobijenog zapisa se automatski izračunavaju parametri (shema 4). Parametar ETP, koji predstavlja ukupnu površinu ispod krive stvaranja trombina odnosno ukupnu enzimsku aktivnost stvorenog trombina, ima najveći klinički značaj jer najbolje korelira sa rizikom krvarenja ili tromboze i sa odgovorom na hemostatsku terapiju (47, 99, 102, 103).



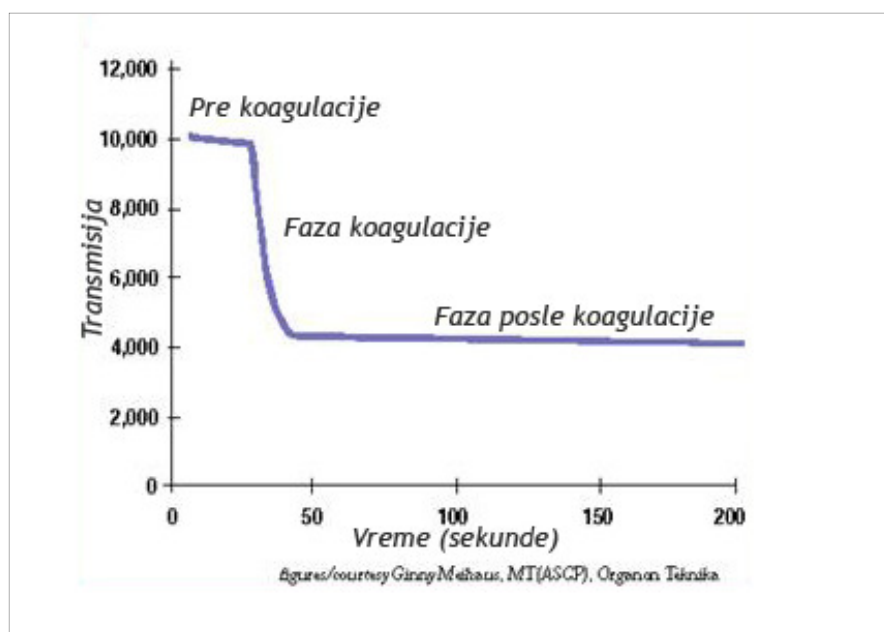
Shema 4. Parametri TGT testa: t_{lag} - vreme do početka stvaranja trombina; t_{max} - vreme do dostizanja maksimalnog nivoa trombina; C_{max} - maksimalan nivo trombina; ETP - endogeni trombin potencijal odnosno površina ispod krive stvaranja trombina (<http://haematologica-thj.org/content/92/12/1639/F1.expansion>)

Tromboelastografija (TEG). TEG pruža podatke o dinamici formiranja koaguluma, od inicijalnog stvaranja fibrina preko rasta koaguluma do procene njegove stabilnosti, praćenjem polimerizacije fibrina u uzorku cele krvi. Ovi uslovi su najbliži događanjima *in vivo* jer se procenjuje delovanje činilaca koagulacije i fibrinolize kao i krvnih ćelija na proces hemostaze. TEG je opisan 1948. godine, a danas su dostupne dve vrste aparata za izvođenje automatizovane tromboelastografije (TEG[®]) i rotacione tromboelastometrije (ROTEM[®]) (104). Kontinuiranim praćenjem promena viskozno-elastičnih svojstava u procesu formiranja i razgradnje koaguluma u uzorku antikoagulisane cele krvi posle dodavanja aktivatora, grafičkim prikazom i obradom podataka izračunavaju se parametri testiranja. Iako se primenom oba instrumenta mere iste vrste parametra (shema 5) oni nisu identični zbog razlika u izvođenju testa, imaju različitu nomenklaturu tako da se rezultati testova ne mogu direktno porediti (105). Rezultati ispitivanja ukazuju da se primenom TEG dobijaju klinički korisne informacije kod bolesnika sa poremećajima hemostaze (106, 107).



Shema 5. Parametri TEG[®] i ROTEM[®] testova. TEG[®]: R – vreme koagulacije; k – brzina koagulacije; α - kinetika polimerizacije fibrina; MA – maksimalna amplituda; CL – vreme lize koaguluma; ROTEM[®]: CT – vreme koagulacije; CFT – vreme formiranja koaguluma; α - kinetika polimerizacije fibrina; MCF – maksimalna čvrstina koaguluma; LY – maksimalna liza koaguluma (<http://www.wjes.org/content/7/S1/S3/figure/F1>)

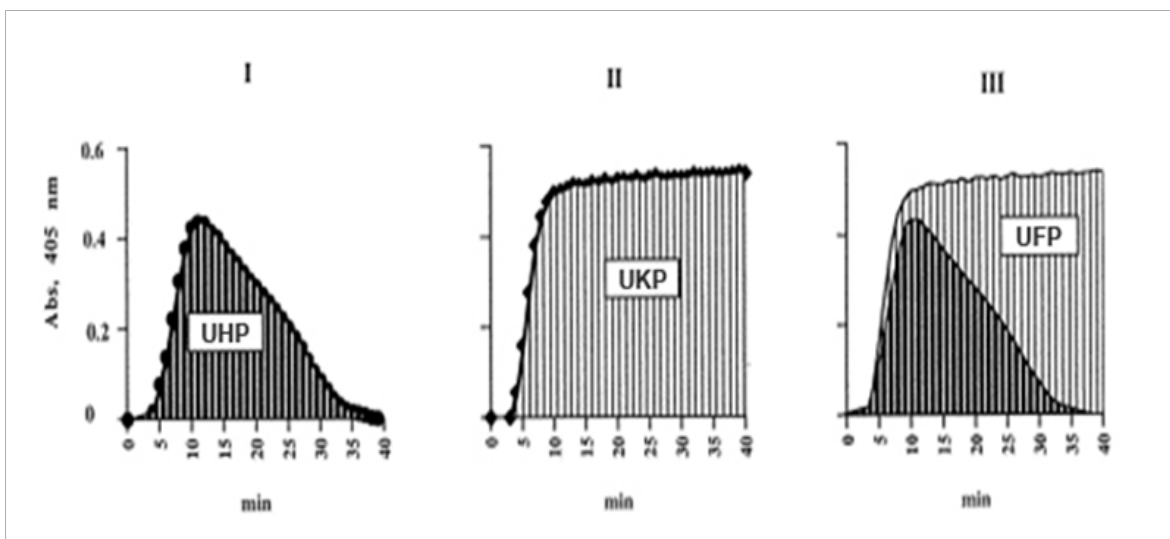
Analiza krive koaguluma (AKK). Test AKK je opisan 1997. godine, a izvodi se na automatskim koagulometrima sa foto-optičkim sistemom detekcije u uzorku plazme tokom i posle izvođenja APTT. Praćenjem promene transmisije svetlosti i vizuelizacijom na ekranu koagulometra dobija se kriva koja prikazuje stvaranje koaguluma. Sa početkom procesa koagulacije smanjuje se transmisija svetlosti što se prikazuje kao nagib krive, a po završetku koagulacije transmisija svetlosti se stabilizuje i prikazuje se ravna linija. Kod ubrzane fibrinolize transmisija svetlosti se povećava u post-koagulacijskoj fazi. Softverskom analizom krive (shema 6) izračunavaju se parametri koji koreliraju sa brzinom stvaranja i količinom stvorenog fibrina. Preliminarni rezultati su pokazali da ovaj test može dati korisne dodatne informacije u proceni kliničke težine hemofilije, a posebno zbog senzitivnosti testa za merenje nivoa FVIII:C <1 IJ/dl (108, 109).



Shema 6. AKK test - promena transmisije svetlosti pri procesu koagulacije
(<http://laboratory-manager.advanceweb.com/Article/Double-Vision-1.aspx>)

Test za merenje ukupnog hemostatskog potencijala

Test za merenje ukupnog hemostatskog potencijala (UHP) je jednostavan i brz globalni test hemostaze koji omogućava novi pristup u praćenju poremećaja hemostaze na osnovu procene sistema koagulacije i fibrinolize (110, 111). Test se zasniva na ponavljanim spektrofotometrijskim merenjima kojima se kontinuirano meri nivo fibrina u plazmi kojoj su prethodno dodate male količine trombina za aktivaciju sistema koagulacije i t-PA za aktivaciju sistema fibrinolize. S obzirom da je koagulacija gotovo odsutna kod teškog deficita FVIII i FIX, metod je modifikovan dodavanjem trombocitnog reagensa koji sadrži fosfolipide membrane trombocita i tkivni faktor. Krivom stvaranja fibrina se prikazuje proces u kome se fibrinogen delovanjem trombina postepeno pretvara u fibrin, dok delovanjem t-PA nastaje plazmin koji zatim razgrađuje fibrin. Površina ispod krive stvaranja fibrina u ispitivanom periodu predstavlja vrednost UHP (shema 7I). Ukupni koagulacijski potencijal (UKP), ukupni fibrinolitički potencijal (UFP) i vreme lize koaguluma (VLK) su dodatni parametri koji omogućavaju informacije o procesu koagulacije ili fibrinolize (shema 7II i 7III).



Shema 7. Parametri UHP testa (111): UHP – ukupni hemostatski potencijal, UKP – ukupni koagulacijski potencijal i UFP – ukupni fibrinolitički potencijal

(reprodukovano uz saglasnost Antović A.)

Ispitivana je primena UHP testa u proceni kliničke težine i terapijskog odgovora u poremećajima hemostaze sa sklonošću ka krvarenju. Rezultati ukazuju da primena UHP testa doprinosi izboru optimalnog terapijskog pristupa kod bolesnika sa hemofilijom A (112, 69) kao i da je korisna za praćenje primene koncentrata rFVIIa (113). Primena UHP testa se pokazala korisnom u proceni sklonosti ka trombozi kod bolesnika sa trombofilijom (114). Preliminarni rezultati ukazuju na opravdanost primene testa, ali su prospektivne studije na većem broju bolesnika potrebne da bi otpočela rutinska klinička primena (111).

Globalni testovi hemostaze u hemofiliji

Primena globalnih testova hemostaze može imati značajan uticaj na kliničke odluke kod hemofilije A u sledećim oblastima (70): 1) definisanje kliničke težine bolesti, 2) individualni pristup u proceni optimalnog terapijskog protokola, 3) praćenje terapije kod bolesnika sa inhibitorima i 4) procena efekta novih preparata za lečenje hemofilije.

S obzirom da klinička slika hemofilije A nije uvek u skladu sa nivoom FVIII:C ispitivana je uloga globalnih testova hemostaze u proceni kliničke težine hemofilije A. Primenom globalnih testova hemostaze pokazan je veći stepen heterogenosti između rezultata standardnih testova koagulacije i kliničkog fenotipa nego što je to ranije bilo prepoznato. Korelacija kliničkog fenotipa i globalnih testova hemostaze je pokazana u nekoliko studija. Bolesnici sa klinički teškim oblikom bolesti imaju manji kapacitet za stvaranje trombina (47, 56, 69), a korelacija je potvrđena i primenom tromboelastografije (107, 115). Prisustvo aktivnosti faktora koagulacije u tragovima, koje ne možemo detektovati standardnim testovima, zajedno sa drugim fiziološkim karakteristikama može imati značajan uticaj na hemostazu *in vivo*, a testovi globalne hemostaze mogu omogućiti bolje razumevanje ovih mehanizama. U teškim oblicima hemofilije veoma mala količina FVIII, ispod granica detekcije standardnim testovima može dovesti do stvaranja značajnih količina trombina (55). Ispitivanjem primenom AKK je pokazana senzitivnost za detekciju veoma niskih vrednosti FVIII u rasponu 0,2-1 IJ/dl (109).

Primena globalnih testova hemostaze može doprineti preciznijoj proceni individualnog odgovora na terapiju i tako obezbediti dodatne informacije za prilagođavanje terapijske ili

profilaktičke doza leka potrebama bolesnika. Rezultati *ex vivo* studija su pokazali da efekat iste doze kod bolesnika sa hemofilijom A veoma varira (112, 116, 47), a to je potvrđeno i *in vivo* ispitivanjima gde je posle infuzije terapijske doze koncentratata FVIII bolesnicima sa teškom hemofilijom A dokazano da su vrednosti FVIII:C 24 sata posle terapije veoma različite (102). Nekoliko studija je prikazalo preliminarne podatke koji potvrđuju da primena TGT i TEG (103, 115, 117) može doprineti boljoj proceni odgovora na terapiju kod dela bolesnika. Najznačajniji efekat ovog pristupa se može očekivati u individualnoj proceni veličine i učestalosti doze za profilaktičku terapiju kao i za prilagođavanje doziranja prilikom izvođenja hirurških intervencija. Očekuje se da bi se kod jednog dela bolesnika sa hemofilijom A adekvatna prevencija krvarenja mogla postići uz primenu manje doze ili ređu primenu koncentrata FVIII što bi omogućilo značajne uštede u količini lekova (70). Takođe, sve više se primenjuje profilaksa kod odraslih bolesnika kod kojih posle prekida profilakse dolazi do česte pojave hemartroza. Uloga globalnih testova hemostaze u prilagođavanju doze leka može biti značajna jer je poznato da se sa starenjem povećava ukupni hemostatski kapacitet (65, 118).

Praćenje terapije primenom lekova sa by-pass efektom kod bolesnika sa hemofilijom A i inhibitorima je složeno jer ne postoje specifični laboratorijski testovi niti preporuke za laboratorijsko ispitivanje. To je osnov za primenu globalnih testova hemostaze u cilju procene optimalnog preparata i doziranja, a posebno u slučaju hirurške intervencije. Preliminarni rezultati primene TGT, TEG, AKK kod bolesnika podvrgnutim hirurškim intervencijama pokazuju da globalni testovi hemostaze omogućavaju pouzdanu procenu terapijskog odgovora i prilagođavanje doze individualnim potrebama bolesnika (119).

Intenzivno se istražuju nove terapijske mogućnosti za unapređenje lečenja bolesnika sa hemofilijom. Pored primene koncentrata FVIII sa produženim delovanjem istražuje se mogućnost primene farmakoloških agenasa sa novim mehanizmima delovanja, koji ne podrazumevaju supstituciju FVIII, kao što je na primer inhibicija delovanja endogenog TFPI. Jedna od glavnih potencijalnih prepreka u primeni ovih novih lekova je mogućnost preciznog i jednostavnog merenja njihovog hemostatskog efekta, koja nije moguća primenom standardnih laboratorijskih testova dok globalni testovi hemostaze omogućavaju procenu terapijske efikasnosti bez obzira na vrstu primenjene terapije (120, 70).

CILJ

Cilj rada je:

1. Proceniti korelaciju ukupnog hemostatskog potencijala i nivoa aktivnosti FVIII kod bolesnika sa hemofilijom A
2. Ispitati značaj ukupnog hemostatskog potencijala u proceni sklonosti i težine krvarenja kod bolesnika sa hemofilijom A
3. Ispitati značaj ukupnog hemostatskog potencijala u proceni odgovora na terapiju
4. Ispitati faktore trombofilije i uticaj na ukupni hemostatski potencijal kod bolesnika sa hemofilijom A
5. Ispitati uticaj faktora trombofilije na sklonost i težinu krvarenja kod bolesnika sa hemofilijom A
6. Ispitati aktivnost TAFI kod bolesnika sa hemofilijom A
7. Ispitati značaj fibrinolize zavisne od TAFI u proceni sklonosti i težine krvarenja kod bolesnika sa hemofilijom A
8. Ispitati značaj fibrinolize zavisne od TAFI u praćenju odgovora na terapiju

MATERIJAL I METODE

Istraživanje je urađeno u periodu 2008-2009. godine. Na Odeljenju za ispitivanje poremećaja hemostaze u Institutu za transfuziju krvi Srbije prikupljeni su uzorci krvi za ispitivanja, urađeni su testovi hemostaze za ispitivanje faktora koagulacije (fibrinogena, FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, vWF:Akt, vWF:Ag), inhibitora FVIII i za ispitivanje trombofilije (aktivnost antitrombina, proteina C i proteina S i prisustvo rezistencija na APC i lupus antikoagulansa) i izvršena je klasifikacija bolesnika prema laboratorijskim i kliničkim parametrima težine hemofilije A. Na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo su urađena molekularno genetička ispitivanja faktora nasledne trombofilije (mutacija FVL, FII G20210A i MTHFR 677TT). Na Odeljenju za kliničku hemiju Univerzitetske bolnice Karolinska u Stokholmu urađeni su testovi za merenje nivoa TAFI i TAFIa/TAFIai i test UHP.

ISPITANICI

Bolesnici sa hemofilijom A

Ispitivanjem je obuhvaćeno je 76 bolesnika sa hemofilijom A uzrasta 11-64 godine, medijana 26,5 godina. Svi oboleli od hemofilije su registrovani u Registru bolesnika sa urođenim koagulopatijama koji se vodi na Odeljenju za ispitivanje poremećaja hemostaze u Institutu za transfuziju krvi Srbije. Među obolelim od hemofilije A je 75 osoba muškog pola i jedna osoba ženskog pola kod koje je isključeno prisustvo von Willebrandove bolesti tip 2N testiranjem afiniteta vezivanja FVIII i vWF koje je obavljeno u Centru za hemofiliju i trombozu „Angelo Bianchi Bonomi” u Milanu. Ispitivanjem inhibitora FVIII utvrđeno je prisustvo inhibitora kod 4 bolesnika sa hemofilijom A, a titar inhibitora je iznosio 1,4 BJ/ml, 2,4 BJ/ml, 2,6 BJ/ml odnosno 320 BJ/ml. Svi bolesnici sa hemofilijom A i inhibitorom su manifestovali laboratorijski i klinički težak oblik bolesti. Kod preostalih 72 bolesnika prisustvo inhibitora FVIII je isključeno.

Klasifikacija prema težini oboljenja

Prema vrednosti FVIII:C bolesnici su podeljeni u tri grupe: sa teškom hemofilijom A (FVIII:C <1 IJ/dl), umerenom hemofilijom A (FVIII:C 1-5 IJ/dl) i blagom hemofilijom A (FVIII:C >5–<40 IJ/dl), u skladu sa preporukama Internacionalnog udruženja za trombozu i hemostazu (50). Kinička težina hemofilije A je procenjena prema učestalosti spontanijih krvarenja u zglobove, tako da su na osnovu podataka iz anamneze bolesnici podeljeni u dve grupe. Bolesnici sa >3 spontane hemartroze godišnje su klasifikovani kao klinički težak oblik, a bolesnici sa ≤3 spontane hemartroze godišnje kao klinički blag oblik hemofilije, nezavisno od nivoa FVIII:C.

Terapija koncentratom FVIII

Kod 38 bolesnika sa teškim oblikom hemofilije A bez inhibitora primenjena je terapija koncentratom FVIII za zaustavljanje krvarenja u zglob u skladu sa uobičajenim terapijskim protokolom u centru gde se bolesnici leče. Bolesnici su primali terapiju ambulantno na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije, Univerzitetskoj dečjoj klinici i Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta „Dr Vukan Čupić“ u Beogradu, na Klinici za hematologiju i Dečjoj klinici za interne bolesti Kliničkog centra Niš i na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Vojvodine i Institutu za zaštitu dece i omladine u Novom Sadu. Koncentrat FVIII je primenjen u dozi od 1000-2000 IJ (raspon 11-31 IJ/kg, medijana 18 IJ/kg).

Kontrolna grupa

Ispitano je 30 dobrovoljnih davalaca krvi muškog pola, uzrasta 18-59 godina, medijana 40,5 godina. Anamnestički podaci su ukazivali na odsustvo sklonosti ka patološkim krvarenjima i trombozama. Takođe, nisu bila prisutna hronična oboljenja niti su ispitivane osobe uzimale lekove u periodu kad su uzimani uzorci krvi za ispitivanja.

UZIMANJE UZORAKA KRVI

Uzorci krvi su dobijeni venepunkcijom vena kubitalne regije. Venepunkcija je izvođena uz minimalno oštećenje tkiva da bi se izbegla aktivacija trombocita, sistema koagulacije i fibrinolize. Uzorci krvi su uzimani u vakutajner epruvete (*Vacutainer tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA*) koje sadrže 3,8% (0,129M) natrijum citrat, a odnos krvi i antikoagulansa je 10:1. Sadržaj epruvete je pažljivo izmešan okretanjem epruvete naniže tri puta. Uzorci krvi su centrifugirani u što kraćem roku po uzimanju krvi, a najdalje unutar 60 minuta od uzimanja. Za izvođenje testova hemostaze korišćena je plazma dobijena centrifugiranjem na 2000 g na sobnoj temperaturi (18-25⁰C) tokom 20 minuta (121). Uzorak plazme je podeljen na delove od po 500 µL koji su zamrznuti i čuvani na -70⁰C do izvođenja analiza. Deo uzoraka plazme je transportovan na suvom ledu na temperaturi od -70⁰C za testiranja koja su urađena u Stokholmu. Uzorci plazme su korišćeni za ispitivanje aktivnosti faktora koagulacije, prisustva inhibitora FVIII, za ispitivanje aktivnosti inhibitora koagulacije, prisustva rezistencije na APC i LA kao i za određivanje nivoa TAFI i TAFIa/TAFIai i merenje UHP. Uzorci ćelijskih elemenata su takođe zamrzavani i čuvani na -70⁰C do testiranja na prisustvo mutacija FVL, FII G20210A i MTHFR 677TT.

Uzorci krvi bolesnika sa hemofilijom A su uzimani najmanje 48 sati posle primene poslednje doze koncentrata FVIII, što približno odgovara četvostrukoj vrednosti poluživota FVIII u cirkulaciji. Za laboratorijsku procenu odgovora na terapiju uzorci krvi su uzimani 30 minuta posle terapije s obzirom da se najveći nivo FVIII:C dostiže u periodu 10-60 minuta posle terapije (61). U uzorku uzetom posle terapije ispitane su vrednosti FVIII:C, TAFI, TAFIa/TAFIai i UHP i upoređene su sa odgovarajućim vrednostima pre terapije koncentratom FVIII.

METODE ISPITIVANJA

Ispitivanje ukupnog hemostatskog potencijala

Ukupni hemostatski potencijal je određivan po metodi He i sar. (110) gde se aktivacija procesa koagulacije i fibrinolize u ispitivanoj plazmi odvija posle dodavanja trombina i tkivnog aktivatora plazminogena. S obzirom da je koagulacija izrazito snižena i gotovo odsutna kod teškog deficita FVIII i FIX, metoda je modifikovana dodavanjem trombocitnog reagensa koji sadrži fosfolipide membrane trombocita i tkivni faktor (112). Test se zasniva na ponavljanim spektrofotometrijskim merenjima kojima se kontinuirano meri nivo fibrina u plazmi koji je rezultat dva procesa: sa jedne strane delovanja trombina koji pretvara fibrinogen u fibrin, a sa druge strane delovanja tkivnog aktivatora plazminogena što dovodi do stvaranja plazmina koji razgrađuje fibrin. Svaka vrednost absorbancije pokazuje nivo fibrina u određenom trenutku i na osnovu tih vrednosti se dobija kriva stvaranja fibrina koja prikazuje balans sinteze i razgradnje fibrina. Površina ispod krive stvaranja fibrina u ispitivanom periodu predstavlja vrednost ukupnog hemostatskog potencijala (shema 7I - UHP).

Ukupni koagulacijski potencijal, ukupni fibrinolitički potencijal i vreme lize koaguluma su dodatni parametri koji omogućavaju informacije o procesu koagulacije ili fibrinolize. Za procenu ukupnog koagulacijskog potencijala prati se proces koagulacije posle dodavanja male količine trombina za aktivaciju sistema koagulacije. Ponavljanim spektrofotometrijskim merenjem se formira kriva stvaranja fibrina, a površina ispod nje odgovara ukupnom koagulacijskom potencijalu (shema 7II - UKP). Ukupna fibrinolitička aktivnost u ispitivanom uzorku plazme se može proceniti na osnovu ukupnog fibrinolitičkog potencijala, koji se izračunava pomoću vrednosti UHP i UKP (shema 7III - UFP), kao i na osnovu i vremena lize koaguluma (VLK) koje se izračunava na osnovu praćenja krive stvaranja fibrina i vrednosti UHP tokom 120 minuta.

Priprema trombocitnog reagensa. Trombocitni reagens (*Unicorn Diagnostics Ltd, London, UK*) je liofilizovani preparat trombocitne membrane dobijen iz suspenzije koja sadrži oprane normalne humane trombocite. Trombocitni reagens se rekonstituiše sa 3 ml

destilovane vode i sadrži fosfolipide trombocitne membrane proporcionalno broju trombocita od 70×10^6 /ml i tkivni faktor u koncentraciji od 40 pg/ml. Rekonstituisani reagens se čuva u malim zapreminama na -70°C .

Priprema radnih pufera. Radni puferi se pripremaju neposredno pred izvođenje testa, a osnov je Tris pufer (66 mmol/l Tris + 130 mmol/l NaCl, pH 7,5 prilagođen sa 4 mol/l HCl) kome se dodaje kalcijum hlorid (finalna koncentracija 35 mmol/l). Tris pufer A se priprema dodavanjem goveđeg trombina (*Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri, USA*) u finalnoj koncentraciji 0,1 IU/ml i tkivnog aktivatora plazminogena (*Actilyse; Boehringer, Ingelheim, Germany*) u finalnoj koncentraciji 862 ng/ml. Tris pufer A se koristi za određivanje UHP. Rastvor Tris pufer B se priprema dodavanjem samo goveđeg trombina (*Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri, USA*) u finalnoj koncentraciji 0,1 IU/ml. Tris pufer B se koristi za određivanje UKP.

Procedura testiranja. U udubljenja na mikrotitarskoj ploči (*Immulon-IB; Dynex Technologies, Chantilly, Virginia, USA*) se sipa po 70 μl ispitivane plazme, dodaje se po 10 μl trombocitnog reagensa i sadržaj se izmeša. Posle toga se dodaje po 50 μl Tris pufera A i zatim se očitava vrednost absorbancije (Abs) svakog minuta tokom 40 minuta pomoću spektrofotometra (*Multiskan-MCC/340; Labsystem, Helsinki, Finland*) na talasnoj dužini od 405 nm. Na osnovu ovih vrednosti se konstruiše kriva stvaranja fibrina. Površina ispod krive se izražava kao suma vrednosti absorbancija (Abs-sum) i ta vrednost predstavlja parametar UHP (shema 7). Raspon normalnih vrednosti za parametar UHP iznosi 4,24-14,49.

Za određivanje UKP se spovodi ista procedura osim što se umesto Tris pufera A koristi Tris pufer B. Površina ispod dobijene krive stvaranja fibrina se izražava kao suma vrednosti absorbancija (Abs-sum) i ta vrednost predstavlja parametar UKP. Raspon normalnih vrednosti za parametar UKP iznosi 6,79-20,03.

Ukupna fibrinolitička aktivnost u ispitivanoj plazmi se može proceniti na osnovu parametra UFP koji odgovara razlici između površina koje odgovaraju vrednostima UHP i UKP i izračunava se pomoću formule $\text{UFP} = (\text{UKP} - \text{UHP}) / \text{UKP} \times 100\%$. Raspon normalnih vrednosti za parametar UFP iznosi 16,5-52%.

Za procenu ukupne fibrinolitičke aktivnosti se koristi i parametar vreme lize koaguluma (81). Vreme lize koaguluma se određuje korišćenjem krive stvaranja fibrina koja se dobija sa istim reagensima i pod istim uslovima kao i kriva stvaranja fibrina za određivanje UHP, samo što se adsorbancija meri svakog minuta tokom 120 minuta. Vreme lize koaguluma se definiše kao vreme od srednje tačke između nulte i maksimalne absorbancije do srednje tačke između maksimalne absorbancije i njenog ponovnog povratka na nultu vrednost.

Parametar VLK se može koristiti i za procenu fibrinolize zavisne od TAFI. Potrebno je odrediti VLK sa i bez *in vitro* dodavanja specifičnog inhibitora TAFI (inhibitor karboksipeptidaze iz krompira) u finalnoj koncentraciji 50 µg/mL. Izračunavanjem skraćanja vremena lize koaguluma posle dodavanja specifičnog inhibitora TAFI određuje se parametar VLK dif na osnovu koga se može indirektno proceniti stvaranje TAFI. Normalne vrednosti za parametar VLK iznose 23-30 minuta, a normalne vrednosti za VLK dif su u rasponu 13-21 minuta.

Korišćenjem mikrotitarske ploče sa 97 polja i jednostavnog čitača ELISA testova može biti ispitano 27 uzoraka za manje od sat vremena, uključujući pripremu pufera i izračunavanje rezultata koje se izvodi korišćenjem Microsoft Excel programa (77).

Ispitivanje TAFI

Ispitivanje proenzima TAFI

Za merenje koncentracije proenzima TAFI korišćen je ELISA test (*Asserachrom TAFI antigen kit; Diagnostica Stago, Asnieres, France*) kojim se određuje količina antigena TAFI. Test je visoko specifičan za proenzim TAFI jer ne pokazuje reaktivnost sa aktiviranom (TAFIa) i neaktiviranom formom TAFI (TAFIai), ne detektuje karboksipeptidazu N prisutnu u plazmi i nezavisan je od Thr325Ile i Ala147Thr polimorfizama TAFI gena koji utiču na stabilnost TAFI (90, 92).

Ispitivana plazma se diluira dodavanjem pufera u odnosu 1:101 (10 µl uzorka + 1000 µl pufera). U polje mikrotitarske ploče se dodaje po 200 µL uzorka diluirane ispitivane

plazme. U prvoj fazi se vrši vezivanje TAFI za polja na mikrotitarskoj ploči koja su obložena F(ab')₂ fragmentima primarnog monoklonskog anti-TAFI antitela specifičnog za humani molekul TAFI. Ploča se pokrije i sadržaj se inkubira jedan sat na sobnoj temperaturi (18-25⁰C) i tako se vrši imobilizacija odnosno vezivanje antigena. Zatim se polja mikrotitarske ploče pet puta ispiraju koncentrovanim sredstvom za ispiranje i odmah se dodaje 200 µl reagensa koji sadrži sekundarno monoklonsko antitelo, specifično za drugu antigensku determinantu molekula humanog TAFI, koje je vezano za peroksidazu. Ploča se opet pokrije i sadržaj se inkubira jedan sat na sobnoj temperaturi i tako se vrši imobilizacija imunokonjugata. Zatim se polja ponovo pet puta ispiru koncentrovanim sredstvom za ispiranje i odmah se dodaje 200 µL rastvora tetra-metil benzidina (TMB) koji je supstrat za peroksidazu. Sadržaj se inkubira na sobnoj temperaturi tačno 5 minuta i u tom periodu delovanjem peroksidaze na TMB substrat dolazi do razvoja boje. Za zaustavljanje ove reakcije dodaje se 50 µl 1M sumporne kiseline i sadržaj polja se blago izmeša kružnim pokretima mikrotitarske ploče. Posle 15 minuta meri se absorbancija na 450 nm koja je direktno proporcionalna nivou TAFI u ispitivanom uzorku. Rezultat se izračunava na osnovu kalibracione krive koja se dobija merenjem absorbancija razblaženja TAFI kalibratora tj. preparata koji sadrži poznatu količinu TAFI (1:2, 1:4, 1:18, 1:16), a izražava se u µg/ml. Raspon normalnih vrednosti iznosi 6,1-12,1 µg/ml.

Ispitivanje kompleksa aktivne i inaktivne forme TAFI

Za merenje koncentracije kompleksa TAFI_a/TAFI_{ai} korišćen je ELISA test (*Asserachrom TAFI_a/TAFI_{ai} antigen kit; Diagnostica Stago*) koji meri ukupnu količinu kompleksa aktivne i inaktivne forme molekula TAFI. Koncentracija TAFI_a/TAFI_{ai} je proporcionalna količini aktivne forme TAFI koju je teško direktno izmeriti zbog nestabilnosti. Ovaj test je visoko specifičan usled odsustva reaktivnosti sa proenzimom TAFI (90, 93).

Ispitivana plazma se diluira dodavanjem pufera u odnosu 1:101 (10 µl uzorka + 1000 µl pufera). U polje mikrotitarske ploče se dodaje 200 µL uzorka diluirane ispitivane plazme. U prvoj fazi se vrši vezivanje TAFI za polja na mikrotitarskoj ploči koja su

obložena primarnim mišjim monoklonskim antitelima na humani kompleks TAFIa/TAFIai. Ploča se pokrije i sadržaj se inkubira jedan sat na sobnoj temperaturi (18-25⁰C) i tako se vrši imobilizacija antigena. Zatim se polja mikrotitarske ploče pet puta ispiraju koncentrovanim sredstvom za ispiranje i odmah se dodaje 200 µl reagensa koji sadrži sekundarno mišije monoklonsko antitelo na humani kompleks TAFIa/TAFIai vezano sa peroksidazom. Ploča se opet pokrije i sadržaj se inkubira 1 sat na sobnoj temperaturi i tako se vrši imobilizacija imunokonjugata. Zatim se polja ponovo pet puta isperu koncentrovanim sredstvom za ispiranje i odmah se dodaje 200 µL rastvora tetra-metil benzidina (TMB) koji je supstrat za peroksidazu. Sadržaj se inkubira na sobnoj temperaturi tačno 5 minuta i u tom periodu delovanjem peroksidaze na TMB substrat dolazi do razvoja boje. Za zaustavljanje ove reakcije dodaje se 50µl 1M sumporne kiseline i sadržaj polja se blago izmeša kružnim pokretima mikrotitarske ploče. Posle 15 minuta meri se absorbancija na 450nm koja je direktno proporcionalna nivou TAFIa/TAFIai u ispitivanom uzorku. Rezultat se izračunava na osnovu kalibracione krive koja se dobija merenjem absorbancija razblaženja TAFI kalibratora tj. preparata koji sadrži poznatu količinu TAFI (1:2, 1:4, 1:18, 1:16), a izražava se u ng/ml. Raspon normalnih vrednosti iznosi 1,76-28,84 ng/ml.

Testovi koagulacije

Ispitivanje aktivnosti faktora koagulacije, prisustva inhibitora FVIII, aktivnosti inhibitora koagulacije i prisustva rezistencije na APC i lupus antikoagulansa je urađeno na automatskom koagulometru ACL ELITE-PRO (*Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, USA*) korišćenjem reagenasa HemosIL (*Instrumentation Laboratory SpA, Milano, Italy*). Za izvođenje testova i kontrolu korišćeni su diluensi (*HemosIL Factor Diluent, HemosIL Sample Diluent*), standardna plazma (*HemosIL Calibration Plasma*) i kontrolne plazme (*HemosIL Normal Control, HemosIL Special Test Control Level 1, HemosIL Special Test Control Level 2, HemosIL Low Abnormal Control*) istog proizvođača.

Ispitivanje aktivnosti faktora VIII

Za određivanje aktivnosti FVIII korišćen je jednostepeni koagulacijski test. Test se zasniva na poređenju sposobnosti ispitivane i standardne plazme, koja sadrži poznati stepen aktivnosti faktora koagulacije, da koriguju APTT deficitne plazme. Deficitna plazma sadrži <1 IJ/dl aktivnosti FVIII:C i normalne aktivnosti ostalih faktora koagulacije (84).

U ispitivanu plazmu se dodaje FVIII deficitna plazma (*HemosIL Factor VIII Deficient Plasma*) i cefaloplastin koji sadrži kalcijum hlorid (*HemosIL Lyophilized Silica*). Sadržaj kivete se izmeša, inkubira se na 37⁰C i zabeleži se vreme pojave koagulacije u mešavini. Korekcija vremena koagulacije deficitne plazme je proporcionalna aktivnosti FVIII u uzorku ispitivane plazme. Rezultat se izračunava na osnovu referentne krive koja se dobija određivanjem vremena koagulacije razblaženja standardne plazme u diluensu, a rezultat se izražava u procentima normalnih vrednosti gde 100% odgovara aktivnosti faktora od 100 IJ/dl. Raspon normalnih vrednosti iznosi 50-150 IJ/dl (122).

Za precizno merenje vrednosti FVIII:C <10 IJ/dl korišćena je referentna kriva koja se dobija određivanjem vremena koagulacije razblaženja standardne plazme većeg stepena koja sadrže 6,25%, 3,125% i 1,56% aktivnosti FVIII:C. Takođe, rađena je i dodatna „blanko“ kontrola odnosno merenje FVIII:C u mešavini diluensa i FVIII deficitne plazme gde vrednost FVIII:C iznosi <1 IJ/dl.

Ispitivanje inhibitora faktora VIII

Za određivanje titra inhibitora korišćen je Bethesda test koji se zasniva na svojstvu inhibitora da progresivno neutrališu FVIII:C u pulu normalne plazme. Jedna Bethesda jedinica inhibitora neutrališe 50% FVIII:C u pulu normalne plazme posle dva sata inkubacije na 37⁰C (122).

Za ispitivanje kod bolesnika kod kojih se ne očekuje prisustvo inhibitora ili su prisutni inhibitori niskog titra <2 BJ/ml pripremi se test mešavina od jednakih količina pula normalne plazme i ispitivane plazme i kontrolna mešavina od jednakih količina pula normalne plazme i imidazol pufera. Kontrolna mešavina se ispituje jer deo FVIII u

ispitivanoj mešavini propada zbog termolabilnosti. Posle inkubacije 37⁰C tokom dva sata odredi se FVIII:C u obe mešavine. Na osnovu procenta rezidualnog FVIII:C se očita titar inhibitora sa grafikona koji prikazuje odnos rezidualnog FVIII:C i titra inhibitora. Za ispitivanje kod bolesnika kod kojih se očekuje prisustvo inhibitora u titru >2 BJ/mL potrebno je prethodno pripremiti dilucije ispitivane plazme sa imidazol puferom. Za sve pojedinačne dilucije izračunati procenat rezidualnog FVIII. Titar inhibitora se računa sa grafikona na osnovu vrednosti rezidualnog FVIII koja je u rasponu 25-75%, jer je za te vrednosti prisutan linearan odnos rezidualnog FVIII sa titrom inhibitora FVIII. Najpreciznija vrednost rezidualnog FVIII je ona koja je najbliža vrednosti 50% i za tu vrednost se očita titar inhibitora sa grafikona. Titar se zatim pomnoži sa stepenom dilucije ispitivane plazme i tako se dobije finalni titar inhibitora. Ukoliko je titar inhibitora < 1BJ/ml smatra se da inhibitori FVIII nisu prisutni.

Ispitivanje aktivnosti faktora IX, XI i XII

Za određivanje aktivnosti FIX, FXI i FXII korišćen je jednostepeni koagulacijski test (122). Testiranje se izvodi istim postupkom kao za određivanje aktivnosti FVIII uz korišćenje odgovarajuće deficitne plazme (*HemosIL Factor IX Deficient Plasma; HemosIL Factor XI Deficient Plasma; HemosIL Factor XII Deficient Plasma*). Raspon normalnih vrednosti iznosi 50-150 IJ/dl.

Ispitivanje aktivnosti faktora II, V, VII i X

Za određivanje aktivnosti FII, FV, FVII i FX korišćen je jednostepeni koagulacijski test u kome se poredi sposobnost ispitivane i standardne plazme da koriguju PT deficitne plazme (122). Testiranje se izvodi istim postupkom kao za merenje aktivnosti FVIII uz korišćenje odgovarajuće deficitne plazme (*HemosIL Factor VII Deficient Plasma; HemosIL Factor V Deficient Plasma; HemosIL Factor VII Deficient Plasma; HemosIL Factor X Deficient Plasma*) i tromboplastina sa kalcijum hloridom (*HemosIL PT-Fibrinogen Recombinant*). Raspon normalnih vrednosti iznosi 50-150 IJ/dl.

Ispitivanje koncentracije fibrinogena

Za određivanje koncentracije fibrinogena korišćena je metoda po Claussu. U testu se upoređuje trombinsko vreme ispitivane i standardne plazme u prisustvu visokih koncentracija trombina (30-100 J/ml), a pri niskim koncentracijama fibrinogena u diluiranoj plazmi, kada je vreme koagulacije proporcionalno koncentraciji fibrinogena (84).

Za izvođenje testa je korišćen reagens koji sadrži goveđi trombin sa kalcijum hloridom (*HemosIL Fibrinogen-C*). U ispitivanu plazmu, koja je zagrejana na 37⁰C, dodaje se goveđi trombin sa kalcijum hloridom i zabeleži se vreme pojave koagulacije u mešavini. Rezultat se izračunava na osnovu referentne krive koja se dobija određivanjem vremena koagulacije razblaženja standardne plazme, a rezultati se izražavaju u g/l. Raspon normalnih vrednosti iznosi 2,20-4,96 g/L.

Ispitivanje aktivnosti von Willebrandovog faktora

Za određivanje aktivnosti von Willebrandovog faktora korišćena je imunoturbodimetrijska metoda koja se zasniva na aglutinaciji lateks čestica obloženih anti-vWF antitelima posle vezivanja vWF iz ispitivane plazme (85).

U ispitivanu plazmu dodaje se reagens (*HemosIL von Willebrand Factor Activity*) koji sadrži lateks čestice obložene mišijim monoklonskim anti-vWF antitelima koja su specifično usmerena na vezno mesto vWF za receptor GPIb na membrani trombocita. Sadržaj kivete se izmeša i inkubira na 37⁰C. Vezivanjem antitela i vWF iz plazme dolazi do aglutinacije lateks čestica, a stepen aglutinacije je direktno proporcionalan vWF: Akt i meri se na osnovu stepena sniženja transmisije svetlosti usled prisustva aglutinata. Rezultat se izračunava na osnovu referentne krive koja se dobija određivanjem stepena aglutinacije razblaženja standardne plazme. Raspon normalnih vrednosti iznosi 50-150 IJ/dl.

Ispitivanje koncentracije antigena von Willebrandovog faktora

Za određivanje koncentracije antigena von Willebrandovog faktora korišćena je imunoturbodimetrijska metoda. Metoda se zasniva aglutinaciji lateks čestica obloženih anti-vWF antitelima posle vezivanja vWF iz ispitivane plazme (123).

U ispitivanu plazmu dodaje se reagens (*HemosIL von Willebrand Factor Antigen*) koji sadrži lateks čestice obložene zečijim poliklonskim anti-vWF antitelima. Sadržaj kivete se izmeša i inkubira na 37⁰C. Vezivanjem antitela i vWF iz plazme dolazi do aglutinacije lateks čestica, a stepen aglutinacije je direktno proporcionalan koncentraciji vWF:Ag i meri se na osnovu stepena sniženja transmisije svetlosti usled prisustva aglutinata. Rezultat se izračunava na osnovu referentne krive koja se dobija određivanjem stepena aglutinacije razblaženja standardne plazme. Raspon normalnih vrednosti iznosi 50-150 IJ/dl.

Ispitivanje aktivnosti antitrombina

Za određivanje aktivnosti antitrombina je korišćen hromogeni test, koji se zasniva na inhibiciji FXa delovanjem antitrombina (124).

Testiranje se vrši korišćenjem reagensa (*HemosIL Antithrombin*) koji se sastoji od FXa reagensa i hromogenog supstrata. U ispitivanu plazmu se prvo dodaje FXa reagens koji sadrži goveđi FXa i heparin i mešavina se inkubira na 37⁰C. Aktivnost preostalog FXa se meri posle dodavanja hromogenog supstrata iz koga se delovanjem FXa oslobađa boja p-nitroanilin. Stepem promene boje je obrnuto proporcionalan aktivnosti antitrombina u ispitivanom uzorku. Aktivnost antitrombina izračunava se na osnovu poređenja sa referentnom krivom koja se dobija ispitivanjem razblaženja standardne plazme. Rezultat se izražava se u procentima normalnih vrednosti gde 100% odgovara aktivnosti antitrombina od 100 IU/dl. Raspon normalnih vrednosti iznosi 83-128 IJ/dl.

Ispitivanje aktivnosti proteina C

Za određivanje aktivnosti proteina C je korišćen hromogeni test koji se zasniva na aktivaciji proteina C delovanjem aktivatora proteina C (124).

Za testiranje je korišćen reagens (*HemosIL Protein C*) koji se sastoji od aktivatora proteina C i hromogenog supstrata. U ispitivanu plazmu se dodaje aktivator protein C poreklom iz zmijskog otrova i posle inkubacije na 37⁰C dodaje se hromogeni supstrat. Meri se aktivnost nastalog APC koji iz hromogenog supstrata izdvaja p-nitroanilin. Stepenn promene boje je direktno proporcionalan aktivnosti APC u uzorku i izračunava se na osnovu poređenja sa referentnom krivom koja se dobija ispitivanjem razblaženja standardne plazme. Raspon normalnih vrednosti je 65-140 IJ/dl.

Ispitivanje aktivnosti proteina S

Za određivanje aktivnosti proteina S je korišćen koagulacijski test za procenu aktivnosti slobodnog proteina S. Testom se procenjuje uloga proteina S kao kofaktora proteina C na osnovu stepena produženja PT u mešavini ispitivane plazme i protein S deficitne plazme (124).

Za testiranje je korišćen reagens (*HemosIL Pro S*) koji se sastoji od protein S deficitne plazme i protein S reagensa. U ispitivanu plazmu se prvo dodaje protein S deficitna plazma, a zatim protein S reagens koji sadrži rekombinantni zečiji tkivni faktor, sintetske fosfolipide, kalcijum hlorid i APC. Posle inkubacije na 37⁰C izmeri se vreme koagulacije. Produženje vremena koagulacije protein S deficitne plazme je proporcionalno aktivnosti proteina S u ispitivanoj plazmi i izračunava se na osnovu poređenja sa referentnom krivom koja se dobija ispitivanjem razblaženja standardne plazme. Raspon normalnih vrednosti iznosi 63-135 IJ/dl.

Ispitivanje rezistencije na aktivirani protein C

Rezistencija na APC se meri poređenjem vrednosti APTT u uzorku ispitivane plazme pre i posle dodavanja standardne količine APC. Kada rezistencija nije prisutna, dodati APC inaktivira FVa i FVIIIa i dolazi do bar dvostrukog ili većeg produženja vremena koagulacije. U prisustvu rezistencije na APC usporena je inaktivacija FVa i izostaje očekivano produženje vremena koagulacije. Modifikacijom testa, gde se APTT određuje u mešavini ispitivane plazme sa FV deficitnom plazmom, značajno se povećava senzitivnost i specifičnost za detekciju rezistencije na APC usled prisustva mutacije FVL (124, 125).

Korišćen je modifikovani test za detekciju rezistencije na APC (*HemosIL Factor V Leiden - APCTM Resistance V*). Ispitivana plazma se diluira dodavanjem FV deficitne plazme u odnosu 1:5, a zatim se dodaje APTT reagens. Posle inkubacije na 37⁰C za pokretanje procesa koagulacije se u jednu kivetu dodaje standardna količina APC i kalcijum hlorid, a u drugu samo kalcijum hlorid i zabeleži se vreme koagulacije u obe mešavine. Rezultat se izražava kao APC ratio tj. odnos vremena koagulacije ispitivane plazme sa i bez standardne količine APC. Na prisustvo APC rezistencije ukazuje APC ratio <2 odnosno ukoliko posle dodavanja APC u ispitivanu plazmu ne dođe do bar dvostrukog produženja vremena koagulacije.

Ispitivanje lupus antikoagulansa

Ispitivanje prisustva LA se zasniva na sposobnosti antitela da *in vitro* produžava vreme koagulacije u testovima koji zavise od fosfolipida. Neutralizacija inhibitornog efekta, odnosno korekcija produženog vremena koagulacije, posle dodavanja fosfolipida u višku potvrđuje prisustvo LA. Za detekciju LA se koristi test koagulacije sa razblaženim Russellovim zmijskim otrovom (DRVVT). Ovaj otrov direktno aktivira FX i dolazi do stvaranja trombina i fibrina. Za skrining se koristi reagens koji pored otrova sadrži malu količinu fosfolipida što ga čini osetljivim na prisustvo LA. Za potvrdni test se koristi reagens koji pored otrova sadrži velike količine fosfolipida što omogućava neutralizaciju LA i potvrđivanje njegovog prisustva (124, 126)

Za detekciju LA je korišćen reagens (*HemosIL LAC screen/LAC confirm*) koji se sastoji od LAC screen i LAC confirm reagensa. U ispitivanu plazmu se dodaje reagens LAC screen i posle inkubacije na 37⁰C izmeri se vreme koagulacije u sekundama. U drugu kivetu sa istom ispitivanom plazmom se doda reagens LAC confirm i ponovi se ista procedura. Rezultat se izražava kao normalizovani LAC odnos koji se izračunava na osnovu LAC Screen odnosa i LAC Confirm odnosa. LAC screen odnos se dobija kada se podeli vreme koagulacije ispitivane plazme sa vremenom koagulacije pula normalne plazme u prisustvu reagensa LAC screen. Na isti način se računa LAC confirm odnos. Normalizovani LAC odnos se izračunava kada se LAC screen odnos podeli sa LAC confirm odnosom. Na prisustvo LA ukazuje normalizovani LAC odnos >1,2.

Molekularno genetički testovi

Ispitivanje mutacija FV Leiden, FII G20210A i MTHFR 677TT

Detekcija mutacija FVL, FII G20210A i MTHFR 677TT je urađena molekularno genetičkim metodama na uzorcima DNK izolovanim iz limfocita periferne krvi primenom komercijalnog kita i protokola (*QIAamp DNA Mini Kit-QIAGEN*). Prinos i kvalitet deoksiribonukleinske kiseline (DNK) je analiziran elektroforezom na agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije (0,8-2%), u zavisnosti od veličine molekula DNK koje je potrebno razdvojiti. Za određivanje veličine fragmenata DNK korišćeni su odgovarajući komercijalni DNK markeri (*NE BioLabs*).

Za detekciju mutacija je korišćena metoda koja se zasniva na PCR-RPLP tehnici (124, 127). Reakcija lančanog umnožavanja DNK (*PCR-Polymerase Chain Reaction*) omogućava umnožavanje željenog fragmenta DNK iz minimalne količine početnog materijala, korišćenjem termostabilne *Taq* polimeraze i odgovarajućih prajmera. Umnoženi fragmenti DNK su digestirani odgovarajućim restriktionim enzimima. U umnoženim DNK fragmentima je zatim ispitivano postojanje promene u sekvenci u zavisnosti od prisustva/odsustva mutacije što kreira novo ili ukida postojeće mesto prepoznavanja odgovarajućeg restriktionog enzima. Na taj način je u umnoženim fragmentima DNK, na

osnovu razlike u dužini fragmenata posle obrade restrikcijom enzimom, omogućeno razlikovanje normalnog i mutiranog alela (*RFLP – Restriction Fragment Length Polimorphisms*). Produkti digestije DNK restrikcijom enzimima su razdvajani elektroforezom na nedenuirajućim 10% poliakriamidnim gelovima. Vizuelizacija DNK je vršena bojenjem gelova srebro nitratom.

Za detekciju mutacije FVL se vrši digestija amplifikovane DNK delovanjem restrikcijom enzima *MnII*. Mutacija FVL ukida jedno restriktivno mesto za ovaj enzim, tako da se digestijom produkta PCR amplifikacije dužine 267-baza parova (bp) u prisustvu normalnog alela dobijaju tri DNK fragmenta dužine 163-, 67-, 37-bp, a u prisustvu mutiranog alela dva DNK fragmenta dužine 200- i 67-bp.

Za detekciju mutacije FII G20210A se vrši digestija amplifikovane DNK dužine 345-bp delovanjem restrikcijom enzima *HindIII*. Prisustvo mutacije FII G20210A stvara restriktivno mesto za ovaj enzim, tako da izostaje digestija neizmenjenog gena, a digestijom mutiranog gena nastaju dva fragmenta dužine 322- i 23-bp.

Za detekciju mutacije MTHFR 677TT digestija amplifikovane DNK dužine 198-bp se vrši delovanjem restrikcijom enzima *HinfI*. Prisustvo mutacije MTHFR 677TT stvara restriktivno mesto za ovaj enzim, tako da izostaje digestija neizmenjenog gena, a digestijom mutiranog gena nastaju dva fragmenta dužine 175- i 23-bp.

Statistička obrada podataka

U prvoj fazi statističke obrade rezultata formirana je baza podataka, a za njenu obradu su korišćeni programi SPSS verzija 12.1 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*), GraphPad prism, verzija 3.0 (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*). Podaci su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Vrednosti $p < 0,05$ su smatrane statistički značajnim.

U istraživanju su od metoda deskriptivne statistike primenjene:

- a) mere centralne tendencije: aritmetička sredina (X) i medijana (Med)
- b) mere varijabiliteta: interval varijacije (Min-Max), standardna devijacija (SD) i standardna greška aritmetičke sredine (SE)

c) raspored relativnih frekvencija: 95% interval

Od metoda analitičke statistike u istraživanju su primenjene:

a) metode za procenu značajnosti razlike

- Studentov t-test za nevezane uzorke
- Studentov t-test za vezane uzorke
- Fisherov test tačne verovatnoće

b) metode za procenu povezanosti razlike:

- koeficijent linearne korelacije
- Spirmanov koeficijent korelacije ranga

c) metode za procenu značajnosti zavisnosti

- multivarijantna analiza.

REZULTATI

RASPODELA BOLESNIKA SA HEMOFILIJOM A PREMA STEPENU DEFICITA FVIII:C

U tabeli 2 je prikazana raspodela bolesnika sa hemofilijom A u odnosu na stepen deficita FVIII:C. Teška hemofilija A je prisutna kod 56/76 (73,69%) bolesnika, umerena hemofilija A kod 9/76 (11,84%) bolesnika, a blaga hemofilija A kod 11/76 (14,47%) bolesnika.

Tabela 2. Raspodela bolesnika sa hemofilijom A prema stepenu deficita FVIII:C

Hemofilija A	FVIII:C (IJ/dl)	Broj bolesnika	Procenat
Teška	<1	56	73,69%
Umerena	1- 5	9	11,84%
Blaga	>5 – <40	11	14,47%
Ukupno		76	100%

REZULTATI ISPITIVANJA FVIII:C I UHP U GRUPI BOLESNIKA SA HEMOFILIJOM A I KONTROLNOJ GRUPI

Rezultati ispitivanja FVIII:C kod grupa bolesnika sa teškom, umerenom i blagom hemofilijom A i kod kontrolne grupe su prikazani u tabeli 3. Vrednosti su iznosile $0,50 \pm 0,28$ IJ/dl za tešku hemofiliju A, $2,54 \pm 1,31$ IJ/dl za umerenu, $16,68 \pm 7,86$ IJ/dl za blagu hemofiliju A. U kontrolnoj grupi vrednosti FVIII:C su iznosile $106,45 \pm 23,18$ IJ/dl.

Tabela 3. Vrednosti FVIII:C kod grupa bolesnika sa teškom, umerenom i blagom hemofilijom A i kod kontrolne grupe

Grupe		Hemofilija A			Kontrolna grupa
		Teška	Umerena	Blaga	
FVIII:C (IJ/dl)	X	0,50	2,54	16,68	106,45
	SD	0,28	1,31	7,86	23,18
	Min-Max	0,07-0,98	1,14-4,50	7,77-34,60	57,20-150,00
	Med	0,447	2,357	15,50	104,50
	SE	0,037	0,435	2,371	4,231
	95% int	0,43-0,58	1,53-3,54	11,40-21,96	97,80-115,10
Broj bolesnika		56	9	11	30

U tabeli 4 je prikazano je da su srednje vrednosti FVIII:C statistički značajno niže kod teške hemofilije A u odnosu na umerenu ($p < 0,0001$), kod umerene hemofilije A u odnosu na blagu ($p < 0,0001$) i kod blage hemofilije A u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0001$).

Tabela 4. Značajnost razlika srednjih vrednosti FVIII:C između grupa bolesnika sa teškom, umerenom i blagom hemofilijom A i kod kontrolne grupe

Test	Grupe	t	df	ΔX	p
FVIII:C	Teška vs Umerena hemofilija A	-10,62	63	-2,04	0,00
	Umerena vs Blaga hemofilija A	-5,31	18	-14,14	0,00
	Blaga hemofilija A vs Kontrolna grupa	-12,55	39	-89,77	0,00

Rezultati ispitivanja UHP kod grupa bolesnika sa teškom, umerenom i blagom hemofilijom A i kontrolne grupe su prikazani u tabeli 5. Vrednosti UHP iznosile su $0,32 \pm 0,99$ za tešku hemofiliju A, $1,53 \pm 1,64$ za umerenu hemofiliju A odnosno $4,13 \pm 2,42$ za blagu hemofiliju A, a vrednosti u kontroloj grupi su iznosile $9,90 \pm 4,70$.

Tabela 5. Vrednosti UHP kod grupa bolesnika sa teškom, umerenom i blagom hemofilijom A i kod kontrolne grupe

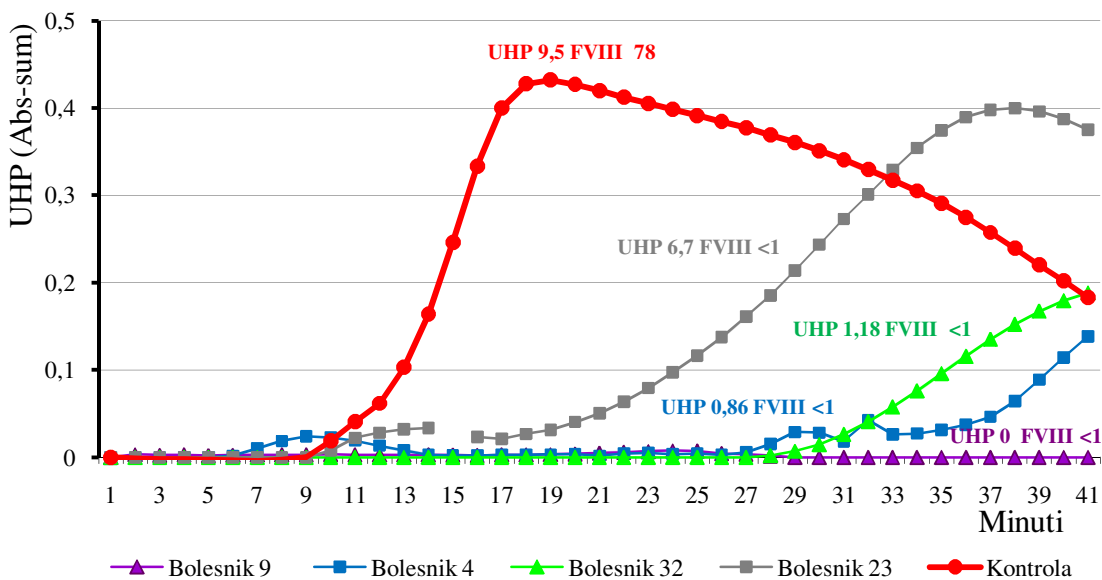
Grupe		Hemofilija A			Kontrolna grupa
		Teška	Umerena	Blaga	
UHP (Abs-sum)	X	0,32	1,53	4,13	9,90
	SD	0,99	1,64	2,42	4,70
	Min-Max	0-6,70	0-4,56	1,41-8,24	3,48-23,22
	Mdn	0	1,18	3,47	8,61
	SE	0,132	0,547	0,725	0,857
	95% int	0,55-0,59	0,27-2,79	2,50-5,75	8,14-11,65
Broj bolesnika		56	9	11	30

U tabeli 6 je prikazano da su srednje vrednosti UHP statistički značajno niže kod teške hemofilije A u odnosu na umerenu ($p < 0,01$), kod umerene hemofilije A u odnosu na blagu ($p < 0,05$) i kod blage hemofilije A u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$).

Tabela 6. Značajnost razlika srednjih vrednosti UHP između grupa bolesnika sa teškom, umerenom i blagom hemofilijom A i kod kontrolne grupe

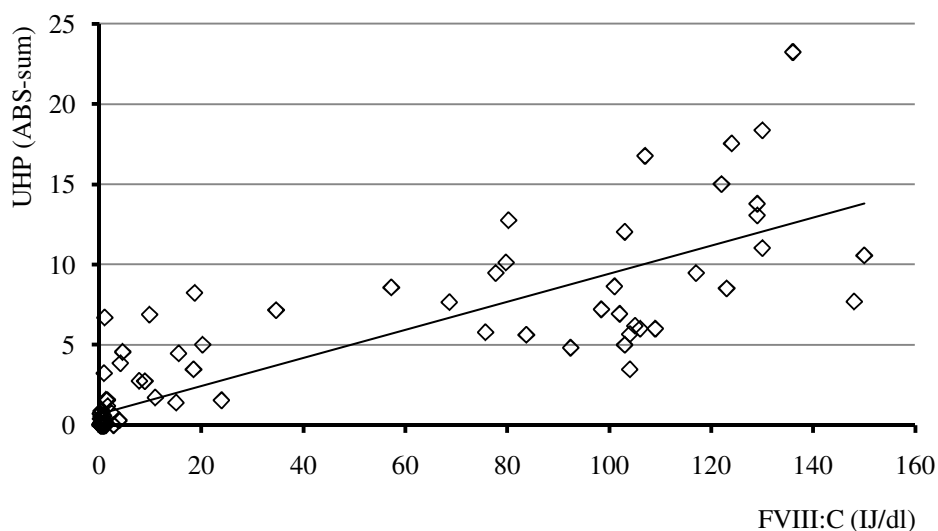
Test	Grupe		t	df	ΔX	p
UHP	Teška	vs Umerena hemofilija A	-3,08	63	-1,21	0,00
	Umerena	vs Blaga hemofilija A	-2,74	18	-2,60	0,01
	Blaga hemofilija A	vs Kontrolna grupa	-3,86	39	-5,77	0,00

U grupi od 56 bolesnika sa teškom hemofilijom A vrednosti UHP su bile u rasponu od 0 do 6,7. Na grafikonu 1 su prikazane krive stvaranja fibrina dobijene pri izvođenju UHP testa kod 4 bolesnika sa teškom hemofilijom A, kao primeri heterogenosti vrednost UHP pri vrednosti FVIII:C < 1 IU/dl, kao i kriva stvaranja fibrina kontrolnog uzorka.



Grafikon 1. Krive stvaranja fibrina kod četiri bolesnika sa teškom hemofilijom A i u kontrolnom uzorku

U grupi bolesnika sa hemofilijom A i kontrolnoj grupi postoji statistički značajna direktna korelacija ($r=0,78$, $p<0,0001$) za vrednosti UHP i FVIII:C (grafikon 2).



Grafikon 2. Korelacija vrednosti UHP i FVIII:C u grupi bolesnika sa hemofilijom A i kontrolnoj grupi

RASPODELA BOLESNIKA SA HEMOFILIJOM A PREMA KLINIČKOJ TEŽINI BOLESTI

U tabeli 7 je prikazan broj bolesnika sa teškim, umernim i blagim oblikom hemofilije A u odnosu na kliničku težinu bolesti. U grupi sa teškom hemofilijom A 52/56 (92,86%) bolesnika ima klinički težak oblik bolesti sa >3 hemartroze godišnje, a 4/56 (7,14%) ima klinički blag oblik sa ≤3 hemartroze godišnje. Kod bolesnika sa umerenom hemofilijom A klinički težak oblik je prisutan kod 4/9 (44,44%), a klinički blag oblik kod 5/9 (55,56%) bolesnika. Svi bolesnici sa blagom hemofilijom A imaju klinički blag oblik bolesti.

Tabela 7. Raspodela bolesnika sa teškim, umernim i blagim oblikom hemofilije A u odnosu na kliničku težinu bolesti

Hemofilija A	Teška N=56	Umerena N=9	Blaga N=11	Ukupno N=76
Klinički težak oblik >3 hemartroze godišnje	52	4	0	56
Klinički blag oblik ≤3 hemartroze godišnje	4	5	11	20

REZULTATI ISPITIVANJA FVIII:C I UHP U PROCENI KLINIČKE TEŽINE HEMOFILIJE A

U tabeli 7 su prikazane vrednosti FVIII:C kod bolesnika sa klinički teškim i klinički blagim oblikom hemofilije A. Vrednosti FVIII:C su iznosile $0,55 \pm 0,35$ IJ/dl u klinički teškom obliku hemofilije A odnosno $7,92 \pm 9,57$ IJ/dl u klinički blagom obliku.

Tabela 8. Vrednosti FVIII:C kod grupa bolesnika sa klinički teškim i klinički blagim oblikom hemofilije A

Grupe		Hemofilija A	
		Klinički teška >3 hemartroze godišnje	Klinički blaga ≤3 hemartroze godišnje
FVIII:C (IJ/dl)	X	0,55	7,92
	SD	0,35	9,57
	Min-Max	0,07-1,55	0,11-34,60
	Med	0,45	3,92
	SE	0,047	2,140
	95% int	0,46-0,64	3,44-12,40
Broj bolesnika		56	20

Vrednosti UHP su iznosile $0,39 \pm 1,02$ u klinički teškom obliku hemofilije A odnosno $2,76 \pm 2,62$ u klinički blagom obliku oboljenja (tabela 9).

Tabela 9. Vrednosti UHP kod grupa bolesnika sa klinički teškim i klinički blagim oblikom hemofilije A

Grupe		Hemofilija A	
		Klinički teška >3 hemartroze godišnje	Klinički blaga ≤3 hemartroze godišnje
UHP (Abs-sum)	X	0,39	2,76
	SD	1,02	2,62
	Min-Max	0-6,70	0-8,24
	Med	0,01	2,23
	SE	0,137	0,585
	95% int	0,12-0,67	1,54-3,99
Broj bolesnika		56	20

Vrednosti FVIII:C su statistički značajno niže ($p < 0,0001$) u grupi bolesnika sa klinički teškim oblikom hemofilije A u odnosu na grupu sa klinički blagim oblikom bolesti. Takođe, vrednosti UHP su statistički značajno niže ($p < 0,0001$) u grupi bolesnika sa klinički teškim oblikom hemofilije A (tabela 10),.

Tabela 10. Značajnost razlika srednjih vrednosti FVIII:C i UHP između grupa bolesnika sa klinički teškim i klinički blagim oblikom hemofilije A

Grupe	Test	t	df	ΔX	p
Klinički teška vs klinički blaga hemofilija A	FVIII:C	-5,82	74	-7,37	0,00
	UHP	-5,72	74	-2,37	0,00

Kod 54/56 (96,43%) bolesnika sa klinički teškim oblikom hemofilije A su izmerene nedetektabilne ili izrazito snižene vrednosti UHP koje su iznosile od 0 do 1,58. Kod jednog bolesnika vrednost UHP od 3,23 je bila blago snižena, a kod drugog vrednost UHP od 6,7 je bila u granicama normalnih vrednosti. Oba bolesnika su imala FVIII:C < 1 IJ/dl. Kod 6/20 (30%) bolesnika sa klinički blagim oblikom hemofilije A izmerene su normalne vrednosti UHP od 4,47 do 8,24. Kod 4/20 (20%) bolesnika izmerene su blago snižene vrednosti od 2,73 do 3,85 a preostalih 10/20 (50%) bolesnika su imali nedetektabilne ili izrazito snižene vrednosti UHP u rasponu od 0 do 1,72. U grupi bolesnika sa klinički teškim oblikom hemofilije A nedetektabilne ili izrazito snižene vrednosti UHP su statistički značajno češće ($p < 0,0001$) u odnosu na klinički blag oblik hemofilije A.

REZULTATI ISPITIVANJA FVIII:C I UHP U PROCENI ODGOVORA NA TERAPIJU

U našoj studiji kod 38 bolesnika sa teškim oblikom hemofilije A primenjena je terapija koncentratom FVIII za zaustavljanje krvarenja u zglobovima. Vrednosti FVIII:C pre terapije su iznosile $0,56 \pm 0,32$ IJ/dl, a posle terapije $31,03 \pm 10,87$ IJ/dl (tabela 11).

Tabela 11. Vrednosti FVIII:C kod grupe bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije

Grupe		Hemofilija A	
		Pre terapije	Posle terapije
FVIII:C (IJ/dl)	X	0,56	31,03
	SD	0,32	10,87
	Min-Max	0,12-1,54	10,30-64,80
	Med	0,45	31,05
	SE	0,052	1,763
	95% int	0,45-0,66	27,46-34,61

Vrednosti UHP pre i posle terapije koncentratom FVIII u prikazane u tabeli 12. Pre terapije vrednost UHP su iznosile $0,33 \pm 1,10$ a posle terapije $8,94 \pm 3,28$.

Tabela 12. Vrednosti UHP kod grupe bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije

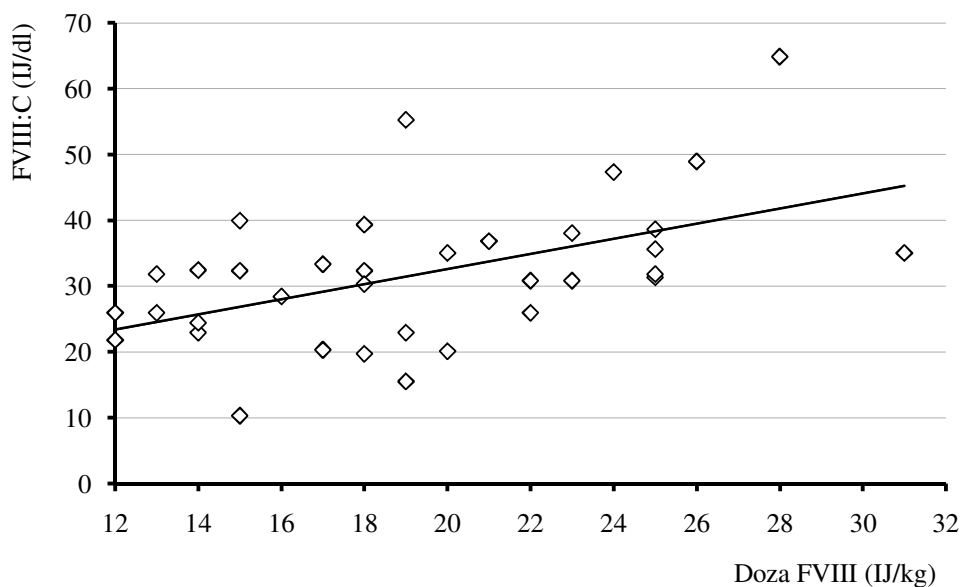
Grupe		Hemofilija A	
		Pre terapije	Posle terapije
UHP (Abs-sum)	X	0,33	8,94
	SD	1,10	3,28
	Min-Max	0-6,70	3,72-16,11
	Med	0	8,73
	SE	0,178	0,532
	95% int	0-0,69	7,86-10,02

U tabeli 13 je prikazano da su srednje vrednosti FVIII:C kod bolesnika sa hemofilijom A statistički značajno niže pre terapije u odnosu na vrednosti posle terapije ($p < 0,0001$). Takođe, srednje vrednosti UHP su statistički značajno niže pre terapije nego posle terapije ($p < 0,0001$).

Tabela 13. Značajnost razlika srednjih vrednosti UHP kod grupe bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije

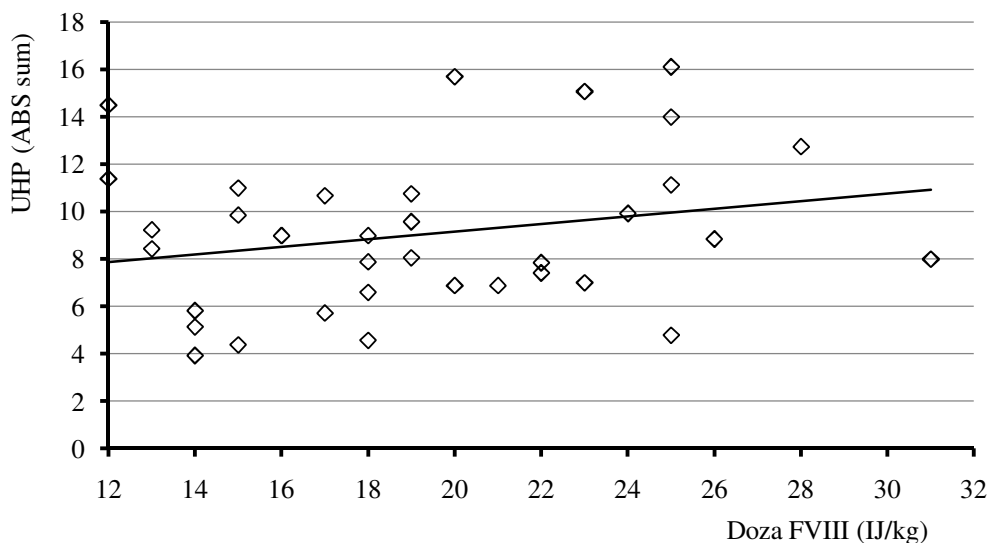
Grupe	Test	t	df	ΔX	p
Hemofilija A pre terapije vs posle terapije	FVIII:C	-17,24	37	-30,47	0,00
	UHP	-15,15	37	-8,61	0,00

U grupi bolesnika sa hemofilijom A koji su primali terapiju pokazana je statistički značajna korelacija između doze koncentrata FVIII i vrednosti FVIII:C posle terapije ($r=0,54$, $p<0,001$) što je prikazano na grafikonu 3.



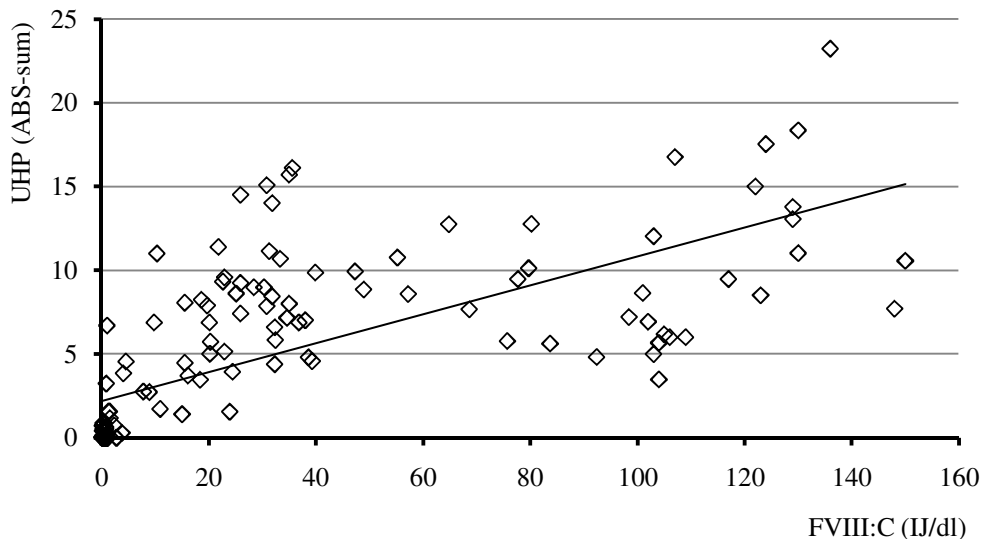
Grafikon 3. Korelacija doze koncentrata FVIII i vrednosti FVIII:C posle terapije kod grupe bolesnika sa hemofilijom A

Odnos doze koncentrata FVIII i vrednosti UHP posle terapije kod grupe bolesnika sa hemofilijom A je prikazan na grafikonu 4. Nije prisutna statistički značajna korelacija između navedenih parametara ($r=0,21$, $p=0,20$).



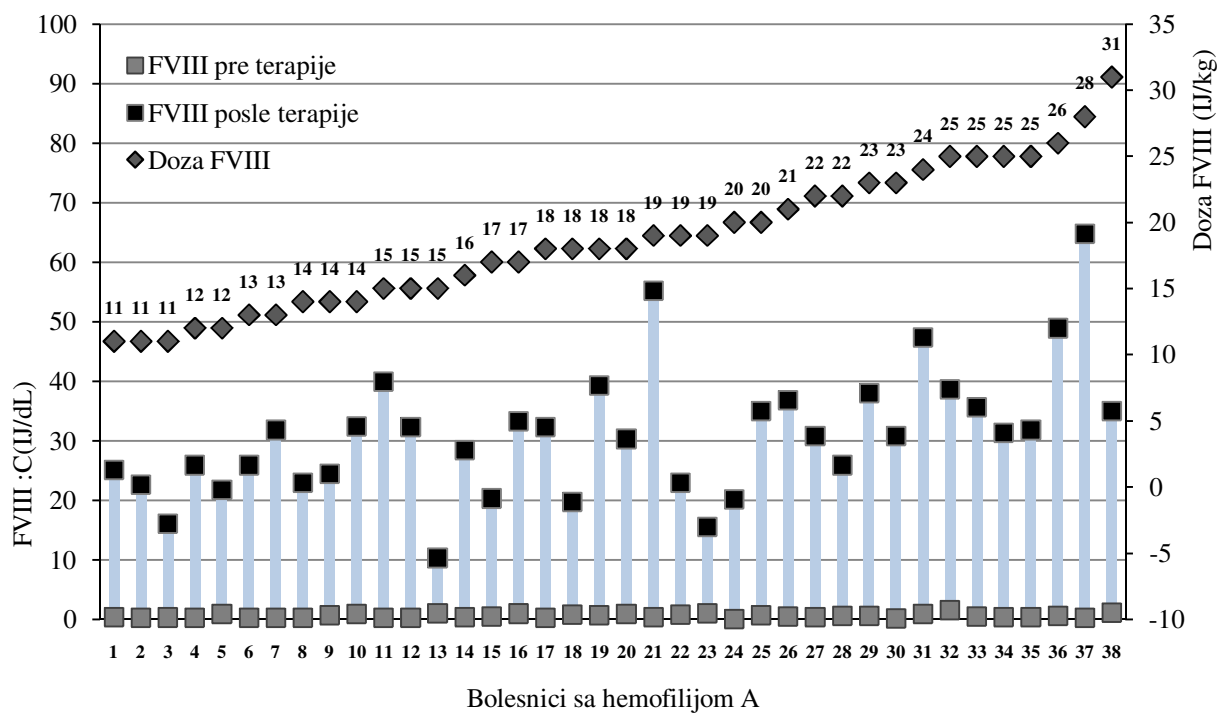
Grafikon 4. Korelacija doze koncentrata FVIII i vrednosti UHP posle terapije kod grupe bolesnika sa hemofilijom A

Statistički značajna korelacija za vrednosti FVIII:C i UHP ($r=0,82$, $p<0,0001$) je prikazana na grafikonu 5. Analizom su obuhvaćeni rezultati ispitivanja FVIII:C i UHP u grupi bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije i u kontrolnoj grupi.



Grafikon 5. Korelacija vrednosti FVIII:C i UHP kod grupe bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije i kod kontrolne grupe

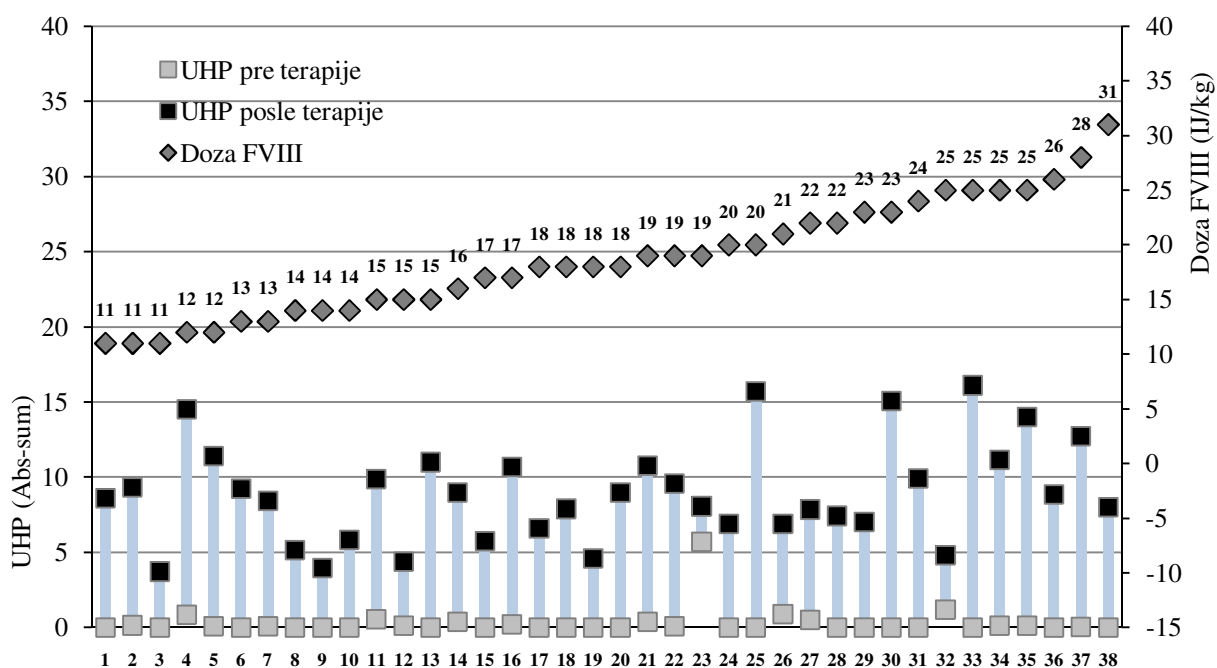
Na grafikonu 6 su prikazane doze koncentrata FVIII, kao i nivo FVIII:C pre i posle terapije, prema rastućoj vrednosti doze kod 38 bolesnika sa hemofilijom A. Trideset minuta posle terapije kod svih bolesnika je bio prisutan porast vrednosti FVIII:C koji pokazuje visok stepen varijabilnosti između bolesnika čak i u slučajevima kada je primenjena ista doza koncentrata FVIII. Tako su, na primer, posle primene doze od 15 IJ/kg kod tri bolesnika vrednosti FVIII:C iznosile 39,3 IJ/dl, 32,3 IJ/dl odnosno 10,3 IJ/dl. Takođe, posle primene doze od 25 IJ/kg kod četiri bolesnika vrednosti FVIII:C su bile varijabilne i iznosile su 38,6 IJ/dl, 35,5 IJ/dl, 31,3 IJ/dl odnosno 31,8 IJ/dl.



Grafikon 6. Pojedinačni prikaz vrednosti FVIII pre terapije i posle terapije prema rastućoj dozi koncentrata FVIII

Doze koncentrata FVIII, kao i vrednosti UHP pre i posle terapije, prema rastućoj vrednosti doze kod 38 bolesnika sa hemofilijom A su prikazani na grafikonu 7. Vrednosti UHP 30 minuta posle terapije pokazuju porast kod svih bolesnika. Kod 36 bolesnika izmerene vrednosti UHP su bile u granicama normalnih vrednosti i iznosile su od 4,39 do 16,11. Kod dva bolesnika vrednosti UHP su bile ispod donje granice normalnih vrednosti

i iznosile su 3,72 odnosno 3,94. Vrednosti UHP su bile varijabilne pri primeni iste doze koncentrata FVIII. Tako su, na primer, kod tri bolesnika koji su primili dozu od 15 IJ/kg vrednosti UHP iznosile 9,86, 4,39 odnosno 11. Takođe, kod četiri bolesnika koji su primili 25 IJ/kg vrednosti UHP su vrednosti UHP su iznosile 4,8, 16,11, 11,14 odnosno 14. Prisutan je i visok stepen varijabilnosti vrednosti UHP kod bolesnika koji su imali isti nivo FVIII:C posle terapije. Tako su, na primer, kod tri bolesnika sa nivoom FVIII:C od 25 IJ/dl vrednosti UHP iznosile 14,5, 9,24 odnosno 7,42. Takođe, kod tri bolesnika sa nivoom FVIII:C od 31 IJ/dl vrednosti UHP su iznosile 7,85, 11,14 odnosno 15,07.

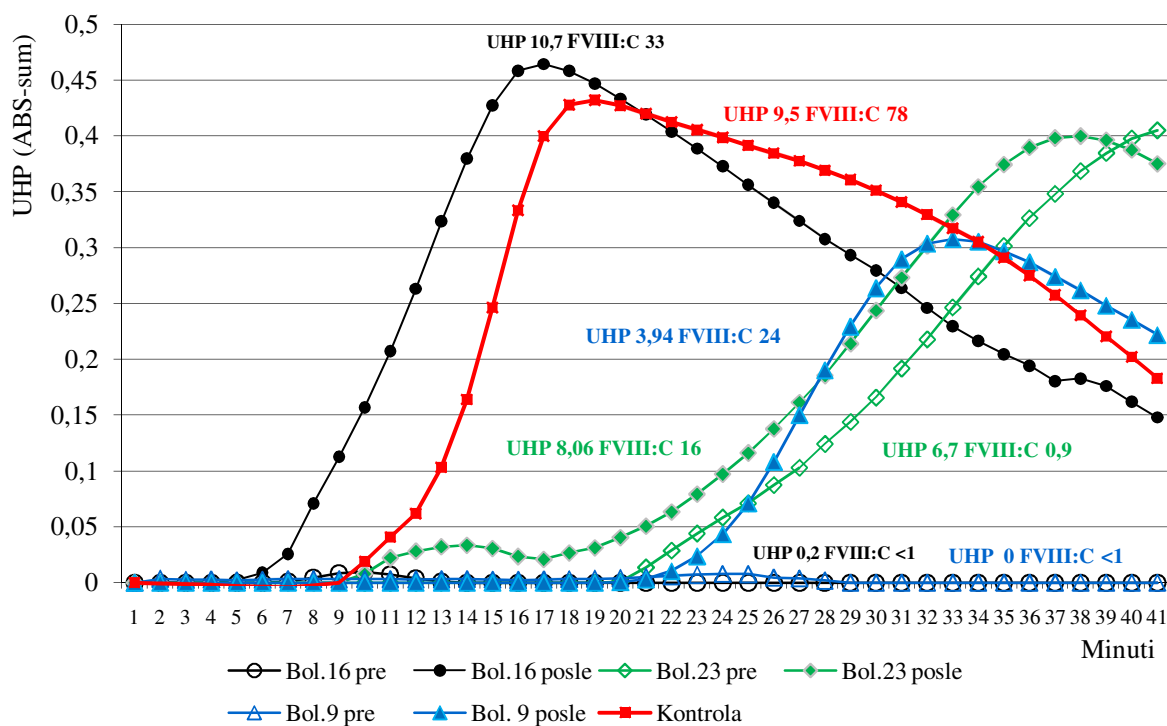


Bolesnici sa hemofilijom A

Grafikon 7. Pojedinačni prikaz vrednosti UHP pre terapije i posle terapije prema rastućoj dozi koncentrata FVIII

Analiza odgovora bolesnika sa hemofilijom A na terapiju koncentratom FVIII ukazuje da postoje razlike u individualnom odgovoru. Na grafikonu 8 su prikazane krive stvaranja fibrina izmerene primenom UHP testa kod tri bolesnika kao i rezultat merenja kontrolnog uzorka. Kod većine bolesnika vrednosti FVIII:C i UHP su snižene pre terapije, povećavaju

se posle terapije koncentratom FVIII i dostižu normalne vrednosti UHP (bolesnik 16: pre terapije UHP=0,2, FVIII:C <1 IJ/dl; posle terapije UHP=10,7, FVIII=33 IJ/dl). Međutim, kod jednog bolesnika sa teškom hemofilijom A i normalnom vrednošću UHP pre terapije posle primene koncentrata FVIII dolazi do značajnog povećanja nivoa FVIII:C i samo blagog porasta vrednosti UHP (bolesnik 23: pre terapije UHP=6,7, FVIII:C <1 IJ/dl; posle terapije UHP=8,06, FVIII=16 IJ/dl). Kod drugog bolesnika sa teškom hemofilijom i nedetektabilnom vrednošću UHP i FVIII:C pre terapije, dolazi do porasta vrednosti FVIII:C i UHP posle terapije ali UHP ne dostiže normalne vrednosti (bolesnik 9: pre terapije UHP=0, FVIII:C <1 IJ/dl; posle terapije UHP=3,94, FVIII=24 IJ/dl).



Grafikon 8. Krive stvaranja fibrina kod tri bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije i u kontrolnom uzorku

REZULTATI ISPITIVANJA TROMBOFILIJE

Učestalost faktora trombofilije u grupi bolesnika sa hemofilijom A i kontrolnoj grupi

U grupi bolesnika sa hemofilijom A i u kontrolnoj grupi nije dokazan deficit antitrombina, proteina C, proteina S niti prisustvo LA. Kod 3 bolesnika sa hemofilijom A i jedne osobe iz kontrolne grupe bila je prisutna rezistencije na APC i kod svih je dokazano prisustvo mutacije FVL. Ispitanici sa prisutnom mutacijom FVL i FII G20210A u heterozigotnoj formi ili mutacijom MTHFR C677T u homozigotnoj formi (MTHFR 677TT) su definisani kao nosioci faktora nasledne trombofilije. U tabeli 14 je prikazano prisustvo navedenih mutacija u ispitivanim grupama. Ne postoji statistički značajna razlika učestalosti faktora trombofilije u grupi bolesnika sa hemofilijom A i u kontrolnoj grupi (21/76 vs 7/30; $p=0,81$). Takođe, nema statistički značajne razlike učestalosti pojedinačnih mutacija FVL (3/76 vs 1/30; $p=1,00$), FII G20210A (5/76 vs 2/30; $p=1,00$) i MTHFR 677TT (14/76 vs 4/30; $p=0,77$) u ispitivanim grupama.

Tabela 14. Učestalost faktora trombofilije u grupi bolesnika sa hemofilijom A i u kontrolnoj grupi

Grupe	Faktori trombofilije			
	FVL heterozigot N (%)	FII G20210A heterozigot N (%)	MTHFR C677T homozigot N (%)	Ukupno sa trombofilijom N (%)
Hemofilija A N=76	3 (3,95)	5 (6,58)	14 (18,42)	21* (27,63)
Kontrolna grupa N=30	1 (3,33)	2 (6,67)	4 (13,33)	7 (23,33)
p	1,00	1,00	0,77	0,81

* kod jednog bolesnika sa teškom hemofilijom A utvrđeno je istovremeno prisustvo mutacija FVL u heterozigotnoj i MTHFR C677T u homozigotnoj formi.

Uticaj faktora trombofilije na UHP u grupi bolesnika sa hemofilijom A i kontrolnoj grupi

U tabeli 15 su prikazani rezultati ispitivanja UHP kod grupe bolesnika sa hemofilijom A i prisutnim faktorima trombofilije i grupe bolesnika sa hemofilijom A kod kojih faktori trombofilije nisu prisutni. Vrednosti UHP su iznosile $0,47 \pm 1,01$ kod hemofilije A sa trombofilijom odnosno $1,23 \pm 2,11$ kod hemofilije A bez trombofilije.

Tabela 15. Vrednosti UHP kod grupa bolesnika sa hemofilijom A u odnosu na prisustvo faktora trombofilije

Grupe		Hemofilija A	
		Sa trombofilijom	Bez trombofilije
UHP (Abs-sum)	X	0,47	1,23
	SD	1,01	2,11
	Min-Max	0-4,47	0-8,24
	Med	0	0,12
	SE	0,221	0,285
	95% int	0,01-0,93	0,65-1,80
Broj bolesnika		21	55

U tabeli 16 su prikazani rezultati ispitivanja UHP kod dela ispitanika kontrolne grupe sa prisutnim faktorima trombofilije i dela ispitanika kontrolne grupe kod kojih faktori trombofilije nisu prisutni. U delu kontrole grupe sa prisutnim faktorima trombofilije vrednosti UHP su iznosile $7,57 \pm 2,40$ odnosno $10,60 \pm 5,03$ u delu kontrolne grupe bez prisustva faktora trombofilije (tabela 16).

Tabela 16. Vrednosti UHP u kontrolnoj grupi u odnosu na prisustvo faktora trombofilije

Grupe		Kontrolna grupa	
		Sa trombofilijom	Bez trombofilije
UHP (Abs-sum)	X	7,57	10,60
	SD	2,40	5,03
	Min-Max	5-12,03	3,48-23,22
	Med	7,21	9,47
	SE	0,908	1,048
	95% int	5,35-9,79	8,43-12,78
Broj bolesnika		7	23

U tabeli 17 je prikazano da srednje vrednosti UHP nisu statistički značajno različite u grupi bolesnika sa hemofilijom A i trombofilijom u odnosu na grupu sa hemofilijom A bez trombofilije ($p=0,12$). Takođe, u kontrolnoj grupi zdravih osoba muškog pola sa trombofilijom srednje vrednosti UHP nisu bile statistički značajno različite u odnosu na grupu bez trombofilije ($p=0,14$)

Tabela 17. Značajnost razlika srednjih vrednosti UHP u grupi bolesnika sa hemofilijom A i u kontrolnoj grupi u odnosu na prisustvo trombofilije

Test	Grupe	t	df	ΔX	p
UHP	Hemofilija A sa trombofilijom vs bez trombofilije	-1,57	74	-0,76	0,12
	Kontrolna grupa sa trombofilijom vs bez trombofilije	-1,53	28	-3,03	0,14

Kada se pored nivoa FVIII:C i prisustva mutacija FVL, FII G20210A i MTHFR 677TT uzmu u obzir i nivoi drugih faktora i inhibitora koagulacije kao prediktori vrednosti UHP u grupi bolesnika sa hemofilijom A dobija se statistički značajan model ($F[1,74]=78,79$; $p<0,001$) koji je u osnovi 51% varijabilnosti UHP. Od svih parametara jedino FVIII:C pokazuje statistički značajnu korelaciju ($\beta=0,718$; $t=8,88$; $p<0,001$) i ima

prediktivnu vrednost za vrednosti UHP. U tabeli 18 prikazane su parcijalne korelacije ostalih parametara i vrednosti UHP koje ukazuju da nijedna od ovih korelacija nije statistički značajna.

Tabela 18. Parcijalne korelacije vrednosti faktora koagulacije i inhibitora koagulacije i prisustva mutacija FVL, FII G20210A i MTHFR 677TT sa vrednostima UHP u grupi bolesnika sa hemofilijom A

Prediktori	t	p	Parcijalne korelacije
Fibrinogen	0,48	0,63	0,056
FII	-1,14	0,26	-0,133
FV	0,03	0,98	0,003
FVII	1,26	0,21	0,145
FIX	-1,46	0,15	-0,168
FX	0,03	0,98	0,003
FXI	0,46	0,65	0,054
FXII	-0,52	0,61	-0,060
VWF:Akt	-0,18	0,86	-0,020
VWF:Ag	0,01	0,99	0,001
AT	-0,78	0,44	-0,090
PC	-0,39	0,70	-0,045
PS	-1,35	0,18	-0,157
FVL heterozigot	-0,49	0,63	-0,057
FII G20210A heterozigot	-1,24	0,22	-0,144
MTHFR C677T homozigot	-0,55	0,59	-0,064

Uticaj faktora trombofilije na kliničku težinu hemofilije A

U tabeli 19 je prikazano prisustvo mutacija FVL u heterozigotnoj formi, FII G20210A u heterozigotnoj formi i MTHFR C667T u homozigotnoj formi u odnosu na kliničku težinu hemofilije A. Nije pokazana statistički značajna razlika učestalosti faktora trombofilije u grupi bolesnika sa klinički teškom i blagom hemofilijom A (17/56 vs 3/20; $p=0,81$). Statistički značajna razlika nije utvrđena ni za učestalost mutacija FVL (3/56 vs 0/20; $p=1,00$), FII G20210A (3/56 vs 2/20; $p=1,00$) i MTHFR 677TT (12/56 vs 2/20; $p=0,77$) u odnosu na težinu kliničke slike hemofilije A.

Tabela 19. Učestalost mutacija FVL, FII G20210A i MTHFR 677TT u grupama bolesnika sa klinički teškom i klinički blagom hemofilijom A

Grupe	Faktori trombofilije			
	FVL heterozigot N (%)	FII G20210A heterozigot N (%)	MTHFR C677T homozigot N (%)	Ukupno sa trombofilijom N (%)
Klinički teška hemofilija A N=56	3 (5,36)	3 (5,36)	12 (21,43)	17 (30,36)
Klinički blaga hemofilija A N=20	0 (0)	2 (10)	2 (10)	4* (20)
p	1,00	1,00	0,77	0,81

* kod jednog bolesnika sa klinički teškom hemofilijom A utvrđeno je istovremeno prisustvo mutacije FVL u heterozigotnoj i MTHFR C677T u homozigotnoj formi.

Kada se pored FVIII:C i prisustva mutacija FVL, FII G20210A i MTHFR 677TT uzmu u obzir i nivoi drugih faktora koagulacije i inhibitora koagulacije kao prediktori za težinu kliničke slike u grupi bolesnika sa hemofilijom A dobija se statistički značajan model ($F[1,74]=63,70$; $p<0,001$) koji je u osnovi 46% varijabilnosti težine kliničke slike.

Od svih ispitanih parametara jedino faktor FVIII:C pokazuje statistički značajnu korelaciju ($\beta=0,68$; $t=7,98$; $p<0,001$) i ima prediktivnu vrednost za težinu kliničke slike. Parcijalne korelacije ostalih parametara i težine kliničke slike su prikazane u tabeli 20 i ukazuju da nijedna od ovih korelacija nije statistički značajna.

Tabela 20. Parcijalne korelacije vrednosti faktora koagulacije i inhibitora koagulacije i prisustva mutacija FVL, FII G20210A i MTHFR 677TT sa težinom kliničke slike u grupi bolesnika sa hemofilijom A

Prediktori	t	p	Parcijalne korelacije
Fibrinogen	0,28	0,78	0,032
FII	-1,39	0,17	-0,161
FV	0,08	0,93	0,010
FVII	-0,23	0,82	-0,027
FIX	-0,43	0,67	-0,051
FX	0,08	0,93	0,010
FXI	-0,81	0,42	-0,094
FXII	1,25	0,22	0,145
VWF:Akt	1,08	0,28	0,125
VWF:Ag	0,71	0,48	0,083
AT	0,30	0,77	0,035
PC	1,13	0,26	0,131
PS	0,38	0,70	0,045
Mutacija FVL	1,06	0,29	0,123
Mutacija FII G20210A	0,70	0,49	0,082
Mutacija MTHFR 677TT	-0,64	0,52	-0,075

REZULTATI ISPITIVANJA FIBRINOLIZE

Rezultati ispitivanja VLK i TAFI u grupi bolesnika sa hemofilijom A i kontrolnoj grupi

Rezultati ispitivanja VLK u grupi bolesnika sa hemofilijom A i u kontrolnoj grupi su prikazani u tabeli 21. VLK je izmeren na uzorcima 49 od 76 bolesnika sa hemofilijom A. Kod 27 bolesnika kod kojih je vrednost UHP pre terapije bila nedetektabilna ili izrazito snižena nije bilo moguće odrediti vrednost VLK. Vrednosti su iznosile $9,03 \pm 6,05$ minuta u grupi bolesnika sa hemofilijom A odnosno $27,03 \pm 9,75$ minuta u kontrolnoj grupi.

Tabela 21. Vrednosti VLK u grupi bolesnika sa hemofilijom A i u kontrolnoj grupi

Grupe		Hemofilija A	Kontrolna grupa
VLK (min)	X	9,03	27,03
	SD	6,05	9,75
	Min-Max	3-22	13,5-58
	Med	6	25
	SE	0,864	1,780
	95% int	7,29-10,77	23,39-30,67
Broj bolesnika		49	30

Za procenu fibrinolize zavisne od TAFI koristili smo parametar VLK dif. Određivanjem VLK sa i bez *in vitro* dodavanja specifičnog inhibitora TAFI i izračunavanjem skraćenja vremena lize koaguluma, određuje se VLK dif koji omogućava indirektnu procenu uticaja TAFI na fibrinolizu. VLK dif je moguće odrediti samo kada je UHP veći od nule i kada je prisutno skraćenje VLK posle dodavanja specifičnog inhibitora TAFI. Ovi uslovi su bili ispunjeni samo kod 16 od 76 bolesnika. Vrednosti VLK dif su

iznosile $1,59 \pm 1,27$ minuta u grupi bolesnika sa hemofilijom A onosno $17,13 \pm 10,31$ minuta u kontrolnoj grupi (tabela 22).

Tabela 22. Vrednosti VLK dif u grupi bolesnika sa hemofilijom A i u kontrolnoj grupi

Grupe		Hemofilija A	Kontrolna grupa
VLK dif (min)	X	1,59	17,13
	SD	1,27	10,31
	Min-Max	0,5-5	1,5-50
	Med	1	15
	SE	0,317	1,882
	95% int	0,92-2,27	13,28-20,98
Broj bolesnika		16	30

U grupi bolesnika sa hemofilijom A srednje vrednosti VLK su bile statistički značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0001$). Takođe, u grupi bolesnika sa hemofilijom A srednje vrednosti VLK dif su bile statistički značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0001$) što je prikazano u tabeli 23.

Tabela 23. Značajnost razlika srednjih vrednosti VLK i VLK dif između grupe bolesnika sa hemofilijom A i kontrolne grupe

Grupe	Test	t	df	ΔX	p
Hemofilija A vs Kontrolna grupa	VLK	-10,14	77	-18,00	0,00
	VLK dif	-5,98	44	-15,54	0,00

U tabeli 24 su prikazani rezultati ispitivanja TAFI u grupi bolesnika sa hemofilijom A i kontrolnoj grupi. Vrednosti TAFI su iznosile $10,75 \pm 1,99$ $\mu\text{g/ml}$ u grupi bolesnika sa hemofilijom A odnosno $6,81 \pm 1,85$ $\mu\text{g/ml}$ u kontrolnoj grupi.

Tabela 24. Vrednosti TAFI u grupi bolesnika sa hemofilijom A i u kontrolnoj grupi

Grupe		Hemofilija A	Kontrolna grupa
TAFI ($\mu\text{g/ml}$)	X	10,75	6,81
	SD	1,99	1,85
	Min-Max	5,69-15,73	4,49-13,84
	Med	10,68	6,25
	SE	0,229	0,338
	95% int	10,29-11,20	6,12-7,50
Broj bolesnika		76	30

Vrednosti TAFIa/TAFIai su iznosile $13,52 \pm 3,38$ ng/ml u grupi bolesnika sa hemofilijom A odnosno $10,43 \pm 1,71$ ng/ml u kontrolnoj grupi (tabela 25).

Tabela 25. Vrednosti TAFIa/TAFIai u grupi bolesnika sa hemofilijom A i u kontrolnoj grupi

Grupe		Hemofilija A	Kontrolna grupa
TAFIa/TAFIai (ng/ml)	X	13,52	10,43
	SD	3,38	1,71
	Min-Max	6,48-23,71	6,72-13,54
	Med	13,41	10,56
	SE	0,387	0,311
	95% int	12,75-14,29	9,80-11,07
Broj bolesnika		76	30

Srednje vrednosti TAFI ($p < 0,0001$) i TAFIa/TAFIai ($p < 0,0001$) su statistički značajno veće u grupi bolesnika sa hemofilijom A u odnosu na kontrolnu grupu (tabela 26).

Tabela 26. Značajnost razlika srednjih vrednosti TAFI i TAFIa/TAFIai između grupe bolesnika sa hemofilijom A i kontrolne grupe

Grupe	Test	t	df	ΔX	p
Hemofilija A vs Kontrolna grupa	TAFI	9,34	104	3,94	0,00
	TAFIa/TAFIai	4,76	104	3,09	0,00

Rezultati ispitivanja VLK i TAFI u proceni kliničke težine hemofilije A

U tabeli 27 su prikazani rezultati ispitivanja VLK kod bolesnika sa klinički teškim i klinički blagim oblikom hemofilije A. VLK je izmeren kod 49 od 76 bolesnika. Kod preostalih 27 bolesnika kod kojih je UHP bio nedetektabilan nije bilo moguće odrediti vrednost VLK. U grupi sa klinički teškim oblikom hemofilije A vrednost VLK je iznosila $7,41 \pm 4,93$ minuta, a u grupi sa klinički blagim oblikom bolesti $13,07 \pm 6,86$ minuta.

Tabela 27. Vrednosti VLK u grupama bolesnika sa klinički teškim i klinički blagim oblikom hemofilije A

Grupe		Hemofilija A	
		Klinički teška >3 hemartroze godišnje	Klinički blaga ≤ 3 hemartroze godišnje
VLK (min)	X	7,41	13,07
	SD	4,93	6,86
	Min-Max	3-20	4-22
	Med	5,5	16
	SE	0,833	1,833
	95% int	5,72-9,11	9,12-17,03
Broj bolesnika		35	14

Vrednosti VLK dif su određene na uzorcima 38 od 76 bolesnika sa hemofilijom A. Kod preostalih 38 bolesnika, kod kojih je UHP bio nedetektabilan i gde nije bilo prisutno skraćenje VLK posle dodavanja specifičnog inhibitora TAFI nije bilo moguće odrediti vrednost VLK dif. U grupi sa klinički teškim oblikom hemofilije A vrednost VLK dif je iznosila $1,46 \pm 1,46$ minuta, a u grupi sa klinički blagim oblikom bolesti $1,90 \pm 0,74$ minuta (tabela 28).

Tabela 28. Vrednosti VLK dif u grupama bolesnika sa klinički teškim i klinički blagim oblikom hemofilije A

Grupe		Hemofilija A	
		Klinički teška >3 hemartroze godišnje	Klinički blaga ≤3 hemartroze godišnje
VLK dif (min)	X	1,46	1,90
	SD	1,46	0,74
	Min-Max	0,5-5	1-3
	Med	1	2
	SE	0,439	0,371
	95% int	0,48-2,43	0,98-2,82
Broj bolesnika		11	5

Statistička značajnost razlika srednjih vrednosti VLK i VLK dif između klinički teške i klinički blage hemofilije A je prikazana u tabeli 29. U grupi sa klinički teškim oblikom hemofilije A srednje vrednosti VLK su statistički značajno niže u odnosu na grupu sa klinički blagim oblikom ($p < 0,01$), dok za srednje vrednosti VLK dif nije prisutna statistički značajna razlika u odnosu na kliničku težinu bolesti ($p = 0,64$).

Tabela 29. Značajnost razlika srednjih vrednosti VLK i VLK dif između grupa bolesnika sa klinički teškim i klinički blagim oblikom hemofilije A

Grupe	Test	t	df	ΔX	p
Klinički teška vs klinički blaga hemofilija A	VLK	-3,26	47	-5,66	0,00
	VLK dif	-0,53	14	-0,44	0,64

U tabeli 30 su prikazani rezultati ispitivanja TAFI kod bolesnika sa klinički teškim i klinički blagim oblikom hemofilije A. Vrednosti TAFI su iznosile $10,66 \pm 2,03$ $\mu\text{g/ml}$ u klinički teškom obliku hemofilije A odnosno $10,98 \pm 1,91$ $\mu\text{g/ml}$ u klinički blagom obliku.

Tabela 30. Vrednosti TAFI u grupama bolesnika sa klinički teškim i klinički blagim oblikom hemofilije A

Grupe		Hemofilija A	
		Klinički teška >3 hemartroze godišnje	Klinički blaga ≤ 3 hemartroze godišnje
TAFI ($\mu\text{g/ml}$)	X	10,66	10,98
	SD	2,03	1,91
	Min-Max	5,69-15,73	6,95-14,31
	Med	10,58	10,91
	SE	0,272	0,427
	95% int	10,12-11,21	10,09-11,88
Broj bolesnika		56	20

Vrednosti TAFIa/TAFIai su iznosile $13,56 \pm 3,43$ ng/ml u klinički teškom obliku hemofilije A, a klinički blagom obliku su iznosile $13,40 \pm 3,29$ ng/ml (tabela 31).

Tabela 31. Vrednosti TAFIa/TAFIai u grupama bolesnika sa klinički teškim i klinički blagim oblikom hemofilije A

Grupe		Hemofilija A	
		Klinički teška >3 hemartroze godišnje	Klinički blaga ≤3 hemartroze godišnje
TAFIa/TAFIai (ng/ml)	X	13,56	13,40
	SD	3,43	3,29
	Min-Max	6,48-20,83	7,87-23,71
	Med	13,45	12,94
	SE	0,459	0,736
	95% int	12,64-14,48	11,86-14,94
Broj bolesnika		56	20

Nije bila prisutna statistički značajna razlika srednjih vrednosti TAFI između grupa bolesnika sa klinički teškim oblikom hemofilije A ($p=0,54$). Takođe, statistički značajna razlika nije bila prisutna ni za srednje vrednosti TAFIa/TAFIai u odnosu na kliničku težinu hemofilije A ($p=0,86$) što je prikazano u tabeli 32.

Tabela 32. Značajnost razlika srednjih vrednosti TAFI i TAFIa/TAFIai između grupa bolesnika sa klinički teškim i klinički blagim oblikom hemofilije A

Grupe	Test	t	df	ΔX	p
Klinički teška vs klinički blaga hemofilija A	TAFI	-0,62	74	-0,32	0,54
	TAFIa/TAFIai	0,18	74	0,16	0,86

Kada se u grupi bolesnika sa hemofilijom A kao prediktori za težinu kliničke slike uzmu u obzir vrednosti FVIII:C, TAFI i TAFIa/TAFIai dobija se statistički značajan model ($F[1,74]=63,70$, $p<0,001$) koji objašnjava ukupno 46% varijabilnosti težine kliničke slike.

Od navedenih parametara jedino faktor FVIII ima prediktivnu vrednost za kliničku težinu hemofilije A ($\beta=0,68$; $t=7,98$; $p<0,001$). U tabeli 33 prikazane su parcijalne korelacije parametara TAFI i TAFIa/TAFIai koje ukazuju da nema statistički značajne korelacije.

Tabela 33. Parcijalne korelacije vrednosti TAFI i TAFIa/TAFIai i težine kliničke slike u grupi bolesnika sa hemofilijom A

Prediktori	t	p	Parcijalne korelacije
TAFI	-0,13	0,901	-0,015
TAFIa/TAFIai	-0,52	0,608	-0,060

Rezultati ispitivanja VLK i TAFI u proceni odgovora na terapiju

Vrednosti VLK i pre i posle terapije koncentratom FVIII su određene kod 23 od 38 bolesnika sa hemofilijom A. Kod 15 bolesnika kod kojih je vrednost UHP pre terapije bila nedetektabilna ili izrazito snižena nije bilo moguće odrediti vrednost VLK pre terapije. Vrednosti VLK pre terapije su iznosile $6,89 \pm 4,83$ minuta, a posle terapije $23,72 \pm 7,31$ minuta (tabela 34).

Tabela 34. Vrednosti VLK u grupi bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije

Grupe		Hemofilija A	
		Pre terapije	Posle terapije
VLK (min)	X	6,89	23,72
	SD	4,83	7,31
	Min-Max	3-20	12-37
	Med	5,5	22
	SE	1,007	1,525
	95% int	4,80-8,98	20,55-26,88
Broj bolesnika		23	23

Rezultati ispitivanja VLK dif kod bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije koncentratom FVIII su prikazani u tabeli 35. VLK dif je moguće odrediti kada je vrednost UHP veća od nule i kada je prisutno skraćjenje VLK posle dodavanja specifičnog inhibitora TAFI. Ovi uslovi su bili ispunjeni i pre i posle terapije kod 8 od 38 bolesnika. Vrednosti VLK dif kod bolesnika sa hemofilijom A pre terapije su iznosile $1,19 \pm 1,56$ minuta, a posle terapije koncentratom FVIII su iznosile $5,63 \pm 3,45$ minuta (tabela 35).

Tabela 35. Vrednosti VLK dif u grupi bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije

Grupe		Hemofilija A	
		Pre terapije	Posle terapije
VLK dif (min)	X	1,19	5,63
	SD	1,56	3,45
	Min-Max	0,50-5	2-12
	Med	0,50	5,50
	SE	0,551	1,220
	95% int	0,11-2,49	2,74-8,51
Broj bolesnika		8	8

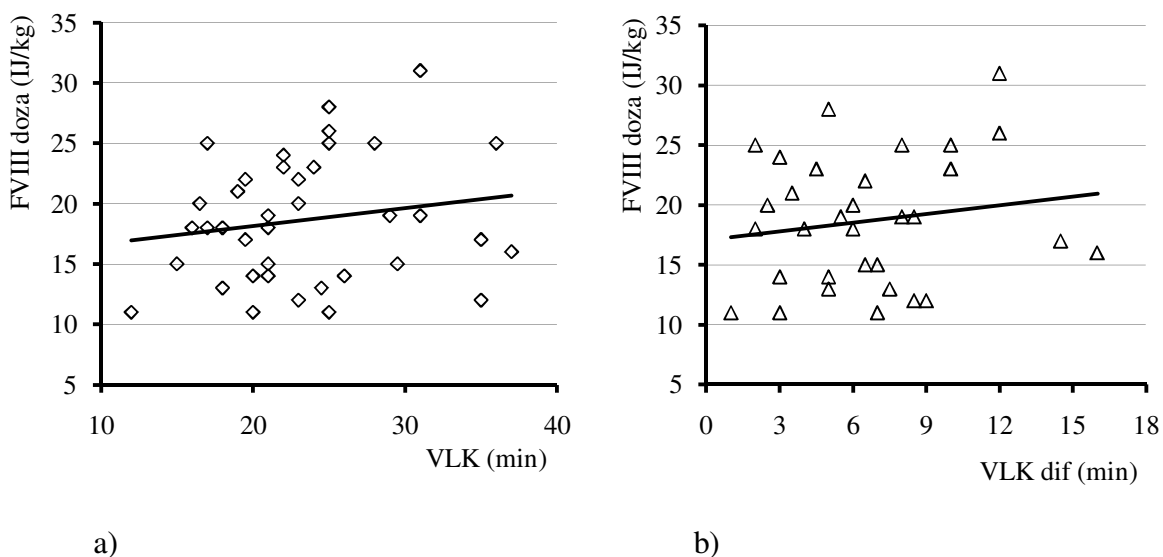
U tabeli 36 je prikazano da je prisutna statistički značajna razlika srednjih vrednosti VLK u grupi bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije ($p < 0,0001$), a statistički značajna razlika je prisutna i za srednje vrednosti VLK dif ($p < 0,05$).

Tabela 36. Značajnost razlike srednjih vrednosti VLK i VLK dif pre i posle terapije kod grupe bolesnika sa hemofilijom A

Grupe	Test	t	df	ΔX	p
		Hemofilija A pre terapije vs posle terapije	VLK	-8,75	22
VLK dif	-2,96		7	-4,44	0,02

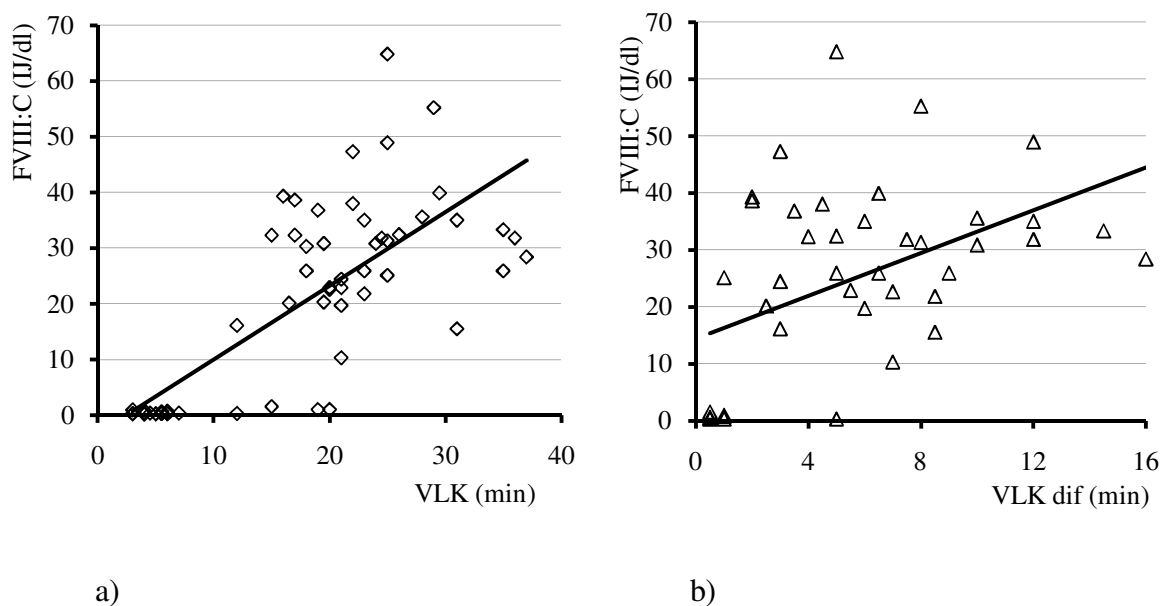
U grupi bolesnika sa hemofilijom A vrednosti VLK su izmerene kod svih 38 bolesnika posle terapije i iznosile su $23,72 \pm 7,31$ minuta. Nije prisutna statistički značajna razlika ($p=0,07$) srednjih vrednosti VLK u grupi bolesnika sa hemofilijom A u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi koje su iznosile $27,03 \pm 9,75$ minuta (tabela 21). Vrednosti VLK dif su izmerene kod 33 od 38 bolesnika posle terapije i iznosile su $6,79 \pm 3,70$ minuta. Ove vrednosti su statistički značajno niže ($p < 0,0001$) u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi koje su iznosile $17,13 \pm 10,31$ minuta (tabela 22).

Nije prisutna statistički značajna korelacija za dozu FVIII i vrednosti VLK ($r=0,18$, $p=0,28$) što je prikazano na grafikonu 9a. Takođe, na grafikonu 9b je prikazano da nema statistički značajne korelacije doze FVIII i vrednosti VLK dif ($r=0,12$, $p=0,50$).



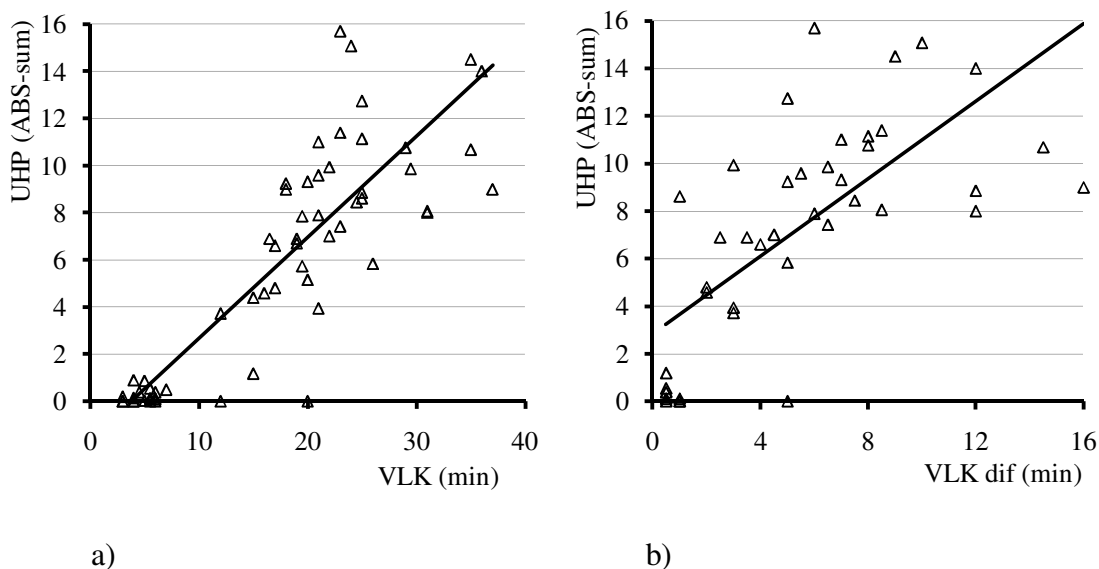
Grafikon 9. Korelacija doze koncentrata FVIII sa vrednostima VLK (a) i VLK dif (b) u grupi bolesnika sa hemofilijom A

Utvrđena je statistički značajna korelacija za vrednosti FVIII:C i VLK ($r=0,76$, $p<0,0001$), kao i za vrednosti VLK dif i FVIII:C ($r=0,45$, $p<0,01$) u grupi bolesnika sa hemofilijom A. Analizirani su rezultati pre i posle terapije i prikazani na grafikonu 10a odnosno 10b.



Grafikon 10. Korelacija vrednosti FVIII:C sa vrednostima VLK (a) i VLK dif (b) u grupi bolesnika sa hemofilijom A

Na grafikonu 11a prikazana je korelacija vrednosti UHP i VLK, a na grafikonu 11b korelacija vrednosti UHP i VLK dif u grupi bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije. Utvrđena je statistički značajna korelacija za vrednosti VLK i UHP ($r=0,84$, $p<0,0001$) kao i za vrednosti UHP i VLK dif ($r=0,76$, $p<0,0001$).



Grafikon 11. Korelacija vrednosti UHP sa vrednostima VLK (a) i VLK dif (b) u grupi bolesnika sa hemofilijom A

Rezultati ispitivanja TAFI kod bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije su prikazani u tabeli 37. Vrednosti TAFI su iznosile $10,66 \pm 2,03$ $\mu\text{g/ml}$ pre terapije odnosno $10,75 \pm 2,64$ $\mu\text{g/ml}$ posle terapije.

Tabela 37. Vrednosti TAFI u grupi bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije

Grupe		Hemofilija A	
		Pre terapije	Posle terapije
TAFI ($\mu\text{g/ml}$)	X	10,66	10,75
	SD	2,03	2,64
	Min-Max	5,69-15,19	6,54-19,32
	Med	10,66	10,66
	SE	0,329	0,428
	95% int	9,93-11,33	9,89-11,62
Broj bolesnika		38	38

Vrednosti TAFIa/TAFIai u grupi bolesnika sa hemofilijom pre terapije su iznosile $13,06 \pm 3,55$ ng/ml odnosno $14,85 \pm 3,44$ IJ/dl posle terapije (tabela 38).

Tabela 38. Vrednosti TAFIa/TAFIai u grupi bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije

Grupe		Hemofilija A	
		Pre terapije	Posle terapije
TAFIa/TAFIai (ng/ml)	X	13,06	14,85
	SD	3,55	3,44
	Min-Max	6,48-19,77	7,12-20,97
	Med	13,28	15,45
	SE	0,576	0,558
	95% int	11,89-14,22	13,72-15,98
Broj bolesnika		38	38

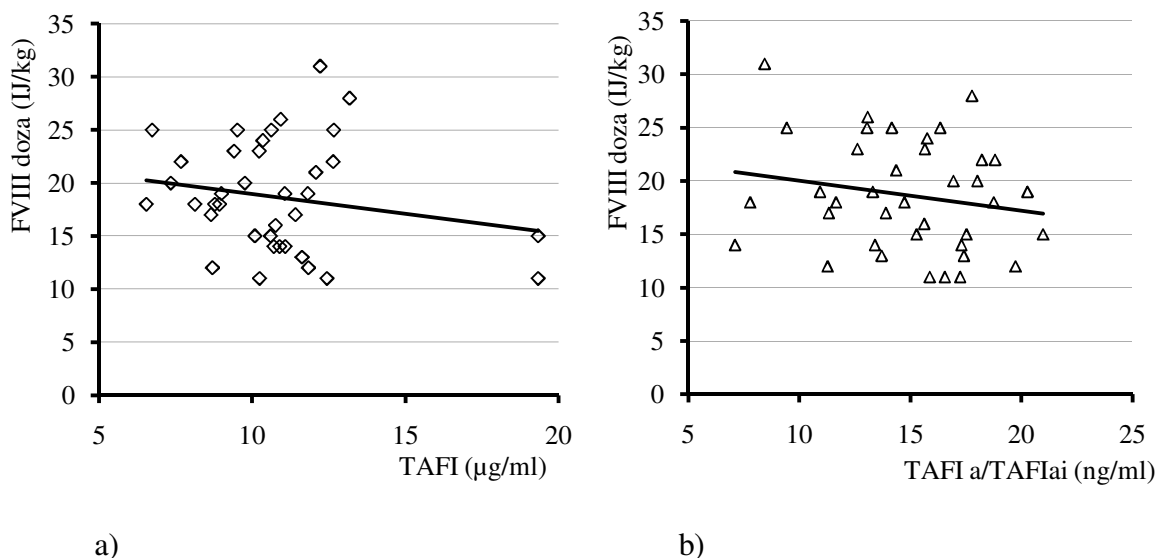
U grupi bolesnika sa hemofilijom A koji su primali terapiju nema statistički značajne razlike srednjih vrednosti TAFI pre i posle terapije ($p=0,84$), a srednja vrednosti TAFIa/TAFIai je statistički značajno niža pre terapije nego posle terapije ($p<0,01$), što je prikazano u tabeli 39

Tabela 39. Statistička značajnost razlika vrednosti TAFIa/TAFIai pre i posle terapije u grupi bolesnika sa hemofilijom A

Grupe	Test	t	df	ΔX	p
		Hemofilija A pre terapije vs posle terapije	TAFI	0,20	37
TAFIa/TAFIai	-3,50		37	1,79	0,00

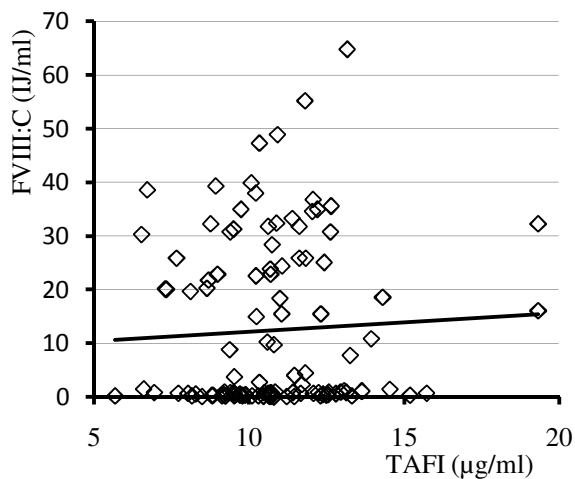
U grupi bolesnika sa hemofilijom A vrednosti TAFI posle terapije su iznosile $10,75 \pm 2,64$ $\mu\text{g/ml}$ i bile su statistički značajno veće ($p < 0,0001$) u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi koje su iznosile $6,81 \pm 1,85$ $\mu\text{g/ml}$ (tabela 24). I vrednosti TAFIa/TAFIai posle terapije koje su iznosile $14,85 \pm 3,44$ ng/ml su bile statistički značajno veće ($p < 0,0001$) u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi koje su iznosile $10,43 \pm 1,71$ ng/ml (tabela 25).

Na grafikonu 12 je prikazana korelacija doze koncentrata FVIII i vrednosti TAFI i TAFIa/TAFIai posle terapije u grupi bolesnika sa hemofilijom A. Nije prisutna statistički značajna korelacija za dozu FVIII i vrednosti TAFI ($r = -0,11$, $p = 0,49$) što je prikazano na grafikonu 12a. Takođe, na grafikonu 12b je prikazano da nema statistički značajne korelacije doze FVIII i vrednosti TAFIa/TAFIai ($r = -0,15$, $p = 0,37$).

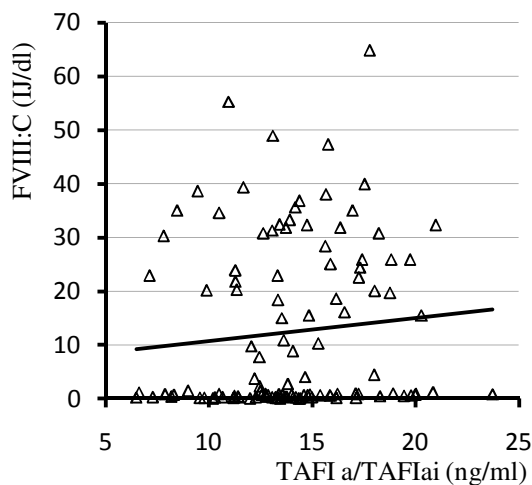


Grafikon 12. Korelacija doze koncentrata FVIII sa vrednostima TAFI (a) i TAFIa/TAFIai (b) u grupi bolesnika sa hemofilijom A

Na grafikonu 13a je prikazana korelacija vrednosti FVIII:C i TAFI, a na grafikonu 13b korelacija vrednosti FVIII:C i TAFIa/TAFIai u grupi bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije. Nije prisutna statistički značajna korelacija za vrednosti FVIII:C i TAFI i ($r = 0,11$, $p = 0,23$), a prisutna je statistički značajna ali slaba korelacija za vrednosti FVIII:C i TAFIa/TAFIai ($r = 0,19$, $p < 0,05$).



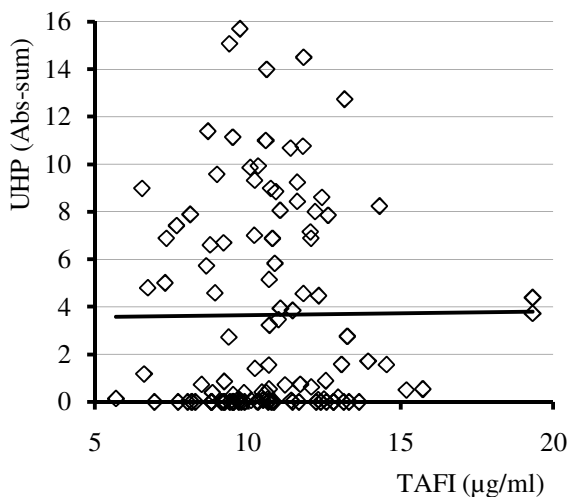
a)



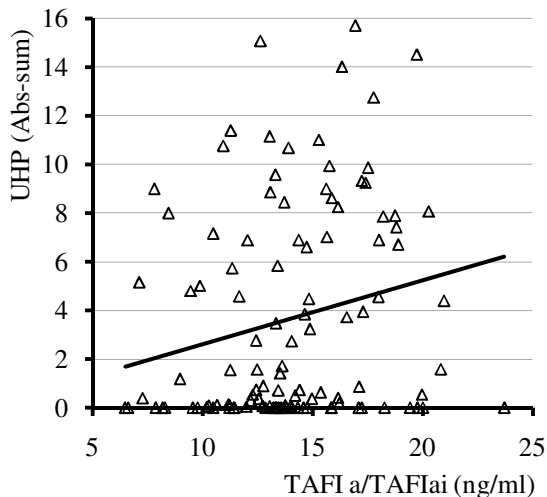
b)

Grafikon 13. Korelacija vrednosti FVIII:C sa vrednostima TAFI (a) i TAFIa/TAFIai (b) u grupi bolesnika sa hemofilijom A

U grupi bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije nema statistički značajne korelacije ($r=0,07$, $p=0,45$) za vrednosti UHP i TAFI (grafikon 14a) ali je statistički značajna korelacija ($r=0,20$, $p<0,05$) prisutna za UHP i TAFIa/TAFIai (grafikon 14b)



a)



b)

Grafikon 14. Korelacija vrednosti UHP sa vrednostima TAFI (a) i TAFIa/TAFIai (b) u grupi bolesnika sa hemofilijom A

Kada se uzmu u obzir vrednosti FVIII:C, TAFI i TAFIa/TAFIai kao prediktori odgovora na terapiju, koji je procenjen na osnovu nivoa FVIII:C posle terapije, primenom metode multiple regresije nije dobijen statistički značajan model ($F[3,34]=2,05$, $p=0,125$). Takođe, kada se uzmu u obzir vrednosti FVIII:C, TAFI i TAFIa/TAFIai kao prediktori odgovora na terapiju, koji je procenjen na osnovu nivoa UHP posle terapije, takođe nije dobijen statistički značajan model ($F[3,34]=1,78$, $p=0,17$).

DISKUSIJA

Laboratorijsko ispitivanje je osnov za dijagnozu, procenu težine oboljenja i lečenje hemofilije A. Poseban značaj ima određivanje nivoa FVIII:C. Međutim, test koji se uobičajeno koristi za merenje FVIII:C, a koji se zasniva na APTT testu, kod dela bolesnika nije sasvim pouzdan pokazatelj sklonosti ka krvarenju niti odgovora na terapiju. Ovo je posledica činjenice da se APTT testom detektuje samo inicijalna faza stvaranja trombina tako da se ovim testom ne može proceniti ukupni hemostatski kapacitet bolesnika (25, 58).

U cilju prevazilaženja nedostataka klasičnih testova ispituje se primena globalnih testova hemostaze u proceni kliničke težine i efikasnosti terapije kod hemofilije A. Još uvek ne postoji precizan i jednostavan test za ovu namenu. Testovi TGT, TEG i AKK su korišćeni u eksperimentalnim i kliničkim studijama ali su još uvek složeni za širu primenu (81, 97). Test UHP je jednostavan, omogućava procenu sistema koagulacije i fibrinolize i predstavlja novi pristup u proceni delikatnog balansa u sistemu hemostaze (111).

U skladu sa kriterijumima Internacionalnog udruženja za trombozu i hemostazu na osnovu nivoa FVIII:C (50) u našoj grupi bolesnika 73,69% je imalo težak oblik hemofilije A, umeren oblik je imalo 11,84% bolesnika, a blaga hemofilija A je bila prisutna kod 14,47%. Vrednosti FVIII:C su bile statistički značajno različite između grupa sa različitim težinom oboljenja i iznosile su $0,50 \pm 0,28$ IJ/dl za tešku hemofiliju A, $2,54 \pm 1,31$ IJ/dl za umerenu odnosno $16,68 \pm 7,86$ IJ/dl za blagu hemofiliju A. Takođe, vrednosti FVIII:C su bile statistički značajno niže u grupi sa blagom hemofilijom A u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi koje su iznosile $106,45 \pm 23,18$ IJ/dl.

Primena UHP testa omogućava procenu aktivnosti FVIII ali i drugih brojnih činilaca sistema koagulacije i fibrinolize. Rezultati ispitivanja UHP su bili u skladu sa klasifikacijom težine hemofilije A na osnovu nivoa FVIII:C. Vrednosti UHP su bile statistički značajno različite između grupa bolesnika sa različitim težinom oboljenja i iznosile su $0,32 \pm 0,99$ za tešku hemofiliju A, $1,53 \pm 1,64$ za umerenu hemofiliju A odnosno $4,13 \pm 2,42$ za blagu hemofiliju A. U grupi bolesnika sa blagom hemofilijom A vrednosti UHP su bile statistički značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu gde su izmerene najveće vrednosti UHP koje su iznosile $9,90 \pm 4,70$.

Naši rezultati su u skladu sa prethodno publikovanim podacima. Studija Antovića i sar. (69) obuhvatila je našu grupu ispitanika i grupu ispitanika iz Švedske, ukupno 64 bolesnika sa teškom, 14 sa umerenom i 56 sa blagom hemofilijom A i 46 zdravih muškaraca. Rezultati dobijeni primenom UHP testa su upoređeni sa rezultatima TGT testa. Vrednosti oba testa bile su statistički značajno različite između ispitivanih grupa i omogućavaju razlikovanje bolesnika sa hemofilijom A od zdravih osoba, kao i bolesnika sa različitim stepenom sniženja FVIII:C. TGT test je i ranije korišćen za procenu kapaciteta stvaranja trombina u hemofiliji A. Beltran-Miranda i sar. (116) su pokazali da su rezultati TGT testa u skladu sa standardnom laboratorijskom klasifikacijom kod 12 bolesnika sa teškom hemofilijom A, 3 bolesnika sa umerenom i 7 sa blagom hemofilijom A. Ovi nalazi su potvrđeni su studiji Dargaud i sar. (47) ispitivanjem 34 bolesnika sa hemofilijom A i 12 bolesnika sa hemofilijom B. Primenom TEG kod 11 bolesnika sa teškom i 11 sa umerenom hemofilijom A i kod 30 zdravih muškaraca. Sørensen i sar. (106) su pokazali da je kod teške hemofilije A prisutan najveći stepen produženja inicijalne faze koagulacije i najveći stepen supresije faze propagacije. Takođe, rezultati AKK testa kod 37 bolesnika sa teškom hemofilijom A, 18 bolesnika sa umerenom i 8 sa blagom hemofilijom A omogućavaju razlikovanje težine oboljenja (81).

U studiji van Veen i sar. (103) korišćeni su testovi TGT i TEG za procenu težine hemofilije A i dobijeni rezultati se razlikuju u odnosu na prethodne studije. Primenom TGT testa kod 20 bolesnika sa teškom hemofilijom A, 31 sa blagim oblikom bolesti i 22 zdrave muške osobe potvrđena je mogućnost razlikovanja bolesnika sa hemofilijom A od zdravih osoba ali nije bilo moguće pouzdano razlikovati osobe sa teškom i blagom hemofilijom A. Autori kao objašnjenje navode relativno mali broj bolesnika sa blagom hemofilijom u prethodnim studijama kao i primenu modifikovanog TGT testa koji pokazuje manju senzitivnost. Takođe, ispitivanjem TEG kod 12 bolesnika sa teškom hemofilijom A, 7 sa umerenom i 10 sa blagom hemofilijom A kao i 21 zdrave osobe pokazano je da nije moguće pouzdano razlikovati osobe sa umerenom i blagom hemofilijom A od zdravih osoba. To se objašnjava činjenicom da, za razliku od UHP i TGT testa, na rezultate TEG utiču i karakteristike krvnih ćelija, kako trombocita tako i krvnih ćelija nosilaca tkivnog faktora.

Dobijene vrednosti UHP pokazuju heterogenost unutar grupa bolesnika sa teškom, umerenom i blagom hemofilijom A kao i u kontrolnoj grupi. U grupi od 56 bolesnika sa teškom hemofilijom A vrednosti UHP su bile u rasponu od 0 do 6,7. Jedan bolesnik je imao normalnu vrednost UHP iako je nivo FVIII:C <1 IJ/dl. Kod 9 bolesnika sa umerenom hemofilijom A vrednosti UHP su bile od 0 do 4,56, a jedan bolesnik je imao normalnu vrednost UHP. U grupi od 11 bolesnika sa blagom hemofilijom A vrednosti UHP su iznosile od 1,41 do 8,24, a 4 bolesnika su imala normalne vrednosti. Ovo ukazuje da delovanje sniženog FVIII:C na rezultate UHP testa može biti kompenzovano delovanjem drugih činilaca sistema koagulacije i fibrinolize. U kontrolnoj grupi vrednosti UHP su bile u širokom rasponu od 3,48 do 23,22. Vrednost UHP je bila u granicama normalnih vrednosti kod 28 ispitanika, dok je kod jednog vrednost UHP bila blago snižena a kod drugog blago povišena.

Heterogenost rezultata globalnih testova hemostaze kod zdravih osoba i bolesnika sa hemofilijom A, kao i disproporcija u odnosu na vrednosti FVIII:C, su pokazane i u drugim studijama. Brummel-Ziedins i sar. (128) su ukazali na velike razlike u kapacitetu stvaranja trombina kod zdravih osoba. Ponavljanim merenjem kod 13 zdravih muškaraca tokom 6 meseci su utvrdili da individualne vrednosti ostaju stabilne, što ukazuje da svaka osoba ima karakterističan kapacitet za stvaranje trombina. Mann i sar. (129) sugerišu da i bolesnici sa hemofilijom imaju različit individualni kapacitet za stvaranje trombina, što je potvrđeno kasnijim ispitivanjima (130). van Veen i sar. (103) su prikazali heterogenost vrednosti TGT unutar grupa bolesnika sa teškom i umerenom hemofilijom A, a opisana su dva bolesnika sa teškom i 6 bolesnika sa blagom hemofilijom A i normalnim vrednostima TGT. U nekoliko studija potvrđena je heterogenost rezultata globalnih testova hemostaze kod bolesnika sa nivoom FVIII:C <1 IJ/dl primenom testa TGT (56), TEG (107) i AKK (108). Ovi rezultati ukazuju da pored FVIII i drugi činiooci sistema hemostaze utiču na proces koagulacije kod hemofilije A. To je osnov za postojanje individualnih razlika u kliničkoj slici i terapijskom odgovoru, a očekuje se da će primena testova globalne hemostaze doprineti preciznijem definisanju tih individualnih razlika.

U našoj grupi ispitanika pokazana je statistički značajna direktna korelacija vrednosti FVIII:C i UHP ($r=0,78$) što ukazuje da sa povećanjem FVIII:C raste i vrednost UHP.

U studiji Antovića i sar. (69) je takođe pokazana statistički značajna korelacija za vrednosti FVIII:C i UHP ($r=0,78$). U ovoj studiji, kao i kod drugih autora, opisana je korelacija vrednosti FVIII:C sa rezultatima testova TGT (116, 147, 103), TEG (103) i AKK (109).

Za procenu kliničke težine hemofilije A se koriste različiti parametri. Broj spontanih hemartroza u toku godine je najpogodniji parametar kod bolesnika koji primaju terapiju samo za zaustavljanje krvarenja (51). Ovaj parametar je korišćen u našoj studiji. U grupu sa klinički teškim oblikom hemofilije A su svrstani bolesnici sa >3 , a u grupu sa klinički blagim oblikom sa ≤ 3 spontane hemartroze godišnje. Broj hemartroza kao kriterijum za procenu kliničke težine hemofilije koristili su i drugi autori (56, 116, 131).

U ispitanoj grupi sa hemofilijom A 56 bolesnika su imali klinički težak oblik bolesti, a 20 bolesnika je imalo klinički blag oblik. Vrednosti FVIII:C su bile statistički značajno niže u klinički teškom u odnosu na klinički blag oblik hemofilije A i iznosile su $0,55\pm 0,35$ IJ/dl odnosno $7,92\pm 9,57$ IJ/dl. Neslaganje nivoa FVIII:C i kliničke težine bolesti je bilo prisutno kod 8/76 (10,53%) bolesnika. Kod 4/56 (7,14%) bolesnika sa FVIII:C <1 IJ/dl bio je prisutan klinički blag oblik bolesti, dok je 4/9 (44,44%) bolesnika sa FVIII:C od 1 do 5 IJ/dl imalo klinički težak oblik bolesti. Kod svih 8 bolesnika kod kojih je bilo prisutno neslaganje nivoa FVIII:C i kliničke težine bolesti vrednosti UHP su bile nedetektabilne ili izrazito snižene. Ovi podaci ukazuju da nijedan od ova dva testa nije potpuno pouzdan u proceni težine krvarenja.

I drugi autori opisuju disproporciju između težine hemofilije A na osnovu laboratorijskog kriterijuma nivoa FVIII:C i kliničke težine oboljenja. U prospektivnoj studiji Aledort i sar. (51) su pratili 477 bolesnika sa FVIII:C <1 IJ/dl tokom 6 godina i pokazali da 10% bolesnika veoma retko krvari i nemaju oštećenje zglobova. Takođe, u retrospektivnoj studiji sprovedenoj u Francuskoj na 116 bolesnika sa teškom hemofilijom A kod 8,9% nije zabeleženo krvarenje u periodu od godinu dana (52). Među bolesnicima sa teškom hemofilijom u Velikoj Britaniji 15% nije primalo terapiju tokom jednogodišnjeg praćenja (44). Sa druge strane, u studiji holandskih autora je utvrđeno da 25% bolesnika sa umerenom hemofilijom ima česta krvarenja i oštećenja zglobova (53). Opisani su i pojedinačni bolesnici sa blagom hemofilijom A i klinički teškim oblikom bolesti (54, 69).

S obzirom da kod dela bolesnika nivo FVIII:C nije pouzdan za procenu kliničke težine hemofilije A istražuje se mogućnost dobijanja dodatnih, klinički relevantnih podataka. Osnov za ispitivanje primene globalnih testova hemostaze je pretpostavka da su kliničke manifestacije uslovljene ukupnim hemostatskim statusom koji je rezultat prokoagulantnih, antikoagulantnih, profibrinolitičkih i antifibrinolitičkih faktora, uključujući trombocite i krvne sudove (55). U našoj grupi bolesnika sa hemofilijom A vrednosti UHP su bile statistički značajno niže u klinički teškom obliku hemofilije A u odnosu na klinički blag oblik, i iznosile su $0,39 \pm 1,02$ odnosno $2,76 \pm 2,62$, što je u skladu sa podacima iz literature. U studiji Antovića i sar. (69) vrednosti testova UHP i TGT su bile statistički značajno niže kod bolesnika sa klinički teškim oblikom hemofilije A. TGT test je korišćen u više studija i pokazano je da niske vrednosti parametara TGT testa koreliraju sa klinički teškim oblikom oboljenja, a da parametar ETP koji predstavlja ukupnu enzimsku aktivnost stvorenog trombina najbolje korelira sa rizikom krvarenja (47, 99). U studiji Dargaud i sar. (47) pokazano je da bolesnici sa klinički teškim oblikom hemofilije A imaju vrednosti parametra ETP ispod 50% od normalnih vrednosti nezavisno od nivoa FVIII:C. Opisani su pojedinačni slučajevi bolesnika sa blagom hemofilijom i čestim krvarenjima kod kojih su vrednosti parametra ETP bile izrazito snižene (54, 69). Ovi rezultati ukazuju da kapacitet za stvaranje trombina korelira sa kliničkom težinom bolesti i da bolesnici sa većim kapacitetom za stvaranje trombina imaju manji rizik krvarenja. U nekoliko studija je pokazana korelacija rezultata TEG sa kliničkim fenotipom hemofilije. Chitlur i sar. (107) su ispitali 39-oro dece sa teškom i umerenom hemofilijom A i hemofilijom B i pokazali smanjenu polimerizaciju fibrina kod bolesnika sa učestalim krvarenjima u odnosu na grupu sa blagim kliničkim manifestacijama. Novija istraživanja (115) su potvrdila ove rezultate.

Analiza individualnih podataka u našoj studiji ukazuje da su vrednosti UHP bile u skladu sa težinom krvarenja kod najvećeg broja bolesnika i da su nedetektabilne ili izrazito snižene vrednosti UHP statistički značajno češće prisutne kod bolesnika sa klinički teškim oblikom hemofilije A. Međutim, zapaženo je i neslaganje nivoa UHP i kliničke klasifikacije bolesti kod 12/76 (15,79%) bolesnika. Kod jednog bolesnika sa klinički teškim oblikom hemofilije A vrednost UHP od 6,7 je bila u granicama normalnih vrednosti, a kod drugog vrednost UHP od 3,23 je bila blago snižena. Oba bolesnika su imala FVIII:C

<1 IJ/dl. Kod 10 bolesnika sa klinički blagim oblikom bolesti vrednosti UHP su bile nedetektabilne ili izrazito snižene u rasponu vrednosti od 0 do 1,72. Vrednosti FVIII:C kod ovih 10 bolesnika su iznosile od <1 do 24 IJ/dl.

Naši rezultati su u skadu sa rezultatima studije studije Beltran-Mirande i sar. (116) koji su analizirali odnos kliničke težine hemofilije A i parametara TGT testa kod 23 bolesnika sa hemofilijom A iz 9 porodica. Pokazano je da od svih parametara ETP najbolje korelira sa težinom kliničke slike. Kod 4 porodice su opisali obolele članove sa različitom težinom kliničkih manifestacija, ali kod tri porodice varijacije kliničkog fenotipa nisu bile praćene očekivanim promenama vrednosti ETP. Takođe, u porodicama u kojima su oboleli članovi imali istu kliničku težinu oboljenja vrednosti ETP su bile varijabilne. Autori zaključuju da varijacije kliničke težine bolesti nisu uvek praćene očekivanim promenama parametara TGT testa i sugerišu uticaj drugih faktora hemostaze kao što su trombociti i zid krvnog suda. U cilju poboljšanja senzitivnosti TGT testa sugeriše se testiranje uzoraka plazme bogate trombocitima. Ispitivanja su pokazala efikasnost ovog pristupa (102, 132) kao i mogućnost izvođenja testa na prethodno zamrznutim uzorcima (133).

Naši rezultati i literaturni podaci ukazuju da varijabilnost kliničkih manifestacija ne zavisi samo od nivoa FVIII:C ali i da primena globalnih testova hemostaze ne predstavlja zamenu za određivanje nivoa FVIII:C već da omogućava dodatne informacije korisne za kliničku procenu kod dela bolesnika sa hemofilijom A. Mehanizam koji je u osnovi ove varijabilnosti je samo delimično razjašnjen i dalje se istražuje. Pokazano je da kod bolesnika sa hemofilijom A i FVIII:C <1 IJ/dl veoma male količine FVIII, koje su ispod granice detekcije standardnim testovima (<1-2 IJ/dl), mogu uticati na ukupni hemostatski status i biti u osnovi klinički blagog oblika bolesti (55). Santoagostino i sar. (56) su u grupi bolesnika sa hemofilijom A i FVIII:C <1 IJ/dl pokazali češće prisustvo non-null mutacija i veće vrednosti koncentracije antigena FVIII i testa TGT kod grupe bolesnika sa klinički blagim oblikom bolesti u odnosu na grupu sa klinički teškim oblikom bolesti. U cilju povećanja senzitivnosti merenja izrazito niskih vrednosti FVIII:C ispituje se primena AKK testa koji ima visoku senzitivnost za vrednosti FVIII:C <1 IJ/dl što dokazuje gotovo linearna korelacija ($r=0,98$) za vrednosti FVIII:C od 0,1 IJ/dl do 1 IJ/dl (109). Takođe, kod dela bolesnika sa blagom hemofilijom A prisustvo određenog tipa mutacija dovodi do

neslaganja rezultata koagulacijskog i hromogenog testa za FVIII:C što može uticati na neslaganje laboratorijske i kliničke procene težine oboljenja (86). Kada je prisutno neslaganje rezultata nije razjašnjeno koja od vrednosti FVIII:C reflektuje pravi klinički fenotip i globalni testovi hemostaze bi mogli biti korisni u proceni kliničke težine blage hemofilije. Na to ukazuju i rezultati Antovića i sar. (69) koji su opisali dva bolesnika sa blagom hemofilijom A i sličnim nivoom FVIII:C merenim hromogenim testom (14 IJ/dl odnosno 15 IJ/dl), a različitom kliničkom težinom oboljenja. Jedan bolesnik je imao česta krvarenja, nedetektabilne vrednosti UHP i veoma niske vrednosti TGT. Drugi bolesnik je imao blagu klinički sliku, a vrednosti UHP i TGT su bile normalne. Kod ovih bolesnika klinička težina bolesti korelira sa rezultatima globalnih testova hemostaze.

Iako globalni testovi hemostaze mogu dati korisne informacije za procenu težine krvarenja kod hemofilije A ipak pouzdana procena kliničke težine bolesti primenom jednog laboratorijskog testa još uvek nije moguća. Zato se procena kliničke težine hemofilije A i dalje zasniva na razlikama u pojavi i učestalosti krvarenja (55). Rana procena kliničke težine hemofilije ima veliki značaj jer omogućava individualni pristup u izboru optimalnog oblika lečenja. S obzirom da je glavni cilj terapije prevencija krvarenja i artropatije, potrebno je da se što ranije otkriju bolesnici sa velikim rizikom krvarenja i primeni rana profilaktička terapija. Takođe, od značaja je i da se otkrije 10-15% bolesnika sa FVIII:C <1% i klinički blagim oblikom bolesti koji se mogu lečiti samo u slučaju krvarenja ili se primena profilakse može odložiti, što bi eliminisalo rizike primene centralnog venskog katetera i doprinelo ekonomičnoj primeni lekova (64, 134).

U našoj studiji ispitano je 38 bolesnika sa teškim oblikom hemofilije A kod kojih je primenjena terapija za zaustavljanje krvarenja u zglobovima. Doza koncentrata FVIII je bila 1000-2000 IJ (raspon 11-31 IJ/kg, medijana 18 IJ/kg). Za laboratorijsku procenu odgovora na terapiju ispitane su vrednosti FVIII:C i UHP iz uzorka krvi uzetog 30 minuta posle terapije i upoređene su sa odgovarajućim vrednostima pre terapije.

Posle terapije dolazi do porasta vrednosti laboratorijskih parametara. Vrednosti FVIII:C su bile statistički značajno niže pre terapije u odnosu na vrednosti posle terapije i iznosile su $0,56 \pm 0,32$ IJ/dl odnosno $31,03 \pm 10,87$ IJ/dl. Takođe, vrednosti UHP su bile statistički značajno niže pre terapije i iznosile su $0,33 \pm 1,10$ a posle terapije $8,94 \pm 3,28$.

Rezultati ispitivanja kod naših bolesnika su u studiji Antovića sar. (69) upoređeni sa rezultatima kod 17 bolesnika sa hemofilijom A koji su bili na profilaktičkoj terapiji (1000-3000 IJ rekombinantnog FVIII 1-3 puta nedeljno). Vrednosti FVIII:C i UHP pre terapije su bile statistički značajno veće kod bolesnika na profilaksi. Posle terapije, iako su vrednosti FVIII:C kod bolesnika na profilaksi bile gotovo dvostruko veće, vrednosti UHP nisu bile statistički značajno različite između ove dve grupe. Ovakvi nalazi sugerišu da bi se adekvatan hemostatski efekat mogao postići uz manje doze FVIII za profilaksu, ali je za definitivan zaključak potrebno ispitivanje na većoj populaciji.

Ovi rezultati su u skladu sa podacima iz drugih studija. Beltran-Miranda i sar. (116) su analizirali kapacitet stvaranja trombina kod bolesnika sa teškom hemofilijom A *ex vivo*, posle dodavanja koncentrata FVIII u plazmu bolesnika. Oni su pokazali da je stvaranje trombina gotovo maksimalno za vrednost FVIII:C od 50 IJ/dl i da dalje povećanje do 100 IJ/dl minimalno povećava stvaranje trombina. Ova zapažanja su potvrđena u studiji Bassusa i sar. (117) gde je analiziran terapijski odgovor kod 40 bolesnika sa teškom hemofilijom A nakon primene koncentrata FVIII u dozi $29,3 \pm 12,9$ IJ/kg. Uzorci krvi pre i 30 minuta posle terapije su ispitani testovima za FVIII:C, TGT i TEG. Pokazano je da povećanje vrednosti FVIII:C na 30 IJ/dl dovodi do povećanja hemostatskog kapaciteta na 90-95% od maksimuma, a da povećanje FVIII:C na 100 IJ/dl donosi zanemarljivo povećanje hemostatskog kapaciteta. Ovi rezultati ukazuju da hemostatski efekat ne zavisi samo od povećanja nivoa FVIII:C u plazmi već i od uticaja primenjenog leka na druge plazmatske proteine i na krvne ćelije koji imaju ulogu u procesu hemostaze.

U našem ispitivanju utvrđena je statistički značajna korelacija doze koncentrata FVIII i nivoa FVIII:C posle terapije ($r=0,54$). Nasuprot tome nema statistički značajne korelacije doze i vrednosti UHP posle terapije ($r=0,21$). To takođe ukazuje da na efekat terapije utiču i drugi faktori koji određuju individualni hemostatski status. Rezultati Bassusa i sar. (117) ukazuju na statistički značajnu korelaciju doze koncentrata sa nivoom FVIII:C posle terapije ali na veoma slabu korelaciju sa parametrima testova TGT i TEG.

Naši rezultati pokazuju visoko statistički značajnu korelaciju vrednosti UHP i FVIII:C ($r=0,82$) u širokom rasponu vrednosti od <1 IJ/dl do 150 IJ/dl. Korelacija vrednosti FVIII:C i rezultata testova UHP, TGT i TEG pokazana je i u drugim studijama (47, 69, 103, 117).

Uprkos postojanju korelacije nivoa FVIII:C posle terapije sa veličinom doze koncentrata FVIII, prisutne su značajne razlike u terapijskom odgovoru između pojedinih bolesnika koji su primili istu dozu leka, što je posledica individualnih razlika u farmakokinetici koncentrata FVIII (61). Tako su, na primer, posle primene doze od 15 IJ/kg kod tri bolesnika vrednosti FVIII:C iznosile 39,3 IJ/dl, 32,3 IJ/dl odnosno 10,3 IJ/dl. Takođe, posle primene doze od 25 IJ/kg kod četiri bolesnika vrednosti FVIII:C su bile varijabilne i iznosile su 38,6 IJ/dl, 35,5 IJ/dl, 31,3 IJ/dl odnosno 31,8 IJ/dl.

Takođe, prisutna je značajna varijabilnost vrednosti UHP u terapijskom odgovoru između pojedinih bolesnika, što je posledica različitog uticaja primenjenog leka na ukupni hemostatski status. Tako su, na primer, kod tri bolesnika koji su primili 15 IJ/kg koncentrata FVIII vrednosti UHP su iznosile 9,86, 4,39 odnosno 11. Takođe, kod četiri bolesnika koji su primili dozu od 25 IJ/kg vrednosti UHP su iznosile 4,8, 16,11, 11,14 odnosno 14. Ovi rezultati su u skladu sa podacima iz literature. Lewis i sar. (102) su ispitivali odgovor na standardnu dozu koncentrata FVIII od 50 IJ/kg kod 9 bolesnika sa teškom hemofilijom A. Na uzorku pre terapije i na seriji uzoraka unutar 72 sata posle terapije merili su FVIII:C, TGT i TEG. Pokazan je visok stepen varijabilnosti odnosa vrednosti FVIII:C i TGT testa u celokupnom posmatranom vremenskom intervalu. Sa druge strane, uočeno je da je kod pojedinačnih bolesnika odnos FVIII:C i TGT stabilan. Ovo je u skladu sa pretpostavkom da bolesnici sa teškom hemofilijom A imaju različit individualni kapacitet stvaranja trombina (129). Rezultati TEG su bili u skladu sa rezultatima TGT testa ali je pokazano da je TEG manje senzitivna metoda za praćenje terapijskog odgovora. U studiji van Veena i sar. (103) potvrđeni su zaključci prethodne studije ispitivanjem terapijskog odgovora na koncentrat FVIII ili dezmozpresin kod 41-og bolesnika sa hemofilijom A.

U našoj studiji je pokazana varijabilnost vrednosti UHP kod bolesnika sa istim nivoom FVIII:C posle terapije. Tako su na primer, kod tri bolesnika sa nivoom FVIII:C od 25 IJ/dl, vrednosti UHP iznosile 14,5, 9,24 odnosno 7,42. Takođe, kod tri bolesnika sa nivoom FVIII:C od 31 IJ/dl vrednosti UHP su iznosile 7,85, 11,14 odnosno 15,07. Naši rezultati i podaci drugih autora (102, 103, 117) ukazuju da na varijabilnost terapijskog odgovora merenog globalnim testovima hemostaze, pored razlika u nivou FVIII:C,

značajan uticaj ima različit efekat primenjenog leka na ukupni hemostatski status kod bolesnika sa hemofilijom A. Varijabilnost vrednosti UHP, TGT i TEG kod bolesnika sa sličnim nivoom FVIII:C ukazuje na mogućnost primene globalnih testova u praćenju terapijskog odgovora i za prilagođavanje doze individualnim potrebama bolesnika. Očekuje se da bi na osnovu ovih rezultata bilo moguće utvrditi optimalan terapijski pristup za svakog bolesnika, za razliku od aktuelnog pristupa koji podrazumeva postizanje preporučenog nivoa FVIII:C (102).

U ispitanoj grupi bolesnika sa hemofilijom A, vrednosti UHP posle terapije su dostigle normalan nivo kod 36 bolesnika i iznosile su od 4,58 do 16,11. Kod dva bolesnika vrednosti UHP su bile blizu donje granice normalnih vrednosti i iznosile su 3,72 odnosno 3,94. Kod većine naših bolesnika vrednosti FVIII:C i UHP su snižene pre terapije, povećavaju se posle primene koncentrata FVIII i dostižu normalne vrednosti UHP. Međutim, neki od bolesnika pokazuju razlike u laboratorijskom odgovoru na terapiju. Kod jednog bolesnika sa FVIII:C <1 IJ/dl i nedetektabilnom vrednošću UHP pre terapije, dolazi do porasta vrednosti FVIII:C i UHP posle terapije ali UHP ne dostiže normalne vrednosti. Ovi rezultati ukazuju da je potrebno proceniti da li je primenjena doza dovoljna za zaustavljanje krvarenja kod ovog bolesnika. Kod drugog bolesnika i pored FVIII:C <1 IJ/dl vrednost UHP pre terapije je u granicama normalnih vrednosti. Posle primene koncentrata FVIII dolazi do značajnog povećanja FVIII:C i sasvim malog porasta vrednosti UHP. Ovakvi rezultati ukazuju na mogućnost razmatranja primene manje doze leka za postizanje klinički efikasnog terapijskog odgovora.

I druge studije opisuju individualnu varijabilnost u odgovoru na terapiju. van Veen i sar. (103) su opisali 10 bolesnika sa normalnim rezultatima TGT testa pre terapije uprkos niskim vrednostima FVIII:C. Takođe, opisuju dva bolesnika koja posle terapije u pripremi za operaciju dostižu normalan nivo FVIII:C ali vrednosti TGT ostaju snižene. Oba bolesnika nisu produženo krvarila tokom ili posle operacije. U studiji Antovića i sar. (69) opisana su dva bolesnika sa blagom hemofilijom A i sličnim nivoom FVIII:C (14 IJ/dl odnosno 15 IJ/dl), gde je jedan zbog čestih krvarenja bio na profilaksi dok je drugi povremeno primao terapiju za zaustavljanje krvarenja. Kod bolesnika na profilaksi vrednosti UHP su nedetektabilne i vrednosti TGT veoma niske pre terapije, a posle terapije

ne dostižu normalne vrednosti. Kod drugog bolesnika, koji je primao terapiju za zaustavljanje krvarenja, vrednosti UHP i TGT su bile normalne pre i posle terapije. U istoj studiji je zapaženo da je 29% (5/17) bolesnika koji su bili na profilaksi imalo normalne vrednosti UHP i TGT pred sledeću primenu koncentrata FVIII. Ovi rezultati ukazuju da bi se adekvatan hemostatski efekat kod nekih bolesnika mogao postići primenom manje doze koncentrata FVIII:C. To je u skladu sa podacima o potrebi individualnog pristupa u lečenju bolesnika sa hemofilijom (135).

Podaci iz naše studije i literaturni podaci (69, 112, 113) ukazuju da primena UHP testa može pružiti klinički značajne informacije o težini oboljenja i terapijskom odgovoru kod hemofilije A. Test UHP nije zamena za određivanje FVIII:C već metoda koja može pružiti dodatne informacije korisne za izbor optimalnog terapijskog pristupa i procenu optimalne doze leka za zaustavljanje krvarenja i profilaksu u skladu sa individualnim potrebama. Preporučeni protokoli za profilaksu imaju tendenciju primene veće doze leka da bi se rizik krvarenja sveo na minimum. Mogućnost da se kod dela bolesnika na profilaksi može postići adekvatan hemostatski odgovor uz primenu manje doze leka bi omogućilo smanjenje potrošnje leka i veću pristupačnost profilaktičkog oblika lečenja (66).

S obzirom da je UHP test pokazao senzitivnost u širokom rasponu vrednosti FVIII:C (69, 112) može se koristiti i za procenu optimalnog protokola u prevenciji perioperativnih krvarenja. Primenom UHP testa je pokazana normalizacija hemostatskog statusa kod bolesnika sa hemofilijom A i inhibitorima posle primene rFVIIa. To ukazuje na mogućnost primene testa u praćenju efikasnosti i potencijalnog trombogenog efekta by-pass terapije. rFVIIa i aPCC ostvaruju terapijski efekat bez uticaja na nivo FVIII, a mehanizam delovanja ovih lekova je kompleksan, tako da hemostatski efekat nije moguće predvideti primenom standardnih testova (119). Pokazano je da je UHP test koristan i u praćenju efekta antifibrinolitičke terapije što do sada nije bilo moguće primenom standardnih testova (112)

Takođe, pokazan je klinički značaj primene drugih globalnih testova hemostaze u praćenju odgovora na terapiju. Poređenjem primene UHP i TGT testa (69) zaključeno je da su oba testa korisna u proceni odgovora na terapiju kod bolesnika sa hemofilijom A. U nekoliko studija (47, 102, 136) je pokazano da primena TGT testa može omogućiti unapređenje pristupa u lečenju hemofilije A. Primena testova TGT i TEG je upoređena u

nekoliko studija (103, 115, 117) i pokazano je da se test TEG može koristiti za procenu terapijskog odgovora u hemofiliji A. Međutim, rezultati ukazuju na manju senzitivnost testa TEG i manji stepen korelacije sa nivoom FVIII:C posle terapije u odnosu na test TGT. To je rezultat uticaja velikog broja činilaca sistema hemostaze zbog čega TEG ima širok raspon normalnih vrednosti. Zato je metoda TEG pogodnija za praćenje promena u sistemu hemostaze kod jedne osobe nego kao dijagnostički test u odnosu na referentne vrednosti (104). Primena testova TGT i TEG takođe omogućava procenu efekta by-pass terapije kod bolesnika sa hemofilijom A i inhibitorima (119).

Naši rezultati i rezultati navedenih studija ukazuju da primena globalnih testova hemostaze doprinosi izboru optimalnog terapijskog pristupa kod bolesnika sa hemofilijom A. To je od posebnog značaja s obzirom da se radi o oboljenju koje zahteva doživotno lečenje da bi se prevenirala pojava invalidnosti i skraćenje životnog veka (60). Iako je u osnovi hemofilije A deficit FVIII koagulacije, na klinički status i terapijski odgovor utiče niz činilaca sistema hemostaze što se ispituje testovima globalne hemostaze. Svaki od dostupnih globalnih testova ispituje deo kompleksnog procesa hemostaze (97).

Test UHP omogućava procenu ukupnog koagulacijskog i fibrinolitičkog potencijala. Jednostavan je za izvođenje, nije potrebna specijalna oprema, rezultati se dobijaju za sat vremena od uzimanja uzorka i mogu se koristiti sveži ili prethodno zamrznuti uzorci plazme. UHP test se primenjuje u nekoliko laboratorija (137, 138) uz modifikacije koje doprinose novim mogućnostima za primenu testa, ali još uvek nije komercijalno dostupan. Takođe, kliničke studije na većem broju bolesnika su neophodne pre šire kliničke primene. S obzirom na značaj procesa stvaranja i razgradnje fibrina u patogenezi krvarenja i odgovoru na terapiju kod bolesnika sa hemofilijom A primena UHP testa daje više informacija o hemostatskom statusu u poređenju sa TGT testom (111).

TGT test pruža detaljne informacije o kinetici stvaranja trombina u plazmi. Rezultati preliminarnih ispitivanja su pokazali da primena TGT testa omogućava klinički korisne informacije u proceni hipo- i hiperkoagulabilnosti (99). Na raspolaganju su komercijalni testovi koji su automatizovani i relativno jednostavni za izvođenje (101, 139). Intenzivno se radi na standardizaciji TGT testa što ga čini pogodnim za klinička ispitivanja (140).

Međutim, glavni nedostatak testa je nemogućnost procene procesa stvaranja fibrina i njegove razgradnje u procesu fibrinolize.

Test AKK omogućava procenu stvaranja i razgradnje fibrina u uzorku plazme i tako procenu interakcije činilaca sistema koagulacije i fibrinolize. Prednosti testa su jednostavnost izvođenja u nastavku APTT testa, jednostavnost standardizacije kao i senzitivnost za vrednosti FVIII:C <1 IJ/dl (108, 109). Međutim, neophodna je procena primene testa u različitim kliničkim situacijama i na većem broju bolesnika.

Testovi UHP, TGT i AKK omogućavaju procenu sekundarne hemostaze. Ovim testovima se ne procenjuje uloga krvnih ćelija u procesu hemostaze i zato se razvijaju modifikacije testova. Modifikacija UHP testa podrazumeva dodavanje prečišćenih trombocitnih fosfolipida i rekombinantnog TF kao aktivatora koagulacije i doprinosi većoj senzitivnosti testa (111). Ispitivanje TGT na uzorcima plazme bogate trombocitima omogućava procenu uloge trombocita (132, 133). Međutim, ovim testovima nije moguće ispitati uticaj leukocita i eritrocita na proces hemostaze.

Primenom testa TEG dobijaju se podaci koji su najbliži događanjima *in vivo* jer se ovim testom procenjuje kumulativni efekat većine činilaca hemostaze uključujući sistem koagulacije, sistem fibrinolize i ćelijske elemente krvi u procesu stvaranja fibrina (104). Rezultati studija su pokazali da se ovaj test može koristiti u raznim kliničkim situacijama (106, 107). Najveći nedostatak testa je odsustvo standardizacije, jer se koriste različiti načini uzimanja uzoraka i različita tehnologija za izvođenje testa. Takođe, s obzirom da se TEG izvodi na uzorku cele krvi test mora biti urađen unutar nekoliko sati od uzimanja uzorka i nema mogućnosti ispitivanja prethodno zamrznutog uzorka (104).

Iako preliminarni rezultati ukazuju na značaj primene globalnih testova hemostaze u lečenju hemofilije A prisutni su faktori koji ograničavaju njihovu široku kliničku primenu. Standardizacija testiranja je posebno značajna u kliničkim situacijama kada se odluke vezane za dijagnozu i terapiju donose na osnovu rezultata ovih testova (98). Intenzivno se radi na unapređenju standardizacije koja se odnosi na uzimanje i obradu uzorka, vrstu reagenasa kao i izbor aparata i automatizaciju testiranja (140, 141, 142). Neophodne su i kliničke studije na većem broju ispitanika koje će omogućiti pouzdanu procenu korelacije parametara testiranja sa kliničkim fenotipom i terapijskim efektom (97).

Saznanja o visokoj učestalosti nekih naslednih faktora trombofilije podstakla su ispitivanja i kod bolesnika sa hemofilijom A. U našem ispitivanju faktori trombofilije su bili prisutni kod 27,63% (21/76) bolesnika, a u kontrolnoj grupi kod 23,33% (7/30) zdravih muških osoba. Nije pokazana statistički značajna razlika između ispitanih grupa. Učestalost mutacije FVL u grupi bolesnika sa hemofilijom A je iznosila 3,95% (3/76), a u kontrolnoj grupi mutacija FVL je bila prisutna kod 3,33% (1/30) osoba. Mutacija FII G20210A je otkrivena kod 6,58% (5/76) bolesnika sa hemofilijom A i kod 6,67% (2/30) osoba u kontrolnoj grupi. Mutacija MTHFR 677TT je bila prisutna kod 18,42% (14/76) bolesnika sa hemofilijom A i kod 13,33% (4/30) osoba u kontrolnoj grupi. Nije pokazana statistički značajna razlika učestalosti navedenih mutacija u ispitanim grupama.

Učestalost faktora trombofilije u našoj grupi bolesnika sa hemofilijom A je u skladu sa podacima o učestalosti u opštoj populaciji koja iznosi za FVL 3-7%, za FII G20210A 1-6% i za MTHFR 677TT 5-12 % (82). Naši rezultati su u skladu i sa podacima iz studija (143, 144) u kojima je opisana učestalost navedenih mutacija u opštoj populaciji Srbije. Takođe, naši rezultati se ne razlikuju od prethodno objavljenih rezultata učestalosti ovih mutacija kod bolesnika sa hemofilijom A (83, 145, 146, 147).

Vrednosti UHP u grupi bolesnika sa hemofilijom A i trombofilijom su iznosile $0,47 \pm 1,01$, a u grupi bolesnika sa hemofilijom A bez trombofilije $1,23 \pm 2,11$. Za ove vrednosti nije pokazana statistički značajna razlika i naši rezultati ne ukazuju na uticaj faktora trombofilije na vrednosti UHP. U studiji van't Veera i sar. (148) u *in vitro* uslovima je pokazano povećano stvaranje trombina u uzorcima plazme bolesnika sa hemofilijom A i prisustvom mutacije FVL. Međutim, faktori trombofilije su samo deo kompleksne interakcije brojnih proteina čiji se efekat meri globalnim testovima tako da smanjeno stvaranje trombina kod osoba sa hemofilijom A u nekim slučajevima može biti kompenzovano delovanjem faktora trombofilije, dok kod drugih taj efekat može izostati.

Ispitivanja su pokazala da povećan nivo faktora koagulacije može biti faktor rizika za trombozu, a najveći stepen rizika ima povećanje nivoa FVIII, FIX, FXI i protrombina. Povećan nivo faktora koagulacije dovodi do povećanog stvaranja trombina i tako može uticati na rezultate globalnih testova hemostaze i kod bolesnika sa hemofilijom A (149). U našoj grupi bolesnika sa hemofilijom A analiziran je uticaj nivoa faktora koagulacije i

inhibitora koagulacije kao i prisustva mutacija FVL, FII G20210A i MTHFR 677TT na vrednosti UHP primenom multiple regresije. Parcijalne korelacije ispitanih parametara sa vrednostima UHP nisu bile statistički značajne osim za FVIII:C gde je dobijena statistički značajna korelacija ($\beta=0,718$; $p<0,001$). Ovi rezultati ukazuju da nivo FVIII:C ima najveći uticaj na vrednosti UHP testa kod bolesnika sa hemofilijom A.

Kod naših bolesnika sa hemofilijom A vrednosti ispitanih faktora i inhibitora koagulacije su bili u širokom rasponu normalnih vrednosti. Brummel-Ziedins i sar. (150) su pokazali da varijacije nivoa faktora i inhibitora koagulacije u rasponu normalnih vrednosti mogu uticati na stvaranje trombina u različitim patološkim stanjima. Takođe, ovi autori su pokazali da karakterističan individualni odnos prokoagulantnih i antikoagulantnih faktora kod bolesnika sa hemofilijom A utiče na stvaranje trombina. Kod 11 bolesnika sa teškom hemofilijom A, primenom TGT na uzorku cele krvi i matematičkog modela gde su kao parametri korišćene vrednosti faktora i inhibitora koagulacije, zapažena je petostruka razlika u stvaranju trombina bez obzira što su svi bolesnici imali FVIII:C <1 IJ/dl (130).

Naši rezultati i literaturni podaci (113, 148, 149, 150) ukazuju da, iako je FVIII:C glavni parametar, i drugi činioci sistema koagulacije mogu uticati na ukupni hemostatski status kod bolesnika sa hemofilijom A. Očekuje se da će primena testova globalne hemostaze doprineti preciznijem definisanju individualnih razlika u kliničkoj slici i terapijskom odgovoru, a Mann i sar. (129) sugerišu da će u budućnosti individualni fenotip bitno uticati na terapijski pristup kod bolesnika sa hemofilijom. Radi se na daljem razvoju kompjuterizovanog modela stvaranja trombina koji će integrisati podatke o nivou faktora i inhibitora koagulacije i tako doprineti unapređenju individualnog pristupa u lečenju.

S obzirom da nivo FVIII:C nije u svim slučajevima optimalan metod za procenu kliničke težine hemofilije A istražuje se mogućnost dobijanja dodatnih, klinički relevantnih podataka ispitivanjem uticaja faktora trombofilije na izraženost kliničkih manifestacija (55). U ispitanoj grupi bolesnika sa hemofilijom A prisustvo faktora trombofilije je dokazano kod 30,36% (17/56) bolesnika sa klinički teškim oblikom bolesti i kod 20% (4/20) bolesnika sa klinički blagim oblikom hemofilije A. Nije pokazana statistički značajna razlika učestalosti faktora trombofilije u odnosu na kliničku težinu bolesti.

Mutacija FVL je prisutna kod 5,36% (3/56) bolesnika sa klinički teškim oblikom, a nije prisutna u grupi bolesnika sa klinički blagim oblikom hemofilije A. Mutacija FII G20210A je otkrivena kod 5,36% (3/56) bolesnika sa klinički teškim i kod 10% (2/20) sa klinički blagim oblikom bolesti. Mutacija MTHFR 677TT je prisutna kod 21,43% (12/56) bolesnika sa klinički teškom i kod 10% (2/20) bolesnika sa klinički blagom hemofilijom A. Nije utvrđena statistički značajna razlika za učestalost ispitivanih mutacija u odnosu na težinu kliničke slike. Kod jednog bolesnika je utvrđeno istovremeno prisustvo mutacija FVL i MTHFR 677TT i on je manifestovao klinički težak oblik hemofilije A. Naši rezultati ne ukazuju na protektivni uticaj faktora trombofilije na kliničku težinu hemofilije A.

Podaci iz literature su kontroverzni, a ova kontroverza je delom posledica činjenice da su studije rađene na malom broju bolesnika i da su bile različito koncipirane. Rezultati nekih studija ukazuju da prisustvo mutacija FVL (145, 146), FII G20210A (147) i MTHFR 677TT (151) može ublažiti kliničku sliku hemofilije A. U studiji Nowak-Gottl i sar. (83) ispitivanjem 103 dečaka sa teškom hemofilijom A je pokazano da se prvo krvarenje javlja statistički značajno kasnije kada su prisutni faktori trombofilije u odnosu na bolesnike koji nemaju trombofiliju (1,6 vs 0,9 godina). Analizom podataka kod 107 dečaka sa teškom hemofilijom A zaljučeno je da su godišnji broj krvarenja i izraženost artropatije statistički značajno niži kod bolesnika koji su imali FVL ili FII G20210A mutaciju (152). Naši rezultati su u skladu sa studijama koje nisu potvrdile ove nalaze. Arbini i sar. (153) su kod 17 bolesnika sa teškom hemofilijom A i hemofilijom B i blagim kliničkim manifestacijama opisali samo jednog bolesnika sa mutacijom FVL. Araújo i sar. (154) kod 37 bolesnika sa teškom i umerenom hemofilijom A i hemofilijom B nisu pokazali uticaj mutacija FVL, FII G20210A i MTHFR 677TT na broj krvarenja i potrošnju koncentrata. Takođe, u studiji Di Perna i sar. (155) u grupi od 108 bolesnika sa hemofilijom A i 13 sa hemofilijom B različite težine oboljenja nije pokazan uticaj mutacija FVL i FII G20210A na kliničku težinu hemofilije. Autori navode da s obzirom da je studija obuhvatila samo odrasle bolesnike dobijeni rezultati ne isključuju mogućnost uticaja faktora nasledne trombofilije na kliničku težinu hemofilije kod dece kako je zapaženo u studiji Kurnik i sar. (152) gde su ispitivani bolesnici uzrasta od novorođenčeta do 16 godina. I u našoj studiji 64/76 (84%) bolesnika je uzrasta iznad 16 godina, što uz činjenicu da su svi bolesnici u

našoj studiji imali umerene i blage faktore nasledne trombofilije može objasniti izostanak njihovog uticaja na vrednosti UHP i težinu kliničke slike.

Najviše podataka u literaturi se odnosi na mutaciju FVL i smatra se da ova mutacija može imati uticaja na kliničku težinu hemofilije A. Što se tiče drugih faktora trombofilije podaci koji su na raspolaganju ne omogućavaju donošenje relevantnog zaključka. Potrebna su dalja istraživanja, a posebno istraživanje uticaja snažnih faktora trombofilije (homozigoti za FVL, deficit antitrombina i deficit protein C) da bi se procenio uticaj faktora trombofilije na globalne testove hemostaze i kliničku težinu hemofilije (55).

Iako faktori trombofilije mogu uticati na kliničku težinu oni su u osnovi samo malog dela varijabilnosti. S obzirom da povećanje nivoa faktora koagulacije dovodi do povećanog stvaranja trombina (156) to bi moglo imati modulatorni uticaj na izraženost kliničkih manifestacija hemofilije A. Analizirali smo uticaj nivoa faktora koagulacije i inhibitora koagulacije kao i prisustva mutacija FVL, FII G20210 A i MTHFR 677TT na kliničku težinu hemofilije A primenom multiple regresije. Od svih ispitanih parametara jedino faktor FVIII:C pokazuje statistički značajnu korelaciju ($\beta=0,68$; $p<0,001$). Ovi rezultati ukazuju da nivo FVIII:C ima najveći uticaj na težinu kliničke slike kod bolesnika sa hemofilijom A.

Uticaj faktora i inhibitora koagulacije na težinu kliničkih manifestacija hemofilije A ispitivali su i drugi autori. U studiji van Dijka i sar. (157) ispitana je grupa od 42 bolesnika sa hemofilijom A i FVIII:C <1 IJ/dl. Klinički blag oblik bolesti je bio prisutan kod 21, a klinički težak oblik takođe kod 21 bolesnika. Pokazano je da nema statistički značajne razlike nivoa faktora i inhibitora koagulacije između ispitivanih grupa. Međutim, Brummel-Ziedins i sar. (150) su pokazali da varijacije nivoa faktora i inhibitora koagulacije u rasponu normalnih vrednosti mogu uticati na stvaranje trombina i na izraženost kliničkih manifestacija kod bolesnika sa hemofilijom A

Varijabilnost kliničkih manifestacija hemofilije A je posledica kompleksnosti sistema hemostaze koji uključuje više međusobno povezanih puteva aktivacije i inhibicije. Opisan je uticaj faktora trombofilije (83, 131, 152), sistema fibrinolize (131, 158) i individualnih varijacija nivoa faktora i inhibitora koagulacije (150). Ipak, nisu poznati svi faktori koji utiču na težinu kliničke slike i postoji potreba za daljim istraživanjem u ovoj oblasti.

Na osnovu parametra VLK procenjen je uticaj ukupne fibrinolize, a na osnovu parametara VLK dif, TAFI i TAFIa/TAFIai uticaj fibrinolize zavisne od TAFI na sklonost i težinu krvarenja i na terapijski odgovor kod bolesnika sa hemofilijom A.

U ispitanoj grupi bolesnika sa hemofilijom A prisutna je ubrzana fibrinoliza. Vrednosti VLK su bile statistički značajno niže kod bolesnika sa hemofilijom A u odnosu na kontrolu i iznosile su $9,03 \pm 6,05$ minuta odnosno $27,03 \pm 9,75$ minuta. Takođe, vrednosti VLK dif su bile statistički značajno niže u hemofiliji A u odnosu na kontrolu i iznosile su $1,59 \pm 1,27$ minuta odnosno $17,13 \pm 10,31$ minuta. Naši rezultati su u skladu sa podacima iz ranijih studija gde je u *in vitro* uslovima i primenom drugačije metodologije pokazano da je ubrzana fibrinoliza prisutna kod bolesnika sa hemofilijom A. Prvi su Broze i sar. (37) pokazali da je VLK skraćeno u plazmi bez FVIII i pretpostavili da ubrzana fibrinoliza doprinosi povećanoj tendenciji krvarenja kod hemofilije A. Korekcija VLK se dešava posle dodavanja FVIII kao i posle dodavanja trombomodulina koji dovodi do pojačane aktivacije TAFI. Mosnier i sar. (38) su potvrdili ove rezultate i pokazali korekciju VLK u uzorcima plazme bolesnika sa hemofilijom A posle dodavanja FVIII, trombomodulina ili TAFI. Ovi nalazi su ukazali na ulogu fibrinolize zavisne od TAFI u patogenezi krvarenja u hemofiliji A što je potvrđeno i u kasnijim *in vitro* studijama (159, 160).

Ispitivanjem proenzima TAFI pokazane su statistički značajno veće vrednosti u grupi sa hemofilijom A u odnosu na kontrolnu grupu i iznosile su $10,75 \pm 1,99$ $\mu\text{g/ml}$ odnosno $6,81 \pm 1,85$ $\mu\text{g/ml}$. Pokazan je i povećan stepen aktivacije TAFI kod bolesnika sa hemofilijom A. Vrednosti TAFIa/TAFIai su bile statistički značajno veće u grupi sa hemofilijom A u odnosu na kontrolnu grupu iznosile su $13,52 \pm 3,38$ ng/ml odnosno $10,43 \pm 1,71$ ng/ml .

S obzirom da je pokazano da nivo TAFI korelira sa proteinima reaktantima akutne faze (162) povećanje proenzima TAFI kod hemofilije A se može tumačiti kao deo reakcije akutne faze. Povećan nivo TAFI može biti rezultat pojačane sinteze proteina u jetri kao odgovor na ubranu fibrinolizu kod bolesnika sa hemofilijom A, a u cilju uspostavljanja ravnoteže u sistemu fibrinolize. Grünwald i sar. (158) sugerišu da neefikasna hemostaza u odgovoru na ponavljana krvarenja kod bolesnika sa hemofilijom uzrokuje produženu

stimulaciju u sistemu koagulacije, a istovremeno i u sistemu fibrinolize što dovodi do njenog ubrzanja i tako stimulacije za pojačanu sintezu proenzima TAFI u jetri.

Trombin je glavni aktivator TAFI u fiziološkim uslovima, a opisano je i delovanje plazmina na aktivaciju TAFI. Kako je stvaranje trombina izrazito smanjeno kod hemofilije A (47, 102, 103), a prisutno je povećano stvaranje plazmina i ubrzana fibrinoliza moguće je da je aktivacija TAFI u hemofiliji A posledica delovanja plazmina. U *in vitro* ispitivanju (163) na modelu lize koaguluma pokazana je bifazna aktivacija TAFI, tokom procesa koagulacije delovanjem trombina i tokom fibrinolize delovanjem plazmina. Uloga plazmina u aktivaciji TAFI u fiziološkim uslovima nije sasvim razjašnjena. U normalnim uslovima stvaranje trombina prethodi stvaranju plazmina tako da je uloga plazmina u regulaciji aktivnosti TAFI od ograničenog značaja i može uticati da se TAFI aktivira u neposrednoj blizini fibrina i tako doprinese stabilnosti koaguluma (164). Kod bolesnika sa hemofilijom A aktivacija TAFI delovanjem plazmina može biti mehanizam povratne sprege u pokušaju uspostavljanja ravnoteže u sistemu fibrinolize koje bi trebalo da dovede do smanjenja brzine lize koaguluma i smanjenja sklonosti ka krvarenju kod bolesnika.

Naši rezultati, kao i podaci iz literature (158) ukazuju da kod hemofilije A izostaje efikasna inhibicija fibrinolize i pored toga što se sintetišu povećane količine proenzima TAFI i što je povećana aktivacija TAFI. Razlog je poremećaj u stvaranju trombina, glavnog aktivatora TAFI. Aktivacija TAFI koja može efikasno usporiti proces fibrinolize se odvija u prisustvu visokih koncentracija trombina koje se dostižu u fazi propagacije koagulacije i to unutar koaguluma na mestu povrede, a u osnovi hemofilije A je upravo poremećaj stvaranja trombina u fazi propagacije (34).

Naši rezultati TAFI kod bolesnika sa hemofilijom A se delom razlikuju od rezultata prethodnih ispitivanja. Antović i sar. (94) su ispitivanjem 32 bolesnika sa hemofilijom A i 13 zdravih osoba pokazali da je nivo proenzima TAFI statistički značajno niži kod bolesnika sa hemofilijom A. Moguće objašnjenje je da su za procenu nivoa TAFI korišćeni različiti testovi. U navedenoj studiji korišćen je funkcionalni test, a u našem ispitivanju specifični ELISA test. Međutim, naši rezultati koji ukazuju na pojačanu aktivaciju TAFI kod bolesnika sa hemofilijom A su u skladu sa rezultatima druge studije Antovića i sar.

(95) gde su primenom ELISA metode detektovane statistički značajno veće vrednosti TAFIa/TAFIai kod bolesnika sa hemofilijom A u odnosu na kontrolu.

Testovi za direktno merenje različitih formi TAFI su odnedavno na raspolaganju, tako da su ranije studije fibrinolize koristile *in vitro* metode bazirane na VLK za procenu aktivnosti TAFI (37, 38). Kasnije, samo u nekoliko studija je ispitivan nivo TAFI kod bolesnika sa hemofilijom A primenom metoda manje specifičnosti (94, 95, 161). Zatim su razvijeni visokospecifični ELISA testovi koji su omogućili merenje različitih formi molekula TAFI (92, 93). Ove nove metode su do sada korišćene u manjem broju studija, a u našoj studiji prvi put za ispitivanje kod bolesnika sa hemofilijom. Potrebna su dalja ispitivanja da bi se procenila definitivna uloga TAFI u regulaciji sistema fibrinolize kod bolesnika sa hemofilijom A.

U ispitanoj grupi sa hemofilijom A ubrzanje fibrinolize je izraženije kod bolesnika sa klinički teškim oblikom bolesti. Vrednosti VLK su bile statistički značajno niže u klinički teškom u odnosu na klinički blag oblik hemofilije A i iznosile su $7,41 \pm 4,93$ minuta odnosno $13,07 \pm 6,86$ minuta.

Međutim, aktivnost TAFI merena indirektno ili direktno ne omogućava procenu kliničke težine hemofilije A. Nije pristuna statistički značajna razlika za vrednosti VLK dif između klinički teškog i klinički blagog oblika, a vrednosti su iznosile $1,46 \pm 1,46$ minuta odnosno $1,90 \pm 0,74$ minuta. Vrednosti TAFI nisu bile statistički značajno različite u klinički teškom u odnosu na klinički blag oblik hemofilije A i iznosile su $10,66 \pm 2,03$ $\mu\text{g/ml}$ odnosno $10,98 \pm 1,81$ $\mu\text{g/ml}$. Statistički značajna razlika nije utvrđena ni za vrednosti TAFIa/TAFIai koje su iznosile $13,56 \pm 3,43$ ng/ml kod klinički teške odnosno $13,40 \pm 3,29$ ng/ml kod klinički blage hemofilije A. Takođe, u našem ispitivanju vrednosti TAFI i TAFIa/TAFIai ne koreliraju sa kliničkom težinom hemofilije A. To pokazuje analiza uticaja nivoa FVIII:C, TAFI i TAFIa/TAFIai na učestalost krvarenja primenom multiple regresije. Od ispitanih parametara jedino faktor FVIII:C pokazuje statistički značajnu korelaciju ($\beta=0,68$; $p<0,001$) sa učestalošću krvarenja, a parcijalne korelacije TAFI i TAFIa/TAFIai nisu bile statistički značajne.

U nekoliko studija je ispitivana povezanost TAFI sa težinom kliničkih manifestacija hemofilije A i dobijeni su kontroverzni rezultati. Naši rezultati su u skladu sa studijom

Mosniera i sar. (38) gde ispitivanjem 56 bolesnika sa teškom hemofilijom A nije potvrđena korelacija između nivoa ukupnog antigena TAFI merenog ELISA testom i kliničke težine hemofilije A. Rezultati drugih studija su ukazali na povezanost nivoa TAFI i težine kliničke slike hemofilije (131, 165). U nedavno objavljenoj studiji Foley i sar. (165) pokazano je da količina TAFIa izmerena funkcionalnim testom kod 9 bolesnika sa teškom hemofilijom A statistički značajno korelira sa brojem hemartroza ($r=0,77$) i ukupnim brojem krvarenja ($r=0,75$) tokom godine. Autori zaključuju da merenje aktivacije TAFI može doprineti proceni težine kliničkih manifestacija kod bolesnika sa hemofilijom A.

Ukupna fibrinoliza i fibrinoliza zavisna od TAFI pre terapije su ubrzane u grupi bolesnika sa hemofilijom A u odnosu na kontrolnu grupu. Terapija popravља ukupnu fibrinolizu i u manjoj meri fibrinolizu zavisnu od TAFI. Vrednosti VLK posle terapije ($23,72\pm 7,31$ minuta) nisu bile statistički značajno različite u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi ($27,03\pm 9,75$ minuta), dok vrednosti VLK dif ($6,79\pm 3,70$ minuta) uprkos porastu ostaju statistički značajno niže nego u kontrolnoj grupi ($17,13\pm 10,31$ minuta). Ovo je u skladu sa zapažanjem da je znatno niži nivo FVIII:C potreban za normalizaciju VLK nego za normalizaciju aktivacije TAFI. Foley i sar. (160) su pokazali da nivo FVIII:C od 10 IU/dl normalizuje VLK, dok je za normalnu aktivaciju TAFI potreban nivo FVIII:C od 50 IU/dl.

Vrednosti VLK pre i posle terapije je bilo moguće izmeriti kod 23 od 38 bolesnika sa hemofilijom A. Vrednosti su bile statistički značajno niže pre terapije u odnosu na vrednosti posle terapije i iznosile su $6,89\pm 4,83$ minuta odnosno $23,72\pm 7,31$ minuta. VLK dif pre i posle terapije je bilo moguće izmeriti samo kod 8 od 38 bolesnika. Vrednosti VLK dif su bile statistički značajno niže pre terapije i iznosile su $1,19\pm 1,56$ minuta, a posle terapije $5,63\pm 3,45$ minuta.

Promene parametara fibrinolize i fibrinolize zavisne od TAFI posle terapije ne zavise od doze FVIII. Nije pokazana statistički značajna korelacija doze koncentrata FVIII i vrednosti VLK ($r=0,18$) i VLK dif ($r=0,12$) posle terapije. Međutim, fibrinoliza i fibrinoliza zavisna od TAFI su u korelaciji sa vrednostima FVIII:C i UHP. Utvrđena je statistički značajna korelacija za vrednosti VLK i FVIII:C ($r=0,76$) kao i za vrednosti VLK i UHP ($r=0,84$) posle terapije. Takođe, utvrđena je statistički značajna korelacija za vrednosti

VLK dif i FVIII:C ($r=0,45$) i za vrednosti VLK dif i UHP ($r=0,76$). Povećanje nivoa FVIII:C je ključni faktor koji utiče na fibrinolizu i fibrinolizu zavisnu od TAFI kod hemofilije A. Usled povećanja nivoa FVIII dolazi do povećanog stvaranja trombina i povećane aktivacije TAFI i tako do normalizacije UHP i VLK. Korekcija vrednosti VLK dif posle terapije ukazuje da je aktivacija TAFI jedan od mehanizama koji je u osnovi korekcije fibrinolize kod bolesnika sa hemofilijom A posle terapije.

Naši rezultati ispitivanja fibrinolize kod bolesnika sa hemofilijom A su u skladu sa prethodno publikovanim podacima dobijenim u *in vitro* ispitivanjima. Mosnier i sar. (38) su na uzorcima plazme bolesnika sa teškom hemofilijom A ispitivali VLK metodom turbidimetrije. Autori su pokazali su da je fibrinoliza izrazito ubrzana, a da se normalizuje posle dodavanja FVIII ili TAFI. Ovi nalazi su potvrđeni u studiji Foley i sar. (160) koji su ispitivali VLK i nivo aktivacije TAFI u plazmi bez FVIII i pokazali da posle dodavanja normalne plazme ili trombomodulina dolazi do korekcije parametara fibrinolize. Antović i sar. (112) su primenom UHP testa ispitivali ukupni fibrinolitički potencijal u nizu mešavina plazme bez FVIII i normalne plazme u različitim odnosima i pokazali da sa porastom nivoa FVIII dolazi do korekcije ubrzane fibrinolize. Ovi rezultati ukazuju da je koncentracija FVIII glavni faktor koji utiče na promene u sistemu fibrinolize kod hemofilije A.

S obzirom da primena terapije kod bolesnika sa hemofilijom A povećava stvaranje trombina (47, 102, 103) pretpostavlja se da ima uticaj i na aktivaciju TAFI. Ispitivali smo nivo TAFI i TAFIa/TAFIai kod bolesnika sa hemofilijom A pre i posle terapije u cilju procene uticaja fibrinolize zavisne od TAFI na terapijski odgovor. Primena koncentrata FVIII nije imala uticaja na nivo TAFI, ali je uticala na povećanje nivoa TAFIa/TAFIai što ukazuje da posle terapije nema povećanja količine proenzima ali da je povećana aktivacija TAFI. Vrednosti TAFI kod 38 bolesnika sa hemofilijom A koji su primali terapiju nisu bile statistički značajno različite pre terapije i posle terapije i iznosile su $10,66 \pm 2,03$ $\mu\text{g/ml}$ odnosno $10,75 \pm 2,64$ $\mu\text{g/ml}$. Nije pokazana statistički značajna korelacija za vrednosti TAFI i dozu koncentrata FVIII ($r=-0,11$) kao ni za nivo FVIII:C ($r=0,11$) i UHP ($r=0,07$). Vrednosti TAFIa/TAFIai posle terapije su iznosile $14,85 \pm 3,44$ ng/ml i bile su statistički značajno veće nego vrednosti pre terapije koje su iznosile $13,06 \pm 3,55$ ng/ml . Porast aktivacije TAFI posle terapije ne zavisi od doze FVIII i nema statistički značajne korelacije

za vrednosti TAFIa/TAFIai i dozu FVIII ($r=-0,15$). Međutim, utvrđena je statistički značaja korelacija TAFIa/TAFIai sa nivoom FVIII:C ($r=0,19$) odnosno vrednostima UHP ($r=0,20$).

S obzirom da nivo TAFI zavisi od sinteze u jetri nema povećanja TAFI neposredno posle terapije jer je za sintezu u jetri potrebno duže vreme (96). Aktivacija TAFI, koja je bila povećana pre terapije, dalje se povećava posle terapije. Moguće je da je u osnovi povećane aktivacije TAFI oštećenje tkiva na mestu krvarenja i ekspresija TF što omogućava povećano stvaranje trombina unutar koaguluma na mestu povrede. Ekspresija TF na mestu povrede i povećanje nivoa FVIII:C usled primene terapije obezbeđuju uslove za povećano stvaranje trombina unutar koaguluma u fazi propagacije što je neophodno za efikasnu aktivaciju TAFI (34). Sinteza velikih količina trombina dovodi do pojačane aktivacije TAFI koji efikasno inhibira fibrinolizu što se manifestuje normalizacijom vrednosti VLK posle terapije i tako TAFI utiče na efikasnost terapijskog odgovora.

Iako povećanje aktivacije TAFI posle terapije doprinosi normalizaciji ukupne fibrinolize i efikasnosti terapijskog odgovora kod bolesnika sa hemofilijom A vrednosti TAFI i TAFIa/TAFIai ne mogu koristiti kao prediktori terapijskog odgovora. To je pokazano primenom multiple regresije gde je utvrđeno da ne postoji statistički značajna korelacija ovih parametara sa FVIII:C i UHP posle terapije.

Rezultati ispitivanja FVIII:C, TAFI i TAFIa/TAFIai kod naših bolesnika koji su primili terapiju posle krvarenja u zglob su upoređeni sa rezultatima ispitivanja kod bolesnika koji su terapiju primali profilaktički (96). Nivo FVIII:C je bio veći u grupi bolesnika na profilaksi i pre i posle primene koncentrata FVIII. Pre terapije kod svih bolesnika koji su lečeni za zaustavljanje krvarenja FVIII:C je bio <1 IJ/dl, dok su kod bolesnika na profilaksi vrednosti FVIII:C iznosile 4 ± 5 IJ/dL. Vrednosti FVIII:C posle terapije su iznosile 25 ± 12 IJ/dL odnosno 59 ± 29 IJ/dl. Vrednosti proenzima TAFI su bile slične u obe grupe bolesnika, ali su zapažene niže vrednosti TAFIa/TAFIai odnosno niži stepen aktivacije TAFI kod bolesnika na profilaksi, kako pre tako i posle terapije.

Za razliku od grupe bolesnika koji su primali terapiju za zaustavljanje krvarenja, kod kojih je pre terapije bila prisutna ubrzana fibrinoliza, kod bolesnika na profilaksi fibrinoliza pre terapije nije bila ubrzana. To je rezultat prisustva niskih koncentracija FVIII:C u profilaktičkoj grupi i stvaranja dovoljnih količina trombina da se održi normalna

fibrinoliza. Ta mala količina trombina dovodi do aktivacije TAFI, ali su vrednosti TAFIa/TAFIai znatno niže u odnosu na grupu bolesnika lečenih za zaustavljanje krvarenja. Posle terapije ne dolazi do povećanja aktivacije TAFI kod grupe bolesnika na profilaksi što bi se moglo objasniti odsustvom krvarenja i izostankom ekspresije tkivnog faktora na mestu povrede. Verovatno da porast FVIII posle terapije u odsustvu povrede nije dovoljan da dovede do efikasne aktivacije TAFI, jer izostaje veliki porast nivoa trombina unutar koaguluma u fazi propagacije (38).

Rezultati ispitivanja uticaja TAFI na kliničku težinu hemofilije A su kontradiktorni što je rezultat različitog koncepta studija, korišćenja različitih testova za procenu TAFI i ispitivanja na malom broju bolesnika. Neophodna su dalja ispitivanja za procenu mehanizma uticaja i definitivne uloge TAFI na terapijski odgovor kod bolesnika sa hemofilijom A. Studije na većem broju ispitanika uz primenu specifičnih testova za ispitivanje različitih formi molekula TAFI *in vivo* (TAFI, TAFIa, TAFIa/TAFIai i fragmenta od 44,5kD koji je rezultat delovanja plazmina) uz *ex vivo* merenje VLK mogu doprineti potpunijem razumevanju uloge TAFI u hemofiliji i drugim poremećajima hemostaze (96).

ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata koji su dobijeni u ovom radu doneti su sledeći zaključci:

1. Dokazana je statistički značajna korelacija vrednosti UHP i FVIII:C kod bolesnika sa hemofilijom A.
2. Poređenjem rezultata ispitivanja UHP kod bolesnika sa teškom, umerenom i blagom hemofilijom A klasifikovanih na osnovu nivoa FVIII:C pokazano je da se test UHP može koristiti za procenu stepena težine hemofilije A.
3. Test UHP omogućava razlikovanje klinički teškog i klinički blagog oblika hemofilije A. Utvrđeno je da bolesnici sa hemofilijom A i izraženom sklonošću ka krvarenju imaju značajno niže vrednosti UHP u odnosu na bolesnike sa klinički blagim oblikom bolesti.
4. Kod dela bolesnika sa hemofilijom A nivo FVIII:C nije optimalan parametar za procenu kliničke težine hemofilije A, a to važi i za vrednosti UHP. Test UHP pruža dodatne, klinički relevantne podatke za procenu težine krvarenja kod bolesnika sa hemofilijom A ali ne predstavlja zamenu za određivanje FVIII:C.
5. Dokazano je da terapija primenom koncentrata FVIII značajno povećava vrednost UHP kod bolesnika sa hemofilijom A. Istovremeno, utvrđena je korelacija vrednosti UHP i FVIII:C pre i posle terapije koncentratom FVIII. Međutim, kod nekih bolesnika individualni odgovor na terapiju se može bolje proceniti primenom UHP testa nego određivanjem FVIII:C. To ukazuje na potrebu primene UHP testa u praćenju terapijskog odgovora kod bolesnika sa hemofilijom A sa ciljem da se utvrdi optimalan terapijski pristup za svakog bolesnika.

6. Ispitivanjem je pokazano da nema značajne razlike učestalosti faktora trombofilije između grupe bolesnika sa hemofilijom A i kontrolne grupe.
7. Utvrđeno je da nema značajne razlike vrednosti UHP između grupa bolesnika sa i bez faktora trombofilije. Nivo FVIII:C je jedini nezavisan faktor koji utiče na vrednost UHP kod bolesnika sa hemofilijom A, dok za nivo ostalih faktora koagulacije i prisustvo faktora trombofilije nije dokazan uticaj na UHP.
8. Ne postoji značajna razlika u učestalosti faktora trombofilije između klinički teškog i klinički blagog oblika hemofilije A. Koncentracija FVIII je jedini nezavisan faktor koji utiče na težinu krvarenja dok za nivo ostalih faktora koagulacije i prisustvo faktora trombofilije nije dokazan uticaj.
9. Ispitivanjem proenzima TAFI dokazane su značajno veće vrednosti u grupi sa hemofilijom A u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, ispitivanjem kompleksa aktivne i inaktivne forme TAFIa/TAFIai, utvrđen je i pojačan stepen aktivacije TAFI kod bolesnika sa hemofilijom A.
10. Iako se ukupna fibrinoliza značajno razlikuje između klinički teškog i klinički blagog oblika hemofilije A, fibrinoliza zavisna od TAFI kao i nivo proenzima TAFI i stepen aktivacije TAFI ne utiču na sklonost i težinu krvarenja kod bolesnika sa hemofilijom A.
11. Ukupna fibrinoliza i fibrinoliza zavisna od TAFI su ubrzane kod bolesnika sa hemofilijom A u odnosu na kontrolnu grupu. Utvrđeno je da primena terapije koncentratom faktora VIII u hemofiliji A popravlja kako ukupnu ubranu fibrinolizu tako i ubranu fibrinolizu zavisnu od TAFI. Stepenn poboljšanja korelira sa nivoom FVIII:C i UHP. Ovo ukazuje da povećanje nivoa FVIII:C, koje dovodi do povećanog stvaranja trombina, rezultuje povećanom aktivacijom TAFI i korekcijom ubrzane fibrinolize uprkos činjenici da nivo proenzima TAFI nije promenjen posle terapije. Ovo poboljšanje fibrinolize ne zavisi od primenjene doze koncentrata FVIII.

12. Iako povećanje aktivacije TAFI posle terapije doprinosi normalizaciji ukupne fibrinolize i efikasnosti terapijskog odgovora kod bolesnika sa hemofilijom A vrednosti TAFI i TAFIa/TAFIai ne mogu koristiti kao prediktori terapijskog odgovora.

LITERATURA

1. Colman RW, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, Marder VJ. Overview of Hemostasis. In: Colman RW, Marder VJ, George NJ, Goldhaber SZ, editors. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 3-16.
2. Verhamme P, Hoylaerts MF. The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clin Belg*. 2006; 61(5):213-9.
3. Weiss HJ, Turitto VT. Prostacyclin (prostaglandin I₂, PGI₂) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood*. 1979; 53(2):244-50.
4. Bouwens EAM, Staventier F, Mosnier LO. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathways. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(Suppl 1):242-53.
5. Huntington JA. Thrombin inhibition by serpins. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(Suppl 1):242-53.
6. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *Sci World J (Internet)*. 2014 Mar 3 (16pp); Available from <http://dx.doi.org/10.1155/2014/781857>
7. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(3):403.
8. Offermanns S. Activation of platelet functions through G protein-coupled receptors. *Circ Res*. 2006; 8;99(12):1293-304.
9. Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:1152-1160.
10. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*. 2007; 15; 109(12):5087-95.
11. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*. 2002; 88:186-93.
12. Beck EA. The chemistry of blood coagulation: a summary by Paul Morawitz (1905). *Thromb Haemost*. 1977; 37(3):376-9.
13. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*. 1964; 145(3638):1310-2.
14. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*. 1964; 202:498-9.
15. Douglas S. Historical Review: Coagulation history, Oxford 1951-53. *Br J Haematol*. 1999; 107:22-32.

16. Kitchen S, Makris M. Laboratory test of hemostasis. In: Key N, Makris M, O'Shaughnessy D, Lillicrap D, editors. Practical hemostasis and thrombosis. 2nd ed. Wiley-Blackwell; 2009. p. 7-16.
17. Rapaport SI, Rao LV. The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thromb Haemost.* 1995; 74(1):7-17.
18. Bough RJ, Broze GJ, Krishnaswamy S. Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem.* 1998; 273(8):4378–86.
19. Oliver J, Monroe D, Roberts H, Hoffman M. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:170-177.
20. Roberts HR, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY, Hoffman M. Newer concepts of blood coagulation. *Haemophilia.* 1998; 4:331-4.
21. Hoffman M, Monroe DM, 3. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 2001; 85:958–965.
22. Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. *Blood.* 1995; 86:1794-1801.
23. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost.* 2003; 1:1504-14.
24. Hoffman MM, Monroe DM. Rethinking the coagulation cascade. *Curr Hematol Rep.* 2005; 4(5):391-6.
25. Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood.* 2002; 100(1):148-52.
26. Bouma BN, von dem Borne PA, Meijers JCM. Factor XI and Protection of the Fibrin Clot against Lysis - a Role for the Intrinsic Pathway of Coagulation in Fibrinolysis. *Thromb Haemost.* 1998; 80(1):24-7.
27. Shah K, Bayoumi R, Banerjee Y. Protein anticoagulants targeting factor VIIa-tissue factor complex: a comprehensive review. *Hematology.* 2013; 18(1):1-7.
28. Baklaja R. Hemostaza. Koagulacija krvi i fibrinoliza. U: Baklaja R, Elezović I, Miljić P, Miković D, Lučić AM. Laboratorijska dijagnostika poremećaja hemostaze. Beograd: Interlab; 2008. str.7-20.
29. Elezović I. Fibrinoliza i fibrinogenoliza u akutnoj leukemiji. Doktorska teza Medicinski Fakultet u Beogradu, 1993.
30. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 2005; 129(3):307-21.
31. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost.* 2001; 86:324–333.

32. Bajzart L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or Plasma Procarboxypeptidase B, Couples the Coagulation and Fibrinolytic Cascades through the Thrombin-Thrombomodulin Complex. *J Biol Chem.* 1996; 271(28):16603-8.
33. Colucci M, Semeraro N. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: at the nexus of fibrinolysis and inflammation. *Thromb Res.* 2012; 129(3):314-9.
34. Von dem Borne P, Meijers J, Bouma B. Feedback activation of factor XI by thrombin in plasma results in additional format of thrombin that protects fibrin clots from fibrinolysis. *Blood.* 1995; 86,3035–42.
35. Marx PF, Dawson PE, Bouma BN, Meijers JCM. Plasmin mediated activation and inactivation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor. *Biochemistry.* 2002; 41:6688–96.
36. Leurs J, Nerme V, Sim Y, Hendriks D. Carboxypeptidase U (TAFIa) prevents lysis from proceeding into the propagation phase through a threshold-dependent mechanism. *J Thromb Haemost.* 2004; 2:416-23.
37. Broze GJ, Broze JR, Higuchi DA. Coagulation Dependent Inhibition of Fibrinolysis: Role of carboxypeptidase U and the Premature Lysis of Clots from Hemophilic Plasma. *Blood.* 1996; 88(19):3815-23.
38. Mosnier LO, Lisman T, van den Berg HM, Nieuwenhuis KH, Meijers JC, Bouma BN. The defective down regulation of fibrinolysis in haemophilia A can be restored by increasing the TAFI plasma concentration. *Thromb Haemost.* 2001; 86:1035-9.
39. Kessler CM, Mariani G. Clinical Manifestations and Therapy of the Hemophilias. In: Colman RW, Marder VJ, George NJ, Goldhaber SZ, editors. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 887-904.
40. Mannucci PM, Tuddenham EGD. The hemophilias – from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med.* 2001; 344:1773-9.
41. Thompson AR. Structure and function of the factor VIII gene and protein. *Semin Thromb Hemost.* 2003; 29(1):11-22.
42. Yee A, Kretz CA. Von Willebrand factor: form for function. *Semin Thromb Hemost.* 2014; 40(1):17-27.
43. Peyvandi F, Kunicki T, Lillicrap D. Genetic sequence analysis of inherited bleeding diseases. *Blood.* 2013; 122(20): 3423-31.
44. Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet.* 2003; 361:1801–1809.
45. Peake JR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, Briet E, Chan V, Ginter EK, et al. Report of a joint WHO/WHF meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1993; 4:313-44.

46. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. *Am J Pathol.* 1989; 134:1087–1097.
47. Dargaud Y, Béguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet JC, et al. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost.* 2005; 93:475-80.
48. Rodriguez-Merchan, CE. Musculoskeletal Complications of Hemophilia. *HSS Journal.* 2010; 6:37-42.
49. Stieltjes N, Calvez T, Demiguel V, Torchet MF, Briquel ME, Fressinaud E, et al. Intracranial haemorrhages in French haemophilia patients (1991-2001): clinical presentation, management and prognosis factors for death. *Haemophilia.* 2005; 11:452-458.
50. White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, on behalf of the Factor VIII and Factor IX Subcommittee. Definitions in Hemophilia. Recommendation of the Scientific Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 2001; 85:560.
51. Aledort LM, Haschmeyer RH, Pettersson H. A longitudinal study of orthopaedic outcome for severe factor-VIII-deficient haemophiliacs. The Orthopaedic Outcome Study Group. *J Intern Med.* 1994; 236:391-9.
52. Molho P, Rolland N, Lebrun T, Dirat G, Courpied JP, Croughs T, et al. Epidemiological survey of the orthopaedic status of severe haemophilia A and B patients in France. *Haemophilia* 2000; 6: 23-32.
53. den Uijl IEM, Fischer K, Van der Bom JG, Grobbee DE, Rosendaal FR, Plug I. Clinical outcome of moderate haemophilia compared with severe and mild haemophilia. *Haemophilia.* 2009; 15:83-90.
54. Trossaërt M, Regnault V, Sigaud M, Boisseau P, Fressinaud E, Lecompte T. Mild hemophilia A with FVIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype. *J Thromb Haemost.* 2008; 6:486-93.
55. Pavlova A, Oldenburg J. Defining severity of haemophilia: More than factor levels. *Semin Thromb Hemost.* 2013; 39(7):702-10.
56. Santoagostino E, Mancuso ME, Tripodi A, Chanzarangkul V, Clerici M, Garagiola I, et al. Severe haemophilia with mild bleeding phenotype: molecular characterization and global coagulation profile. *J Thromb Haemost.* 2010; 8:737-43.
57. Van Dijk K, Fischer K, Van der Bom JG, Grobbee DE, Van Swn HM. Variability in clinical phenotype of severe haemophilia: the first joint bleed. *Haemophilia.* 2005; 11:438-43.
58. Verbruggen B, Meijer P, Novakova I, Van Heerde W. Diagnosis of FVIII deficiency. *Haemophilia.* 2008; 14(Suppl 3):76-82.

59. Verbruggen B, van Heerde WL, Laros-van Gorkom BA. Improvements in factor VIII inhibitor detection: from Bethesda to Nijmegen. *Semin Thromb Hemost.* 2009; 35:752–9.
60. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al; Treatment Guidelines Working Group on Behalf of The World Federation Of Hemophilia. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia.* 2013; 19(1):e1-47.
61. Berntrop E, Björkman S. The pharmacokinetics of clotting factor therapy. *Haemophilia.* 2003; 9:353–359.
62. Keeling D, Tait C, Makris M. Guideline on the selection and use of therapeutic products to treat haemophilia and other hereditary bleeding disorders. A United Kingdom Haemophilia Center Doctors' Organisation (UKHCDO) Guideline Approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Haemophilia.* 2008; 14:671-684.
63. Elezović I, Janić D, Miljić P, Mičić D. Vodič za lečenje hemofilije. Preporuka Srpske lekarske grupe za hemofiliju. Beograd: Srpska lekarska grupa za hemofiliju; 2011.
64. Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, Riske B, Hacker MR, Kilcoyne R, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med.* 2007; 357:535–44.
65. Richards M, Williams M, Chalmers E, Liesner R, Collins P, Vidler V, et al. A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology: guideline on the use of prophylactic factor VIII concentrate in children and adults with severe haemophilia A. *Br J Haematol.* 2010; 149:498-507.
66. Collins PW. Personalized prophylaxis. *Haemophilia.* 2012; 18:131-135.
67. Fischer K, Astermark J, van der Bom JG, Ljung R, Berntorp E, Grobbee DE, et al. Prophylactic treatment for severe haemophilia: comparison of an intermediate dose to a high-dose regimen. *Haemophilia.* 2002; 8(6):753-760.
68. Feldman BN, Pai M, Rivard GE, Israels S, Poon MC, Demers C, et al. Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada Prophylaxis Study Group. Tailored prophylaxis in severe hemophilia A: interim results from the first 5 years of the Canadian Hemophilia Primary Prophylaxis Study. *J Thromb Haemost.* 2006; 4:1228-36.
69. Antovic JP, Mikovic D, Elezovic I, Holmstrom M, Wilkens M, Elfvinge P, et al. Two global haemostatic assays as additional tools to monitor treatment in cases of haemophilia A. *Thromb Haemost.* 2012; 108(1):21-31.
70. Young F, Sørensen B, Dargaud Y, Negrier C, Brummel-Ziedins K, Key NS. Thrombin generation and whole blood viscoelastic assays in the management of hemophilia: current state of art and future perspectives. *Blood.* 2013; 131:1944-50.

71. Mannucci M. Plasma-derived versus recombinant factor VIII concentrates for the treatment of haemophilia A: plasma-derived is better. *Blood Transf.* 2010; 8:288-29.
72. Morfini M. Clinical use of FVIII and FIX concentrates. *Blood Transf.* 2013; 11(Suppl 4):s55-63.
73. Astermark J, Santagostino E, Keith Hoots W. Clinical issues in inhibitors. *Haemophilia.* 2010; 16 (Suppl 5):54-60.
74. Elezovic I. Treatment of patients with haemophilia and inhibitors. *Acta Clinica.* 2011:119-128.
75. Elezovic I. Etiopathogenesis of inhibitors in haemophilia. *Acta Clinica.* 2011: 94-108.
76. Astermark J. Prevention and prediction of inhibitor risk. *Haemophilia.* 2012; 18:38-42.
77. Mannucci PM, Franchini M. Present and future challenges in the treatment of haemophilia: a clinician's perspective. *Blood Transf.* 2013; 11(Suppl 4):s77-81.
78. Carcao M. Changing paradigm of prophylaxis with longer acting factor concentrates. *Haemophilia.* 2014; 20 (Suppl 4):99-105.
79. High KH, Nathwani A, Spencer T, Lillicrap D. Current status of haemophilia gene therapy. *Haemophilia.* 2014; 20 (Suppl 4):43-9.
80. Shapiro AD, Korth-Bradley J, Poon MC. Use of pharmacokinetics in the coagulation factor treatment of patients with haemophilia. *Haemophilia.* 2005; 11:571-582.
81. Nair SC, Dargaud Y, Chitlurs M, Srivastava A. Tests of global haemostasis and their application in bleeding disorders. *Haemophilia.* 2010; 16(Suppl 5):85-92.
82. Khan S, Dickerman JD. Hereditary Thrombophilia. *Thromb J.* 2006; 4 (15):1-17.
83. Nowak-Göttl U, Escuriola C, Kurnik K, Schobess R, Horneff S, Kosch A, et al. Haemophilia and thrombophilia. What do we learn about combined inheritance of both genetic variations? *Hamostaseologie.* 2003; 23:36-40.
84. Kitchen S, Preston FE. Assay of factor VIII and other clotting factors. In: Kitchen S, Olson JD, Preston FE, editors. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis.* 2nd ed. Willey-Blackwell; 2009. p. 81-89.
85. Chen D, Tange JI, Meyers BJ, Pruthi RK, Nichols WL, Heit JA. Validation of an automated latex particle-enhanced immunoturbidimetric von Willebrand factor activity assay. *J Thromb Haemost.* 2011; 9(10):1993-2002.
86. Oldenburg J, Pavlova A. Discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assay results can lead to misdiagnosis of haemophilia A phenotype. *Hamostaseologie.* 2010; 30(4):207-211.
87. Elezović I. Urodene i stečene trombofilije. *Bilt Transf.* 1999; 46 (Supl. 45):16-25.

88. Favaloro EJ, McDonald D, Lippi G. Laboratory investigation of thrombophilia: the good, the bad, and the ugly. *Semin Thromb Hemost.* 2009; 35(7):695-710.
89. Walker ID, Jennings I. Dilemmas in heritable thrombophilia testing. In Kitchen S, Olson JD, Preston FE, editors. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis.* 2nd ed. Willey-Blackwell; 2009. p. 147-59.
90. Boffa MB, Koschinsky ML. Curiouser and curiouser: recent advances in measurement of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and in understanding its molecular genetics, gene regulation, and biological roles. *Clin Biochem.* 2007; 40(7):431-42.
91. Ceresa E, Brouwers E, Peeters M, Jern C, Declerck PJ, Gils A. Development of ELISAs measuring the extent of TAFI activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(2):423-8.
92. Cost H, Grimaux M, Grosley M, Woodhams B. A new TAFI antigen assay independent of polymorphism 325Thr/Ile and 147Ala/Thr. In: *International Proceedings - 18th International Congress on Thrombosis*; 2004. p. 91–95 (Medimond S.r.l.). ISBN 88-7587-057-8.
93. Tregouet D, Schnabel R, Alessi M, Godefroy T, Declerck P, Nicaud V, et al. Activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor levels are associated with the risk of cardiovascular death in patients with coronary artery disease: the AtheroGene study. *J Thrombs Haemost.* 2008; 7:49–57.
94. Antovic J, Schulman S, Elelde A, Bloombäck M. Total thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) antigen and pro-TAFI in patients with haemophilia A. *Hemophilia.* 2001; 7:557-560.
95. Antovic JP, Schulman S, An SS, Greenfield RS, Blombäck M. Does an enzyme other than thrombin contribute to unexpected changes in the levels of the different forms of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in patients with hemophilia A, hemophilia B and von Willebrand disease? *Scand J Clin Lab Invest.* 2004; 64:745-52.
96. Mikovic D, Woodhams BJ, Holmstrom M, Elezovic I, Antovic A, Mobarrez F, et al. On-demand but not prophylactic treatment with FVIII concentrate increase thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activation in severe haemophilia A patients. *Int J Lab Hem.* 2012; 34(1):35-40.
97. Dargaud Y, Sørensen B, Shima M, Hayward C, Srivastava A, Negrier C. Global haemostasis and point of care testing. *Haemophilia.* 2012; 18(Supl.4):81-88.
98. Othman M. Global Hemostasis: New Approaches to Patient Diagnosis and Treatment Monitoring. *Sem Thromb Hemost.* 2010; 36:695-7.
99. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Giesen PLA, Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability *Haematologica.* 2003; 88:547-54.

100. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost.* 2006; 96:553-61.
101. Wolberg AS. Thrombin generation assays: Understanding how the method influences the results. *Thromb Res.* 2007; 119:663-5.
102. Lewis J, Stephens E, Florou G, Macartney NJ, Hathaway IS, Knipping I, et al. Measurement of global haemostasis in severe haemophilia A following factor VIII infusion. *Br J Haematol.* 2007; 138:775-82.
103. van Veen JJ, Gatt A, Bowyer AE, Cooper C, Kitchen S, Makris M. Calibrated automated thrombin generation and modified thromboelastometry in haemophilia A. *Thromb Res.* 2009; 123:895-901.
104. MacDonald SG, Phil M, Luddington EJ. Critical Factors Contributing to the Thromboelastography Trace. *Sem Thromb Hemost.* 2010; 36(7):712-22.
105. Sankarankutty A, Nascimento B, Teodoro da Luz L, Rizoli S. TEG[®] and ROTEM[®] in trauma: similar test but different results? *World J Emerg Surg.* 2012; 7(Suppl 1):S3.
106. Sørensen B, Ingerslev J. Whole blood clot formation phenotypes in hemophilia A and rare coagulation disorders. Patterns of response to recombinant factor VIIa. *J Thromb Haemost.* 2003; 2:102-10.
107. Chitlur M, Warriar I, Rajpurkar M, Hollon W, Lianto L, Wiseman C, et al. Thromboelastography in children with coagulation factor deficiencies. *Br J Haematol.* 2008; 142:250-6.
108. Shima M, Matsumoto T, Fukuda K, Kubota Y, Tanaka I, Nishiya K, et al. The utility of activated partial thromboplastin time (aPTT) clot waveform analysis in the investigation of hemophilia A. *Thromb Haemost.* 2002; 87:436-41.
109. Matsumoto T, Shima M, Takeyama M, Yoshida K, Tanaka I, Sakurai Y, et al. The measurement of low levels of factor VIII or factor IX in hemophilia A and hemophilia B plasma by clot waveform analysis and thrombin generation assay. *J Thromb Haemost.* 2006; 4:377-84.
110. He S, Bremme K, Blombäck M. A Laboratory Method for Determination of Overall Haemostatic Potential in Plasma. I. Method Design and Preliminary Results. *Thromb Res.* 1999; 96:145-56.
111. Antovic A. The Overall Hemostasis Potential: A Laboratory Tool for the Investigation of Global Hemostasis. *Sem Thromb Haemost.* 2010; 36(7):772-8.
112. Antovic A, Blombäck M, Sten-Linder M, Petrini P, Holstrom M, He S. Identifying hypocoagulable states with a modified global assay of overall haemostasis potential in plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005; 16:585-96.
113. Antovic JP, Antovic A, He S, Tengrohn L, Blombäck M. Overall haemostatic potential can be used for estimation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor-dependent

- fibrinolysis *in vivo* and for possible follow-up of recombinant factor VIIa treatment in patients with inhibitors to factor VIII. *Haemophilia*. 2002; 8:781-6.
114. Antovic A, Blombäck M, Bremme K, Van Rooijen M, He S. Increased hemostasis potential persists in women with previous thromboembolism with or without APC resistance. *J Thromb Haemost*. 2003; 1:2531-5.
 115. Al Hawaj MA, Martin EJ, Venitz J, Barret JC, Kuhn JG, Nolte ME, et al. Monitoring rFVIII prophylaxis dosing using global haemostasis assay. *Haemophilia*. 2013; 19:409-414.
 116. Beltran-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR, Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. *Haemophilia*. 2005; 11:326-34.
 117. Bassus S, Wegert W, Krause M, Escuriola-Ettinghausen C, Siegemund A, Petros S, et al. Platelet-dependent coagulation assays for factor VIII efficacy measurements after substitution therapy in patients with haemophilia A. *Platelets*. 2006; 17:378–84.
 118. Franchini M. Haemostasis and Aging. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006; 50:144–151.
 119. Hoffman M, Dargaud Y. Mechanisms and monitoring of bypassing agent therapy. *J Thromb Haemost*. 2012; 10:1478-85.
 120. Shapiro AD. Long-lasting recombinant factor VIII proteins for hemophilia A. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013; 2013:37-43.
 121. Mackie I, Cooper P, Lawrie A, Kitchen S, Gray E, Laffan M; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol*. 2013; 35(1):1-13.
 122. Kitchen S, McCraw A, Echenagucia M. Diagnosis of Hemophilia and Other Bleeding Disorders: A Laboratory Manual. 2nd ed. Montreal: World Federation of Hemophilia; 2010. p. 65-69.
 123. Rick ME. Von Willebrand Disease. In: Kitchen S, Alving B, Kessler C, editors. *Consultative Hemostasis and Thrombosis*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 97-109.
 124. Seligsohn U, Bertina RM, Zivelin A, Khanduri U, Chandy M, Srivastava A et al. Diagnosis of Thrombotic Disorders: A Laboratory Manual. 1st ed. International Society on Thrombosis and Haemostasis & Christian Medical College, Vellore, India; 2002.
 125. Miković D. Rezistencija na aktivirani protein C. *Bilt Transf*. 1999; 46(Supl. 45):32-36.
 126. Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol*. 2012; 157(1):47-58.
 127. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989. pp. 173-8.

128. Brummel-Ziedins KE, Pouliot RL, Mann KG. Thrombin generation: phenotypic quantification. *J Thromb Haemost* 2003; 2: 281-8.
129. Mann KG, Brummel-Ziedins K, Undas A, Butenas S. Does the genotype predict the phenotype? Evaluations of the hemostatic proteome. *J Thromb Haemost*. 2004; 2:1727-34.
130. Brummel-Ziedins KE, Whelihan MF, Gissel M, Mann KG, Rivard GE. Thrombin generation and bleeding in haemophilia A. *Haemophilia*. 2009; 15:1118-25.
131. Shetty S, Vora S, Kulkarni B, Mota L, Vijapurkar M, Quadros L, et al. Contribution of natural anticoagulant and fibrinolytic factors in modulating the clinical severity of haemophilia patients. *Br J Haematol*. 2007; 138:541-4.
132. Siegmund T, Petros S, Siegmund A, Scholz U, Engelmann L. Thrombin generation in severe haemophilia A and B: the endogenous thrombin potential in platelet-rich-plasma. *Thromb Haemost*. 2003; 90:781-6.
133. Vila V, Aznar JA, Moret A, Marco A, Navarro S, Vila C, et al. Assessment of the thrombin generation assay in haemophilia: Comparative study between fresh and frozen platelet-rich plasma. *Haemophilia*. 2013, 19(2):318-321.
134. Fischer K, van der Bom JG, Prejs R, Roosendaal G, Prejs R, de Kleijn P, et al. The effects of postponing prophylactic treatment on long-term outcome in patients with severe haemophilia. *Blood*. 2002; 99:2337-41.
135. Vyas S, Enockson C, Hernandez L, Valentino LA. Towards personalizing haemophilia care: using the Haemophilia Severity Score to assess 178 patients in a single institution. *Haemophilia*. 2013; 19(Suppl 4):1-10.
136. Salvagno GL, Astermark J, Lippi G, Ekman M, Franchini M, Guidi GC, Berntorp E. Thrombin generation assay. a useful routine check-up tool in the management of patients with haemophilia? *Haemophilia*. 2009; 15:290-6.
137. Andresen MS, Iversen N, Abildgaard U. Overall haemostasis potential assays performed in thrombophilic plasma: the effect of pre activated protein C and antithrombin. *Thromb Res*. 2002; 108(5-6):323-328.
138. Goldenberg NA, Hathaway WE, Jacobson L, Manco-Johnson MJ. A new global assay of coagulation and fibrinolysis. *Thromb Res*. 2005; 116(4):345-356.
139. Dargaud Y, Negrier C. Thrombin generation testing in haemophilia comprehensive care centres. *Haemophilia*. 2010; 16:223-30.
140. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Lecompte T, Siegmund T, Baglin T, et al. Standardisation of thrombin generation test – which reference plasma for TGT? An international multicentre study. *Thromb Res*. 2010; 125:353-6.
141. Chitlur M, Lusher J. Standardization of thromboelastography: values and Challenges. *Semin Thromb Hemost*. 2010; 36(7):707-711.

142. Shima M, Thachil J, Nair SC, Srivastava A. Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications. *J Thromb Haemost.* 2013; 11:1417–20.
143. Mikovic D, Rakicevic Lj, Kovac M, Radojkovic D. Prevalence of Factor V Leiden Mutation in Yugoslav Thrombophilic Patients and Its Relationship to the Laboratory Diagnosis of APC Resistance. *Thromb Haemos.* 2000; 84(4):723-4.
144. Djordjevic V, Rakicevic Lj, Mikovic D, Kovac M, Miljic P, Radojkovic D, et al. Prevalence of Factor V Leiden, Factor V Cambridge, Factor II G20210A and Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Mutations in Healthy and Thrombophilic Serbian Populations. *Acta Haematol.* 2004; 112:227–229.
145. Lee DH, Walker RI, Teitel J, Poon C, Ritchie B, Akabutu J, et al. Effect of the Factor V Leiden Mutation on the Clinical Expression of Severe Hemophilia A. *Thromb Haemost.* 2000; 83:387-91.
146. Nichols WC, Amano K, Cacheris PM, Figueiredo MS, Michaelides K, Schwaab R, et al. D. Moderation of Hemophilia A Phenotype by the Factor V R506Q Mutation. *Blood.* 1996; 88(4):1183-7.
147. Tizziano EF, Soria JM, Coll I, Guzman B, Cornet M, Altisent C, et al. The prothrombin 20210A allele influences clinical manifestations of hemophilia A in patients with intron 22 inversion and without inhibitors. *Haematologica.* 2002; 87: 279-85.
148. van't Veer C, Golden NJ, Kalafatis M, Simioni P, Bertina RM, Mann KG. An In Vitro Analysis of the Combination of Hemophilia A and Factor V^{LEIDEN}. *Blood.* 1997; 90(8):3067-72.
149. Siegemund A, Petros S, Siegemund T, Scholz U, Seyfarth HJ, Engelmann L. The endogenous thrombin potential and high levels of coagulation factor VIII, factor IX and factor XI. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2004; 15(3):241-4.
150. Brummel-Ziedins. Models for thrombin generation and risk of disease. *J Thromb Haemost.* 2013; 11(Suppl 1):212-23.
151. López-Jimenez JJ, Beltran-Miranda CP, Mantilla-Capacho JM, Esparza-Flores MA, Lopez Gonzales LC, Jaloma-Cruz AR. Clinical variability of haemophilia A and B in Mexican families by factor V Leiden G1692A, prothrombin G20210A and MTHFR C677T/A1298C. *Haemophilia.* 2009; 15:1327-53.
152. Kurnik K, Kreuz W, Horneff S, Düring C, Schobess R, Bidlingmaier C, et al. Effects of the factor V G1691A mutation and the factor II G20210A variant on the clinical expression of severe hemophilia A in children – results of a multicenter study. *Haematologica.* 2007; 92:982-5.
153. Arbini AA, Mannucci PM, Bauer KA. Low prevalence of the factor V Leiden mutation among “severe” hemophiliacs with a “milder” bleeding diathesis. *Thromb Haemost.* 1995; 74(5):1255-8.

154. Araújo F, Fraga M, Henriques I, Monteiro F, Meireles E, Perreira C, et al. The clinical phenotype modulation of haemophilia by prothrombotic gene mutations. *Haemophilia*. 2003; 9:235-5.
155. Di Perna C, Franchini M, Riccardi F, Rivolta GF, Angeri F, Tagliaferri A. Association between haemophilia and inherited thrombophilia: a single centre survey. *Haemophilia*. 2011; 17(1):161-2.
156. Siegemund A, Petros S, Siegemund T, Scholz U, Seyfarth HJ, Engelmann L. The endogenous thrombin potential and high levels of coagulation factor VIII, factor IX and factor XI. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004; 15(3):241-4.
157. Van Dijk K, Van Der Bom JG, Fischer K, De Groot PG, Van Der Berg M. Phenotype of severe hemophilia A and plasma levels of risk factors for thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2007; 5:1062-4.
158. Grünewald M, Siegmund A, Grünewald A, Konegen A, Kokschi M, Griesshammer M. Paradoxical hyperfibrinolysis is associated with a more intensely haemorrhagic phenotype in severe congenital haemophilia. *Haemophilia*. 2002; 8:768-75.
159. Antovic JP, Antovic A. Does recombinant factor VIIa, apart from overall hemostasis, regulate TAFI dependent fibrinolysis? *In vitro* analysis using overall hemostasis potential (OHP) assay. *Thromb Haemost*. 2003; 90:620-7.
160. Foley JH, Nesheim ME. Soluble thrombomodulin partially corrects the premature lysis defect in FVIII-deficient plasma by stimulating the activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost*. 2009; 7:453-9.
161. Guo X, Okada N, Okada H. CRP Total (TAFI and activated TAFI) levels in plasma/serum of haemophiliacs. *Microbiol Immunol*. 2000; 33:77-8.
162. Myles T, Nishimura T, Yun TH, Nagashima M, Morser J, Patterson AJ, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, a potential regulator of vascular inflammation. *J Biol Chem*. 2003; 278:51059-51067.
163. Leurs J, Wissing BM, Nerme V, Schatteman K, Björquist P P, Hendriks D. Different mechanism contribute to the biphasic pattern of carboxypeptidase U (TAFIa) generation during in vitro clot lysis in human plasma. *Thromb Haemost*. 2003; 89:264-71.
164. Foley JH, Kim PY, Mutch NJ, Gils A. Insights into thrombin activatable fibrinolysis inhibitor function and regulation. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(Suppl 1):212-23.
165. Foley JH, Nesheim ME, Rivard GE, Brummel-Ziedins KE. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activation and bleeding in haemophilia A. *Haemophilia*. 2012; 18:e316-22.

BIOGRAFIJA

Dr Danijela Miković je rođena 24. avgusta 1960. godine u Pljevljima. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Beogradu. Na Medicinskom fakultetu u Beogradu diplomirala je 12. juna 1986. godine sa prosečnom ocenom 9,75.

Posle obavljenog obaveznog lekarskog staža i položenog državnog ispita 1988. godine zaposlila se u Institutu za transfuziju krvi Srbije. Do 1991. radila je na na Odeljenju za prikupljanje i konzervaciju krvi, a od 1992. godine radi na Odeljenju za ispitivanje poremećaja hemostaze. Specijalistički ispit iz Transfuziologije položila je sa odličnim uspehom 18. decembra 1995. godine.

Magistarsku tezu pod naslovom „Značaj primene koagulacijskih testova u prenatalnoj dijagnozi hemofilije” odbranila je 5. jula 1999. godine, mentor: prof. dr Emilija Stojimirović.

Bila je nosilac dva programa stručne saradnje u okviru Svetske federacije za hemofiliju, sa Centrom za hemofiliju Univerzitetske bolnice Karoiska iz Stokholma 2003-2004. godine i Centrom za hemofiliju Univerzitetske bolnice Mc Master iz Hamiltona 2005-2008. godine. Kao nosilac stipendije Svetske federacije za hemofiliju za 2005. godinu provela je dva meseca na studijskom boravku u Centru za hemofiliju i trombozu „Angelo Bianchi Bonomi“ u Milanu.

Predsednik je Udruženja za hemostazu i trombozu Srbije, generalni sekretar Dunavske lige za trombozu i hemostazu i član Podkomiteta za nauku i standardizaciju Internacionalnog udruženja za trombozu i hemostazu za oblast urođenih koagulopatija.

Autor je više stručnih radova objavljenih u referentnim stranim i domaćim časopisima i tri poglavlja u knjigama. Učestvovala je kao predavač po pozivu na brojnim domaćim i međunarodnim skupovima.

Veće naučnih oblasti medicinskih nauka na sednici održanoj 26. juna 2008. godine odobrilo je izradu doktorske disertacije dr Danijeli Miković sa temom: „Korelacija ukupnog hemostatskog potencijala i fibrinolize zavisne od trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize sa težinom krvarenja i odgovorom na terapiju u hemofiliji A“, za mentora je određen prof.dr Ivo Elezović i za komentora doc. dr Jovan Antović.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Danijela Miković

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Korelacija ukupnog hemostatskog potencijala i fibrinolize zavisne od trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize sa težinom krvarenja i odgovorom na terapiju u hemofiliji A“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 18. 11. 2014.

Danijela Miković

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Danijela Miković

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada „Korelacija ukupnog hemostatskog potencijala i fibrinolize zavisne od trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize sa težinom krvarenja i odgovorom na terapiju u hemofiliji A“

Mentor Prof. dr Ivo Elezović

Potpisani Danijela Miković

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 18. 11. 2014.

Danijela Miković

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Korelacija ukupnog hemostatskog potencijala i fibrinolize zavisne od trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize sa težinom krvarenja i odgovorom na terapiju u hemofiliji A“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 18. 11. 2014.

