

Nove oblike zdravljenja hemofilije in laboratorijsko preiskovanje

New treatments in haemophilia and laboratory testing

Alenka Trampuš Bakija

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

Avtor za korespondenco:

Doc. dr. Alenka Trampuš Bakija, spec. med. biokem.

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Bohoričeva 20, 1000 Ljubljana
e-pošta: alenka.trampus@kclj.si

POVZETEK

Možnosti zdravljenja hemofilije so v zadnjih letih močno napredovale. Nove oblike zdravljenja s koncentraty s podaljšanim delovanjem in nefaktorsko zdravljenje omogočajo bolnikom drug način in/ali podaljšan interval med odmerki. Laboratorijsko spremljanje zdravljenja je za obravnavo bolnikov s hemofilijo ključno. Najpogosteje uporabljena metoda za ugotavljanje aktivnosti faktorjev VIII in IX je enostopenjska metoda z aktiviranim parcialnim tromboplastinskim časom. V specializiranih laboratorijih aktivnost faktorjev določajo tudi s kromogeno metodo. Izbor metode in vrste reagenta lahko močno vplivata na rezultat merjenja. Pomembne razlike (> 35 %) med metodama so opisane za modificirane koncentrate rekombinantnih faktorjev s podaljšano življenjsko dobo in pri genskem zdravljenju hemofilije. Preventivno zdravljenje z bispecifičnimi protitelesi zahteva uvedbo več dodatnih diagnostičnih metod pri bolnikih z inhibitorji in brez. Za laboratorijsko spremljanje zmanjšanja aktivnosti naravnih antikoagulantov še ni jasnih smernic. Laboratorij mora natančno vedeti, kakšno obliko zdravljenja bolnik prejema, saj le izbor ustrezne enostopenjske in/ali kromogene metode, ovrednotene za posamezno učinkovino, omogoča primerno prilagojeno zdravljenje hemofilije A ali B.

Ključne besede: hemofilija, nadomestno zdravljenje, nefaktorsko zdravljenje, laboratorij, enostopenjska metoda, kromogena metoda

ABSTRACT

The treatment options for haemophilia have developed considerably in recent years. New forms of therapies with extended half-life products and non-factor therapy allow patients a different route of administration and/or lower dosage frequency. Laboratory monitoring of treatment is crucial for the management of patients with haemophilia. The most commonly used assay for testing factor VIII and IX activity is the one-stage clotting activated partial thromboplastin time-based method. In specialized laboratories, factor activity is also determined using the chromogenic assay. The selection of method and the type of reagent can strongly influence the measurement results. Significant differences (>35%) between the two methods have been described for extended half-life modified recombinant factor concentrates and for gene therapy of haemophilia. Prophylactic treatment with bispecific antibodies requires the introduction of several additional methods in patients with or without inhibitors. »

There are still no clear guidelines for laboratory monitoring of the effects of natural anticoagulants inhibition on haemostasis. The laboratory needs to be informed of type and dosage of treatment the patient is receiving. Only the selection of the suitable one-step and/or chromogenic method evaluated for the individual agent will allow appropriately customized therapy for haemophilia A or B.

Keywords: haemophilia, replacement therapy, non-factor therapy, laboratory, one-stage method, chromogenic method

UVOD

Hemofilija je skupina redkih dednih bolezni, pri kateri je moteno strjevanje krvi. Pri tem je moten nastanek fibrinskega strdka zaradi pomanjkanja enega od faktorjev strjevanja. Najpogostejša je hemofilija A (HA), ki je recesivna bolezen, vezana na kromosom X. Nastane kot posledica pomanjkanja ali odsotnosti faktorja strjevanja krvi VIII (FVIII). V svetu je pojavnost HA okrog 1/5.000 moških. Manj pogosta (1/30.000 moških) je hemofilija B (HB), ki je tudi na X kromosom vezana recesivna bolezen, pri kateri imajo bolniki zmanjšano aktivnost faktorja IX (FIX). V Sloveniji je bilo leta 2023 v register vpisanih 206 bolnikov s HA in 25 bolnikov s HB (1). Pri vseh vrstah hemofilije gre za pomanjkanje, popolno odsotnost ali neaktivnost koagulacijskega faktorja, ki je posledica sprememb v genu za ta faktor. Učvrstitev strdka je zato pri hemofiliji počasnejša. Glede na aktivnost faktorja ločimo 3 oblike bolezni: težko (aktivnost faktorja < 1 %), srednje težko (aktivnost faktorja 1–5 %) in lahko (aktivnost faktorja 5–40 %) (2).

Bolniki s težko obliko HA in HB imajo pogoste spontane krvavitve, največkrat v sklepe in mišice, že pri običajnih fizioloških aktivnostih. Možne so tudi sluznične krvavitve, krvavitve iz nosu ob poškodbi ali prehladu, krvavitve iz prebavil in iz sečil ter redkeje v glavo. Spontane krvavitve se redko pojavljajo pri srednje težki obliki in zelo redko pri lahki obliki hemofilije. Pri vseh oblikah se pojavljajo krvavitve po posegih ali poškodbah. Težko in srednje težko obliko hemofilijo običajno opredelimo že v otroški dobi, lahko obliko hemofilije pogosto spoznamo šele ob operaciji ali poškodbi, ko je krvavitev daljša kot običajno in jo je treba zdraviti (3). Še do nedavnega sta bila preventivno zdravljenje in zdravljenje po potrebi omejena na aplikaci-

je rekombinantnih oblik FVIII/FIX, ki pa (še posebej pri težkih oblikah hemofilije) pri 20–30 % bolnikov povzročijo nastanek inhibitornih protiteles (4). Zdravljenje se pri teh bolnikih izredno zaplete in lahko predstavlja življenje ogrožajoče stanje.

Vloga laboratorija je za bolnike s hemofilijo ključna pri prepoznavi vrste in opredelitvi stopnje bolezni kot tudi pri spremljanju nadomestnega zdravljenja. Sodoben diagnostični pristop hemofilije vključuje tudi genetske analize. Te ob postavitvi diagnoze dopolnjujejo fenotipsko klasifikacijo (5). Trenutno je za hemofilijo A opisanih 4.435 sprememb v genu za F8, za hemofilijo B pa 1.525 sprememb v genu za F9 (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>, dostop november 2024). Prednosti genotipizacije hemofilije so: možnost prepoznave različic faktorja, ki poveča verjetnost za nastanek inhibitorjev, možnost predrojšvenega svetovanja pri ženskah ter prepoznavo variant, ki povzročajo neskladne rezultate pri merjenju z različnimi metodami določitve aktivnosti faktorjev.

V prispevku opisujemo laboratorijske metode za diagnostiko in spremljanje zdravljenja hemofilije in njihovo rabo ob razvoju novih oblik zdravljenja HA in HB.

LABORATORIJSKA OPREDELITEV HEMOFILIJE

Diagnostika bolezni večinoma poteka ob pojavu kliničnih znakov hemofilije. Ker so razlogi za krvavitve lahko številni, je pravilna raba laboratorijskih testov ob postavitvi diagnoze ključna. Testiranje se izvede stopenjsko, in sicer:

- s presejalnimi testi hemostaze, kot so aktivirani parcialni tromboplastinski čas (APTČ), protrombinski čas (PČ), diferencialno diagnostično lahko tudi zapiralni čas;
- z določitvami aktivnosti faktorjev strjevanja in po potrebi z drugim usmerjenim laboratorijskim preiskovanjem (npr. pretočna citometrija, genetska diagnostika).



Vzorec izbora za laboratorijsko testiranje hemostaze je kri, odvzeta z dodatkom Na-citrata. Iz krvi pripravimo plazmo, revno s trombociti (vzorec centrifugiramo 10 min pri 1700 g na sobni temperaturi), ki jo analiziramo najkasneje v 8 urah po odvzemu. Aktivnost FVIII izmerimo znotraj 4 ur po odvzemu. Ob odloženi analizi je vzorec stabilen 3 mesece pri $< -35^{\circ}\text{C}$ ali 6 mesecev pri $< -70^{\circ}\text{C}$. Hemolizirani vzorci in epruvete, ki so polnjene manj kot 90 %, za analizo niso primerni (5, 6).

Aktivirani parcialni tromboplastinski čas

APTČ je presejalna metoda, s katero merimo aktivnost faktorjev notranje in skupne poti koagulacije. Uporabna je pri odkrivanju HA in HB ter von Willebrandove bolezni. Odkriva tudi pomanjkanje FXI ter klinično nema pomanjkanja FXII, prekalikreina ali visokomolekularnega kininogena. Na podaljšanje APTČ lahko vpliva prisotnost zaviralcev koagulacije, kot so npr. lupusni antikoagulant. Metoda predstavlja osnovo za opredelitev aktivnosti posameznih faktorjev notranje poti, tako da se uporabi skupaj s plazmo brez posameznih faktorjev. Kjer ni na voljo drugih metod, je uporabna tudi za spremljanje zdravljenja z nefrakcioniranim heparinom.

Najpogostejše uporabljena metoda merjenja APTČ je koagulacijska metoda, kjer v vzorcu citratne plazme bolnika merimo čas do nastanka strdka po tem, ko mu dodamo kontaktni aktivator (silika, kaolin, elagična kislina) in fosfolipide. Po inkubaciji točno določen čas na 37°C se aktivirata FXI in FXII. Po dodatku kalcijevih ionov začnemo meriti čas do nastanka strdka.

Redkeje uporabljena je metoda APTČ s kromogenim substratom. Pri tej vzorcu dodamo kontaktni aktivator in fosfolipide in mešanico inkubiramo določen čas na 37°C . Po inkubaciji dodamo kalcijeve ione in kromogeni substrat, specifičen za trombin in spremljamo spremembo absorbance (6).

Rezultate podajamo v sekundah, lahko pa tudi kot razmerje bolnikovega APTČ proti srednji vrednosti APTČ zdravih oseb. Okvirne referenčne vrednosti so odvisne od kombinacije uporabljenega reagenta in analizatorja in so približno med 20 in 40 sekund. Različni reagenti so različno občutljivi na pomanjkanje faktorjev notranje in skupne poti koagulacije. Zaželeno je, da APTČ zazna le klinično pomembno pomanjkanje koagulacijskih faktorjev ($< 50\%$). Prav tako so reagenti različno občutljivi na pri-

sotnost zaviralcev koagulacije (npr. na lupusne antikoagulate) in na prisotnost heparina (5).

Pri težki in srednje težki hemofiliji je APTČ pomembno podaljšan. Pri lahki hemofiliji je lahko v referenčnem območju, zato normalen rezultat ne izključuje bolezni.

Merjenje aktivnosti koagulacijskih faktorjev

Preiskave določanja aktivnosti faktorjev izvajamo v sklopu stopenjske diagnostike, in sicer pri:

- ugotavljanju vzroka patološkega rezultata ene od presejalnih preiskav (PČ, APTČ ali trombinski čas);
- sumu na pridobljeno ali prirojeno pomanjkanje enega ali več koagulacijskih faktorjev;
- spremljanju nadomestnega zdravljenja s koncentratu koagulacijskih faktorjev.

Enostopenjska metoda

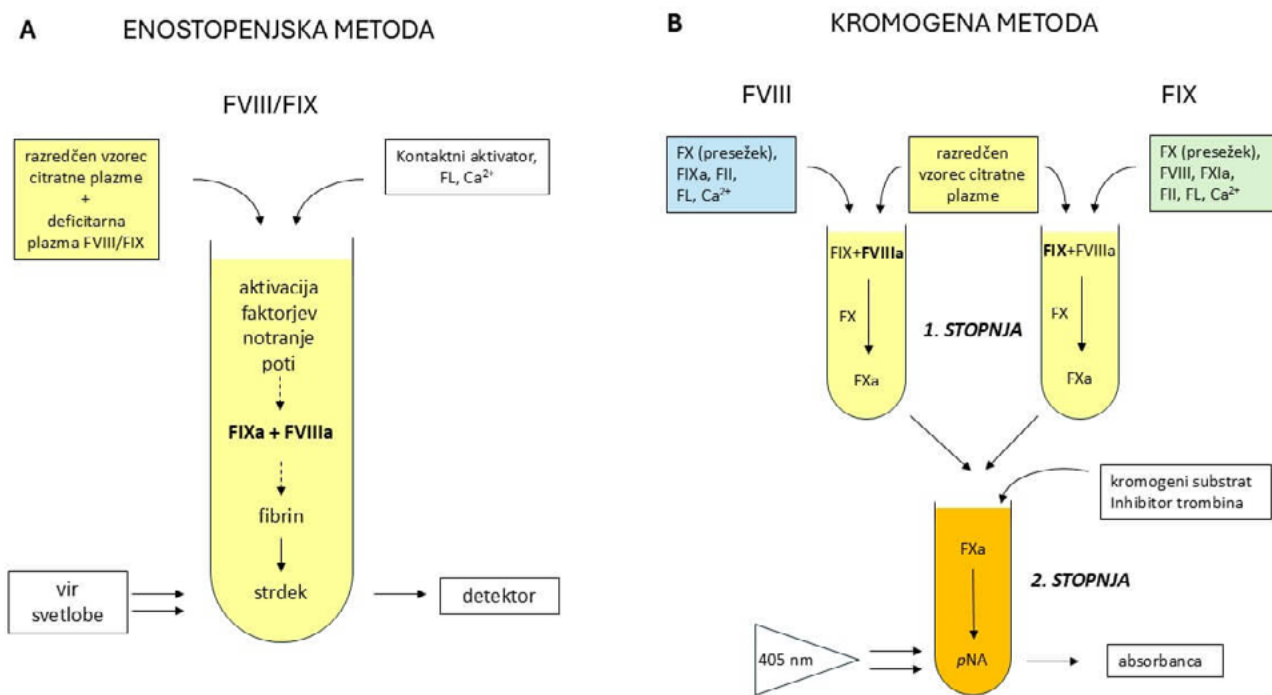
Pri enostopenjski metodi (ESM) merimo čas do nastanka fibrinskega strdka v eni stopnji. Za določitev FVIII/FIX je to različica APTČ, ki je prilagojena tako, da je čas do nastanka strdka odvisen izključno od aktivnosti faktorja, ki ga določamo (Slika 1A). Razredčeni bolnikovi plazmi dodajamo deficitarno plazmo (plazmo brez preiskovanega koagulacijskega faktorja). Aktivacijo notranje poti strjevanja sprožimo z dodatkom kontaktnega aktivatorja (npr. elagična kislina, kaolin, silika), širjenje reakcije pa je omogočeno zaradi prisotnih naravnih ali sintetičnih fosfolipidov in ob rekalcifikaciji. Čas nastanka strdka primerjamo z referenčno plazmo (kalibratorjem), s katero predhodno metodo umerimo (6–8).

Enostopenjsko preiskovanje je heterogena skupina metod, saj na trgu obstaja široka množica različnih reagentov in opreme. Na rezultate vpliva izbira APTČ reagenta, vira deficitarne plazme, vrste kalibratorja, merilnih principov ter protokolov merjenja. Razlike v sestavi reagentov in njihovi občutljivosti pomembno vplivajo na opredelitev diagnoze ob blagih pomanjkanjih faktorjev. Enostopenjska metoda je tudi občutljiva na predanalitična odstopanja (hemoliza, lipemija, kontaminacija s heparinom). Zaradi njene preproste izvedbe, možnosti avtomatizacije in relativno nizke cene je to najpogostejša metoda izbire v laboratorijih (9). »

Kromogena metoda

Merjenje aktivnosti faktorja s kromogenim substratom (KRM) je priporočena metoda za določanje aktivnosti FVIII/FIX pri opredelitvi stopnje hemofilije in metoda izbire za spremljanje nadomestnega zdravljenja obeh hemofilij z nekaterimi pripravki (podrobneje opisano v nadaljevanju). Pri teh preiskavah razredčeni plazmi bolnika

za določitev FVIII dodamo presežek FX, FIXa (oz. FVI-II in FXIa za določitev FIX), fosfolipide, trombin in kalcijeve ione. Nastaja aktivni encim – FXa, ki v drugi stopnji reakcije razgrajuje kromogeni substrat. Razgradnja kromogenega substrata in s tem obarvanje vzorca je premo sorazmerna aktivnosti kofaktorja FVIII oz. FIX, ki ga določamo (Slika 1B) (6, 8, 10).



Slika 1: Shematski prikaz enostopenjske (A) in kromogene (B) metode za merjenje FVIII in FIX. Ca, kalcijev klorid; F, faktor strjevanja; FL, fosfolipidi; pNA, para-nitroanalin.

Figure 1: Schematic overview of one-stage (A) and chromogenic (B) assay for FVIII and FIX activity measurement. Ca, calcium dichloride; F, clotting factor; FL, phospholipids; pNA, para-nitroanalin.

Tudi kromogene metode kalibriramo z referenčnim materialom. Na trgu je več različnih metod, ki se razlikujejo glede na izvor faktorjev v reagentih (človeški, goveji), vrsto in koncentracijo fosfolipidov, vrsto pufra in protokol inkubacije med merjenjem. V primerjavi z enostopenjsko je ta metoda manj občutljiva na predanalitične dejavnike, ker pa je dražja in zahtevnejša za izvedbo, jo praviloma uporabljajo le v specializiranih laboratorijih (9).

Imunske metode

Te metode so namenjene opredelitvi koncentracije posameznih koagulacijskih faktorjev. S pomočjo specifičnih protiteles v reakciji izmerimo količino beljakovine, s tem pa ne opredelimo njene aktivnosti. Večinoma se uporabljajo v raziskovalne namene oz. v specializiranih laboratorijih za dodatno biokemično opredelitev hemofilije.

»

Diagnozo hemofilije lahko postavimo s katero koli metodo določanja aktivnosti faktorja: enostopenjsko ali kromogeno. Rezultati metod so v splošnem primerljivi. Pri lahki hemofiliji A s specifičnimi genetskimi spremembami se lahko pojavijo razlike med metodami: KRM daje nižje ali višje rezultate od ESM. Razlog je bodisi prehitra disociacija bodisi zakasnjena aktivacija s trombinom pri spremenjeni varianti FVIII (11). Da teh bolnikov ne opredelimo napačno, je priporočeno, da se aktivnost FVIII določi z obema metodama. Končna izhodna aktivnost faktorja je nižji rezultat obeh izmerjenih vrednosti. Za opredelitev HB je priporočena uporaba enostopenjske metode (5).

NOVI PRISTOPI K ZDRAVLJENJU HEMOFILIJE

Pri zdravljenju hemofilije nadomeščamo manjkajoči FVII oz. FIX. Endogeni FVIII ima razpolovno dobo 12 ur, FIX pa 18 ur (5). Zdravljenje s standardnimi plazemskimi koncentracijami se danes opušta. Od leta 1992 se za pridobivanje koncentratov uporablja DNA tehnologija pridobivanja rekombinantnih molekul. Danes je na voljo tretja in četrta generacija rekombinantnih FVIII in FIX. Razvoj rekombinantnih molekul ugodno vpliva na farmakokinetične lastnosti pripravkov in zmanjša možnost prenosa okužb. Spremenjene molekule za telo predstavljajo nove antigenske izzive in verjetnost razvoja inhibitorjev pri tovrstnem zdravljenju je višja kot pri plazemskem nadomestnem zdravljenju (4). Razpolovna doba teh pripravkov faktorjev je približno enaka endogenim molekulam: med 12 in 19 ur za FVIII ter 19 in 26 ur za FIX (12).

Razvoj novih strategij obvladovanja krvavitev pri hemofiliji v zadnjem desetletju vključuje ali povečanje aktivnosti manjkajočega faktorja ali zmanjšanje delovanja endogenih zaviralcev koagulacije.

Faktorji s podaljšanim razpolovnim časom

Z uporabo novih biotehnoloških pristopov lahko spremenijo faktorjem sekvenčna zaporedja in jih po sintezi dodatno modificirajo (vezava z albuminom, pegilacija, tvorba fuzijskih proteinov), kar še izboljša njihove lastnosti. Tako se povečata njihova biološka razpoložljivost in koncentracija v plazmi, upočasni se njihovo razgradnjo in s tem zmer-

no podaljša razpolovno dobo. Razpolovni čas pripravkov s podaljšano življenjsko dobo je med 13 in 20 ur za FVIII ter med 70 in 100 ur za FIX (13,14).

Zdravljenje s koncentracijami s podaljšanim delovanjem je intravensko. Namenjeno je zdravljenju po potrebi ali preprečevalnemu zdravljenju. S podaljševanjem razpolovnega časa se zmanjša pogostost dajanja pripravkov za vzdrževanje želene ravni faktorja. Inhibitorji se v enaki meri razvijajo tudi pri uporabi teh oblik zdravljenja.

Na trg prihaja tudi nova oblika modificiranega rekombinantnega FVIII (efanesoctocog), ki je povezana s hidrofiličnim peptidom in delom von Willebrandovega faktorja (ter s tem zaščitena pred hitrim razpadom). Njegova razpolovna doba je podaljšana na 47 ur in je zato nivo FVIII ob preventivnem zdravljenju enkrat na teden znotraj referenčnega območja (> 40 %) (15). O razvoju inhibitorjev pri teh bolnikih zaenkrat ne poročajo.

Nefaktorsko nadomestno zdravljenje

Emicizumab je bispecifično humanizirano monoklonsko protitelo, ki v koagulacijski kaskadi nadomesti FVIII tako, da poveže FIXa in FX. Namenjen je bolnikom z inhibitorji in za preprečevalno zdravljenje bolnikov s težko obliko hemofilije A. Prednost tega zdravila je, da se daje podkožno samo na vsak teden ali v razponu od 1 do 4 tednov, hkrati pa je njegova raven v plazmi stabilna. V razvoju so tudi protitelesa, ki povezujejo FIXa in FX (16).

Fitusiran je interferenčna RNA, ki v hepatocitih vpliva na mRNA za sintezo antitrombina in s tem zmanjša njegovo tvorbo. Zaradi tega se povečuje tvorba trombina. Zdravilo se daje podkožno in je učinkovito pri HA in HB, vendar je še v fazi kliničnega preizkušanja (17).

Concizumab je monoklonsko protitelo proti inhibitorju potivnega faktorja (TFPI). Z zaviranjem TFPI se zmanjšata nastajanje kompleksa TF-FVIIa in aktivacija FX ter trombina. Tudi to zdravilo se daje podkožno (18).

Gensko zdravljenje

Gensko zdravljenje hemofilije omogoča bolnikom s težkimi oblikami bolezni dolgoročno zvišanje ravni manjkajočega faktorja in s tem manj potrebnih odmerkov nadomestnega zdravljenja. Že majhen dvig aktivnosti faktorja (na 1–6 %) lahko pomeni do 90 % manj krvavitev ter manjšo porabo pripravkov za zdravljenje. Zdravljenje temelji na »

prenosu nepatogenega adenoasociacijskega virusa (AAV) z bioinženirsko spremenjenim genomom, ki ni zmožen nadaljnjega razmnoževanja v gostitelju. Genetski zapis za sintezo faktorjev je dovolj majhen, da ga lahko vključimo v DNA AAV. Po intravenski infuziji vstopi AAV v hepatocite ali sinusoidne endotelne celice jeter z endocitozo in od tam v jedro, kjer se ne integrira v človeški genom, ampak se nahaja v obliki episomske DNA. Terapevtski gen se nato lahko izraža do celične smrti gostitelja in povzroči dvig aktivnosti faktorja (VIII ali IX).

Slabosti takšnega zdravljenja so možna prisotnost nevtralizacijskih protiteles proti AAV, čezmerni vnetni odziv jetrnih celic kot posledica imunogenosti virusne kapside ter s tem dvig aktivnosti jetrnih encimov. Pojavnost raka jeter je še premalo raziskana (17).

Do danes klinične raziskave kažejo, da je pri bolnikih s hemofilijo B gensko zdravljenje uspešnejše kot pri bolnikih s hemofilijo A, kjer klinične raziskave šele potekajo. Gensko zdravljenje lahko bolnik zaradi imunogenosti vektorja prejme le enkrat v življenju (19,20). Za hemofilijo B je evropska agencija za zdravila (EMA) zdravljenje odobrila leta 2022, za hemofilijo A pa leta 2023, vendar ne za otroke. V Sloveniji še ni bolnika, ki bi to zdravljenje prejel.

SPREMLJANJE ZDRAVLJENJA PRI BOLNIKI S HEMOFILIJO

Učinek zdravljenja pri hemofiliji večinoma spremljamo z merjenjem aktivnosti faktorjev med zdravljenjem po potrebi (npr. ob akutni krvavitvi ali kirurških posegih). Aktivnosti določamo tudi za opredelitev farmakokinetičnega profila pri bolniku in med preventivnim zdravljenjem (21). Ob razvoju modificiranih faktorjev s podaljšano razpolovno dobo in alternativnih nefaktorskih produktov se je zmanjšala pogostost dajanja zdravil ali zmanjšalo tveganje za nastanek inhibitorjev, sočasno pa se je izboljšala kakovosti življenja bolnikov. Po drugi strani je odziv

na ta zdravila pri bolnikih manj predvidljiv, kar zahteva pogostejše laboratorijsko spremljanje učinkovitosti. Nova zdravila in produkti zahtevajo hitro in primerno prilagoditev laboratorijskih metod merjenja aktivnosti. Za spremljanje aktivnosti plazemskih koncentratov je priporočeno, da se metoda spremljanja zdravljenja ujema z metodo, uporabljeno v klinični validaciji zdravila (5). Številne študije opisujejo, da se rezultati ESM in KRM nekaterih standardnih rekombinantnih faktorjev (npr. Refacto - rFVII- II brez B domene) razlikujejo za več kot 30 %. Zaradi tega merjenje zahteva uporabo posebnega standarda za umerjanje metode (22). Razlike so še očitnejše, ko merimo aktivnost kemijsko modificiranih faktorjev FVIII/IX s podaljšano razpolovno dobo. Odstopanja presegajo splošno sprejeto sprejemljivo razliko 25–30 %. Poleg razlik v uporabljenih metodah so pomembna odstopanja pri obeh metodah opisana tudi glede na vrsto uporabljenega reagenta. Nekateri ESM so za spremljanje zdravljenja produktov s podaljšano življenjsko dobo popolnoma neprimerne (Afstyla, Refixia), pri nekaterih koncentratih pa je priporočena metoda, ki se najbolj ujema s povrnitveno aktivnostjo faktorja, vezana na točno opredeljen reagent (Jivi, Esperoct, Idelvion, Alprolix, Refixia). Kljub temu, da KRM ostaja metoda izbora, so se pri nekaterih produktih iz te skupine pokazale nesprejemljivo velike razlike v primerjavi z ESM (Elocta, Esperoct, Altuvect). Za posamezne faktorje s podaljšano življenjsko dobo so si podatki o primernosti metod nasprotujoči (Adynovi), zato je priporočeno, da laboratorij pred uvedbo metode izvede interno vrednotenje merjenja spremljanja zdravljenja (7, 10, 15, 23).

Katere metode so primerne za spremljanje posameznega pripravka, je bilo preučeno v številnih študijah, povzetek pa je zapisan v Tabeli 1. Razlike med metodami, večje kot 35 % glede na ciljno aktivnost učinkovine, lahko vplivajo na odmerjanje, zato je treba vedeti, katero metodo za posamezno obliko zdravljenja je smotrno uporabiti. Prilagajanje izvajanja metod, prilagojenih posameznemu produktu, predstavlja zaradi heterogenosti kombinacij metod in primernosti uporabljenih reagentov delnega tromboplastina in faktorjev za kromogeno metodo laboratorijskem velik izziv (10, 24).



Tabela 1: Novi produkti in priporočene metode spremljanja zdravljenja pri hemofiliji A in B (5, 24).

Table 1: New products and laboratory monitoring in haemophilia A and B treatment (5, 24).

Ime	Modifikacija	Razpol. čas	Priporočena metoda za spremljanje aktivnosti	Kalibrator
Hemofilija A				
efmoroctolog alfa; Elocta®	Fuzija rFVIII z Fc domeno IgG1	19 ur	ESM KRM	Plazemski
turoctocog alfa pegol; Esperoct®	rFVIII s ciljno skrajšano PEGilirano B domeno	18–19 ur	KRM ESM – z nekaterimi APTČ reagenti, ki vsebujejo siliko ali elagično kislino	Plazemski
damoctocog alfa pegol; Jivi®	PEGiliran rFVIII brez B domene	19 ur	KRM ESM – z nekaterimi APTČ reagenti, ki vsebujejo siliko ali elagično kislino	Plazemski
rurioctolog alpha pegol; Adynovi®	20 kDa PEGiliran rFVIII	14–16 ur	Nasprotujoči podatki – potrebno vrednotenje lokalnega laboratorija	/
lonoctocog alfa; Afstyla®	Enoverižni rFVIII PEGiliran	14 ur	KRM	Plazemski
efanesotocog alfa; Altuvect	Fuzija rFVIII s Fc, XTEN in D'D3 domeno vWF	47 ur	ESM – z nekaterimi APTČ reagenti (15)	Plazemski
emicizumab; Hemlybra®	Bispecifično protitelo	26,7 dni	Modificirana ESM	Specifičen za emicizumab
Hemofilija B				
eftrenonacog alfa; Alprolix®	Fuzija rFIX z Fc domeno IgG1	82 ur	KRM ESM – z nekaterimi APTČ reagenti, ki vsebujejo siliko, elagično kislino ali polifenol	Plazemski
albutrepenonacog alfa; Idelvion®	Fuzija rFIX z (r) albuminom	102 ur	ESM – z nekaterimi APTČ reagenti ki vsebujejo siliko	Plazemski
nonacog beta pegol; Refixia®	40 kDa PEGiliran rFIX	93 ur	KRM ESM – z nekaterimi APTČ reagenti ki vsebujejo elagično kislino ali polifenol	Plazemski

>>

Ime	Modifikacija	Razpol. čas	Priporočena metoda za spremljanje aktivnosti	Kalibrator
Hemofilija A in B				
fitusiran	Moteča RNA	3–5 ur (26)	Ni priporočene metode	-
concisumab; Alhemo®	Monoklonsko protitelo proti TFPI	31–73 ur (odvisno od doze) (27)	Ni priporočene metode	-

rF, rekombinantni faktor; Fc, fragment, ki kristalizira; PEG, polietilen glikol; ESM, enostopenjska metoda; KRM, kromogena metoda; APTČ, aktivirani parcialni tromboplastinski čas; vWF, von Willebrandov faktor; XTEN, biorazgradljiv proteinski polimer; TFPI, zaviralec zunanje poti tkivnega faktorja.

rF, recombinant factor; Fc, fragment, crystallizable; PEG, polyethylene glycol; ESM, one-stage assay; KRM, chromogenic assay; APTČ, activated partial thromboplastine time; vWF, von Willebrand factor; XTEN, biodegradable protein polymers; TFPI, tissue factor pathway inhibitor.

Nefaktorsko zdravljenje hemofilije je namenjeno preprečevanju krvavitev, zato spremljanje učinka običajno ni povezano s kliničnimi zapleti. Pri spremljanju nefaktorskega zdravljenja imamo na voljo metode, s katerimi a) določamo koncentracije terapevtske spojine v plazmi, b) spremljamo učinek spojine na hemostatski potencial in c) merimo ekvivalent aktivnosti FVIII ob učinku spojine.

Za emicizumab je metoda izbire za spremljanje učinkovitosti kromogena metoda za določitev aktivnosti FVIII, pri kateri morajo reagenti vsebovati koagulacijske faktorje človeškega izvora. Z njo posredno ocenimo ekvivalent hemostatske aktivnosti emicizumaba. Pri bolnikih, ki imajo inhibitorje, je treba uporabiti KRM za FVIII, ki vsebuje goveji FX. Spremljanje učinkovitosti s presejalnimi koagulacijskimi preiskavami ni sprejemljivo, saj med koncentracijo emicizumaba v krvi in APTČ ni povezave. Bispetsično protitelo v plazmi bolnika moti vse preiskave, pri katerih sodelujejo koagulacijski faktorji notranje poti (vse enostopenjske metode določanja intrinzičnih faktorjev, koagulacijske metode za merjenje aktivnosti PC in PS). Kar je treba določiti nivo emicizumaba, je priporočena enostopenjska modificirana metoda z redčeno plazmo in uporabo specifičnih kalibratorjev za emicizumab (5,24).

Spremljanje učinkovitosti zdravljenja z zaviranjem ali zmanjšanjem delovanja naravnih zaviralcev (concizima-

ba, fitusirana) še ni dovolj raziskano. V predkliničnih in kliničnih študijah sta uporabljeni dve metodi, in sicer določitev plazemske koncentracije concizumaba z masno spektrometrijo oz. za fitusiran merjenje aktivnosti antitrombina s kromogeno metodo. Uporabnost globalnih metod hemostatskega potenciala, npr. merjenje generacije trombina, še ni dovolj raziskano (16, 25).

Preverjanje ustreznosti metod za spremljanje genskega zdravljenja HA in HB še poteka. Za zdaj je priporočeno, da se aktivnost faktorjev določa z ESM in KRM sočasno. Pri genskih zdravljenjih obeh hemofilij je opisano, da dajejo ESM približno 1,6-krat višje rezultate v primerjavi s KRM (5).

Vprašanje med-laboratorijskih razlik pri spremljanju zdravljenja hemofilije je postalo pomemben del predkliničnih in rutinskih preizkušanj. Pri vsakem spremljanju zdravljenja, še posebej pri novih oblikah, se moramo zavedati, da obstajajo neustrezni testi za nekatere modificirane faktorje ali obratno, da nekaterih faktorjev ne moremo meriti z določeno metodo. Če je za postavitev diagnoze manj pomemben izbor ustrezne metode, pa lahko zagotovo trdimo, da za spremljanje zdravljenja v današnjem času ni tako. Minimalna zahteva, ki je življenjskega pomena za bolnika s hemofilijo, je torej, da metoda merjenja ne preceni opredelitve terapevtskega učinka.



SKLEP

Laboratorijsko spremljanje zdravljenja hemofilije v modernem času predstavlja vse večje izzive. Zdravljenje s faktorji s podaljšanim delovanjem in nefaktorsko zdravljenje za bolnike prinašata številne prednosti, po drugi strani pa neprimeren izbor metode za spremljanje njihovega učinka predstavlja tveganje za primerno obravnavo teh bolnikov. Kako in ali se bo nova oblika zdravljenja spremljala laboratorijsko, se odloči zdravnik. Zaradi možnosti velikih razlik pri meritvah z uporabo različnih metod in tudi izbranih vrst reagentov je treba za bolnike, ki se zdravijo, natančno vedeti, kakšne vrste nadomestnega zdravljenja prejemajo. Za nova zdravljenja bodo smernice za spremljanje postavljene šele na podlagi študij, ki so še v teku. Zaradi kompleksnosti laboratorijskih diagnostičnih postopkov je priporočeno, da se spremljanje učinkovin izvaja v specializiranih laboratorijih, ki imajo ustrezno opremo in kjer so na voljo možnosti uporabe različnih analitskih pristopov. Ti laboratoriji morajo imeti tudi ustrezno raven zagotavljanja kakovosti rezultatov za vsako od metod. Trenutne smernice za vse obstoječe načine zdravljenja, tako standardnega kot zdravljenja z novimi pristopi, predvidevajo uporabo različnih enostopenjskih in kromogenih metod, ovrednotenih za posamezno učinkovino. V Sloveniji imamo specializirane laboratorije, ki delujejo na interni in pediatrični kliniki UKC Ljubljana v okviru nacionalnega Centra za hemofilijo in druge prirojene motnje strjevanja. Tu se izvaja celostna zdravstvena oskrba bolnikov s hemofilijo. Ti dve enoti zagotavljata vse oblike zdravljenja, ki so trenutno na voljo, ter primeren izbor, izvedbo in interpretacijo rezultatov v skladu s terapijo. Ob globalizaciji zdravstvene oskrbe bolnikov ne samo v slovenskih zdravstvenih ustanovah, temveč po Evropi in izven nje, bo v prihodnje treba posebno pozornost nameniti varni obravnavi teh bolnikov. Za bolnika ni vseeno, katero metodo za spremljanje zdravljenja se pri njegovi obravnavi uporabi. Pri postavljanju strategij obravnav bodo v prihodnosti imeli ključno vlogo proizvajalci zdravil, zakonodajna telesa in strokovna združenja.

LITERATURA

1. Preložnik Zupan I, Renner K. Novosti v zdravljenju hemofilije. New developments in haemophilia treatment. *Farm Vest*. 2023; 74(2):125–30.
2. White GC 2nd, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. 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(3):560.
3. Andoljšek D. Bolezni krvi in krvotvornih organov. In: Košnik M, et al, editors. *Interna medicina*. 3rd ed. Ljubljana: Littera picta; 2011. p. 1243–393.
4. Peyvandi F, Mannucci PM, Garagiola I, El-Beshlawy A, Elalfy M, Ramanan V, et al. A Randomized Trial of Factor VIII and Neutralizing Antibodies in Hemophilia A. *N Engl J Med*. 2016;374(21):2054–64.
5. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemoph Off J World Fed Hemoph*. 2020;26 Suppl 6:1–158.
6. Kitchen S, McCraw A, Echenagucia M. *Diagnosis of Hemophilia and Other Bleeding Disorders: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Montreal, Canada: World Federation of Hemophilia; 2010. Dostopno na: <https://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1283.pdf>. dostopano november 2024.
7. Valentino LA, Turecek PL, Gritsch H, Butenas S, Mann KG. Issues complicating precision dosing for factor VIII prophylaxis. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis*. 2018;57(4):472–9.
8. Nardi MA. Laboratory Monitoring of Factor VIII and Factor IX in Hemophilia Patients. *Am Soc Clin Lab Sci*. 2019;32(1):27–35.
9. Tripodi A, Chantarangkul V, Novembrino C, Peyvandi F. Advances in the Treatment of Hemophilia: Implications for Laboratory Testing. *Clin Chem*. 2019;65(2):254–62.
10. Kitchen S, Kershaw G, Tiefenbacher S. Recombinant to modified factor VIII and factor IX - chromogenic and one-stage assays issues. *Haemoph Off J World Fed Hemoph*. 2016;22 Suppl 5:72–7.
11. Bowyer AE, Van Veen JJ, Goodeve AC, Kitchen S, Makris M. Specific and global coagulation assays in the diagnosis of discrepant mild hemophilia A. *Haematologica*. 2013;98(12):1980–7.
12. Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *Lancet Lond Engl*. 2016;388(10040):187–97.
13. Abdelgawad HAH, Foster R, Otto M. Nothing short of a revolution: Novel extended half-life factor VIII replacement products and non-replacement agents reshape the treatment landscape in hemophilia A. *Blood Rev*. 2024;64:101164.
14. Peyvandi F, Kenet G, Pektur I, Pruthi RK, Ramge P, Spannagl M. Laboratory testing in hemophilia: Impact of factor and non-factor replacement therapy on coagulation assays. *J Thromb Haemost JTH*. 2020;18(6):1242–55.



15. Pipe S, Sadeghi-Khomami A, Konkle BA, Kitchen S, Negrier C, Liu M, et al. A global comparative field study to evaluate the factor VIII activity of efanesoctocog alfa by one-stage clotting and chromogenic substrate assays at clinical haemostasis laboratories. *Haemoph Off J World Fed Hemoph.* 2024;30(1):214–23.
16. Anandani G, Patel T, Parmar R. The Implication of New Developments in Hemophilia Treatment on Its Laboratory Evaluation. *Cureus.* 2022;14(10):e30212.
17. Butterfield JSS, Hege KM, Herzog RW, Kaczmarek R. A Molecular Revolution in the Treatment of Hemophilia. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2020;28(4):997–1015.
18. Nogami K, Shima M. Current and future therapies for haemophilia-Beyond factor replacement therapies. *Br J Haematol.* 2023;200(1):23–34.
19. Pipe SW, Gonen-Yaacovi G, Segurado OG. Hemophilia A gene therapy: current and next-generation approaches. *Expert Opin Biol Ther.* 2022;22(9):1099–115.
20. Batty P, Lillicrap D. Gene therapy for hemophilia: Current status and laboratory consequences. *Int J Lab Hematol.* 2021;43 Suppl 1:117–23.
21. Dolničar MB, Kotnik BF, Kitanovski L, Zupan IP, Doma SA, Debeljak M, et al. Nacionalna priporočila za obravnavo bolnikov s hemofilijo. *Slov Med J.* 2017;86(9–10):422–78.
22. Pouplard C, Ternisien C, Desconclois C, Lasne D, Aillaud MF, Caron C. Discrepancies between one stage assay and chromogenic substrate assay in patients treated with recombinant or plasma-derived FVIII and usefulness of a specific standard in ReFacto AF®-treated patients. *Haemoph Off J World Fed Hemoph.* 2016;22(2):e101–3.
23. Müller J, Miesbach W, Prüller F, Siegemund T, Scholz U, Sachs UJ, et al. An Update on Laboratory Diagnostics in Haemophilia A and B. *Haemostaseologie.* 2022;42(4):248–60.
24. Bowyer AE, Gosselin RC. Factor VIII and Factor IX Activity Measurements for Hemophilia Diagnosis and Related Treatments. *Semin Thromb Hemost.* 2023;49(6):609–20.
25. Lenting PJ. Laboratory monitoring of hemophilia A treatments: new challenges. *Blood Adv.* 2020;4(9):2111–8.
26. Young G, Lenting PJ, Croteau SE, Nolan B, Srivastava A. Antithrombin lowering in hemophilia: a closer look at fitusiran. *Res Pract Thromb Haemost.* 2023;7(4):100179.
27. Australian public assessment report for Alhemo. Active ingredient Concizumab, (AusPAR - Alhemo - concizumab - Novo Nordisk Pharmaceuticals Pty Ltd - PM-2022-03458-1-6, FINAL 8 March 2024) Therapeutic Goods Administration, Australia