

Hemofilija i njeno liječenje

Babac, Ena

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:063336>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-12**

Repository / Repozitorij:

BIotech

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Ena Babac

Hemofilija i njeno liječenje

Završni rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Ena Babac

Hemofilija i njeno liječenje

Završni rad

Rijeka, 2024.

Mentor: Prof. dr. sc. Antonija Jurak Begonja

Komentor: Doc. dr. sc. Željka Minić

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG DEVELOPMENT
Undergraduate university study
„Biotechnology and Drug Research“

Ena Babac

Hemophilia and its treatment

Bachelor thesis

Rijeka, 2024.

Mentor: Prof. Antonija Jurak Begonja, Ph.D.

Comentor: Assist. prof. dr. sc. Željka Minić, Ph.D.

Završni rad obranjen je dana _____

pred povjerenstvom:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima 45 stranica, 15 slika, 0 tablica i 36 literaturnih navoda.

Sažetak

Hemofilija je nasljedna hemoragijska bolest koja se prenosi recesivno preko X kromosoma, a uzrokovana je nedostatkom faktora zgrušavanja krvi, najčešće faktora VIII (hemofilija A) ili faktora IX (hemofilija B). Bolest je najčešće prisutna kod muškaraca zbog načina nasljeđivanja, dok žene mogu biti nositeljice bez manifestacije simptoma. Hemofilija može dovesti do teških krvarenja u zglobove, mišiće i unutarnje organe, a posebno nakon ozljeda ili operacija. Glavni simptom hemofilije je produženo krvarenje koje može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih komplikacija poput artropatije, što je kronično stanje koje može uzrokovati invalidnost. Povijesno, hemofilija je poznata kao „kraljevska bolest“ zbog učestalosti među europskim plemstvom. Genske mutacije u F8 i F9 genima odgovorne su za različite oblike hemofilije. Suvremeni terapijski pristupi uključuju gensku terapiju koja cilja na korijen bolesti i nadomjesnu terapiju koja se koristi za upravljanje simptomima. Istražuje se može li specifična krvna grupa utjecati na krvarenja kod zdravih ljudi ili na težinu hemofilije, što bi moglo unaprijediti liječenje bolesti.

Ključne riječi

Nasljedna bolest, faktor zgrušavanja, krvarenje, artropatija, genska terapija

Summary

Hemophilia is an inherited hemorrhagic disorder that is passed on recessively through the X chromosome and is caused by a deficiency in blood clotting factors, most commonly factor VIII (Hemophilia A) or factor IX (Hemophilia B). The disease is most commonly found in men due to its mode of inheritance, while women can be carriers without showing symptoms. Hemophilia can lead to severe bleeding in the joints, muscles, and internal organs, particularly after injuries or surgeries. The main symptom of hemophilia is prolonged bleeding, which can result in serious health complications such as arthropathy, a chronic condition that can cause disability. Historically, hemophilia has been known as the „royal disease“ due to its prevalence among European royalty. Genetic mutations in the F8 and F9 genes are responsible for different forms of hemophilia. Modern therapeutic approaches include gene therapy, which targets the root cause of the disease, and replacement therapy, which is used to manage symptoms. Research is being conducted to determine whether a specific blood type can influence bleeding in healthy individuals or the severity of hemophilia, which could improve treatment strategies for the disease.

Key words

Inherited disease, clotting factor, bleeding, arthropathy, gene therapy

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. OPĆENITO O HEMOFILIJI.....	1
1.2. HEMOSTAZA	1
1.3. POVIJEST HEMOFILIJE	5
1.4. NASLJEĐIVANJE HEMOFILIJE	6
1.5. RASPROSTRANJENOST HEMOFILIJE	6
2. SVRHA RADA	9
3. MOLEKULARNI MEHANIZAM HEMOFILIJE	10
3.1. GRAĐA FAKTORA VIII.....	11
3.2. POVEZANOST KRVNIH GRUPA I RIZIKA OD KRVARENJA	11
4. SIMPTOMI HEMOFILIJE	13
4.1. HEMOFILNA ARTROPATIJA I SINOVISITIS.....	14
5. DIJAGNOSTICIRANJE HEMOFILIJE	16
5.1. TEST PROBIRA.....	16
5.2. LABORATORIJSKO ISPITIVANJE	16
5.3. GENETSKO SEKVENCIRANJE	18
5.4. PRENATALNA DIJAGNOSTIKA	19
6. LIJEČENJE HEMOFILIJE	21
6.1. KRIOPRECIPITAT	21
6.2. METODE INAKTIVACIJE ILI IZOLIRANJA VIRUSA IZ KONCENTRATA	22
6.4. PROIZVODNJA NOVIH KONCENTRATA PUTEM DNA REKOMBINANTNE TEHNOLOGIJE ..	25
6.5. PRODULJENI POLUŽIVOT KONCENTRATA	26
6.6. EMICIZUMAB.....	31
6.7. OSTALE TERAPIJE KOJE NE UKLJUČUJU FAKTOR.....	33
6.7.1. FITUSIRAN	33
6.7.2. KONCIZUMAB.....	34
6.8. GENSKA TERAPIJA	35
9. LITERATURA	39
10. ŽIVOTOPIS.....	43

1. UVOD

1.1. OPĆENITO O HEMOFILIJI

Izraz hemofilija dolazi od grčkih riječi *haima* što znači krv te *philia* što znači sklonost i naziv je za najčešću nasljednu hemoragičnu bolest (1). To je x-vezani nasljedni poremećaj krvarenja uzrokovan nedostatkom faktora zgrušavanja. Razlikujemo hemofiliju A koja je rezultat nedostatka koagulacijskog faktora VIII i hemofiliju B kod koje nedostaje koagulacijski faktor IX (2). Pored ovih oblika hemofilije, postoji i niz drugih sličnih poremećaja krvarenja od kojih je najpoznatija von Willebrandova bolest (VWB) (3).

1.2. HEMOSTAZA

Zaustavljanje krvarenja, poznato kao hemostaza, važan je proces koji se odvija u nekoliko uzastopnih faza: vazokonstrikcija, primarna hemostaza i sekundarna hemostaza i fibrinoliza (4). Nakon što dođe do ozljede krvne žile, refleksno dolazi do suženja glatkih mišića u stijenci žile, odnosno vazokonstrikcije, što smanjuje protok krvi prema ozlijeđenom području (Slika 1.A) (5).

Oštećenje krvnih žila izlaže subendotelni sloj, koji sadrži kolagen, trombocitima u cirkulaciji. Trombociti se vežu za kolagen pomoću specifičnih receptora na svojoj površini, što omogućuje čvrstu adheziju. Von Willebrandov faktor (VWF), prisutan na površini endotelnih stanica, djeluje kao most između kolagena i trombocitnog receptora, stabilizirajući adheziju trombocita. Aktivirani trombociti mijenjaju svoj oblik i oslobađaju granule koje sadrže tromboksan A₂ i ADP, čime dodatno potiču agregaciju drugih trombocita. Nakupljeni aktivirani trombociti stvaraju primarni trombocitni čep, iz kojeg se tijekom sekundarne hemostaze razvija fibrinski ugrušak (Slika 1B). Sekundarna hemostaza započinje formiranjem primarnog trombocitnog čepa, a njen je glavni cilj stabilizacija čepa formiranjem mreže fibrinskih niti. Ovaj

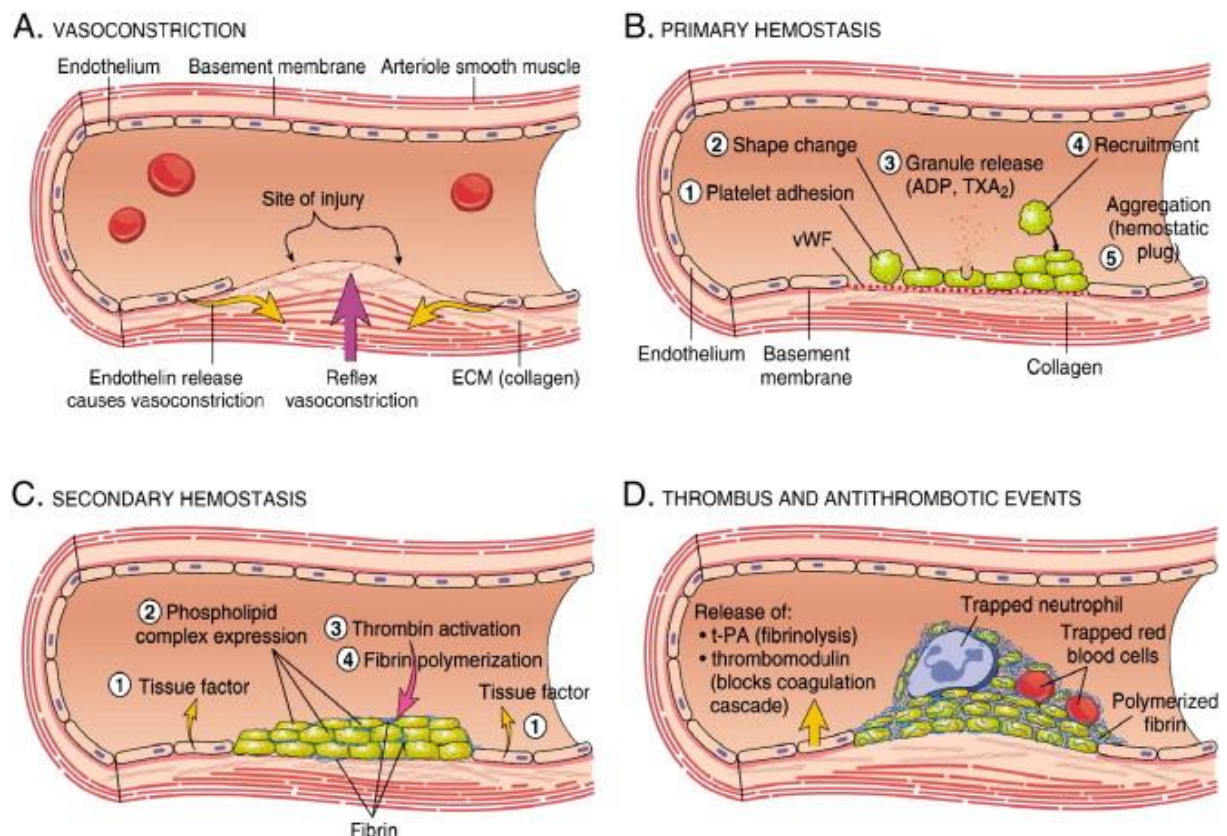
proces uključuje niz enzimskih reakcija i interakcija između koagulacijskih faktora i stanica, poznatih kao koagulacijska kaskada. Kaskada se može pokrenuti unutarnjim i vanjskim putem, ali je cilj isti: osigurati da trombocitni čep postane trajan i otporan na fizičke sile unutar krvne žile, osiguravajući trajno zaustavljanje krvarenja (4).

Sekundarna hemostaza se dijeli na tri faze: inicijaciju (vanjski put koagulacije), amplifikaciju (unutarnji put koagulacije) i propagaciju (zajednički put). Inicijacija počinje kada se, uslijed ozljede tkiva, izloži TF (tkivni faktor) na površini krvne žile i veže za VIIa (aktivirani faktor VII), stvarajući kompleks TF-VIIa. Ovaj kompleks aktivira faktor X u faktor Xa, što dovodi do stvaranja male količine trombina (faktor IIa), koji aktivira unutarnji put koagulacije (Slika 2) (4).

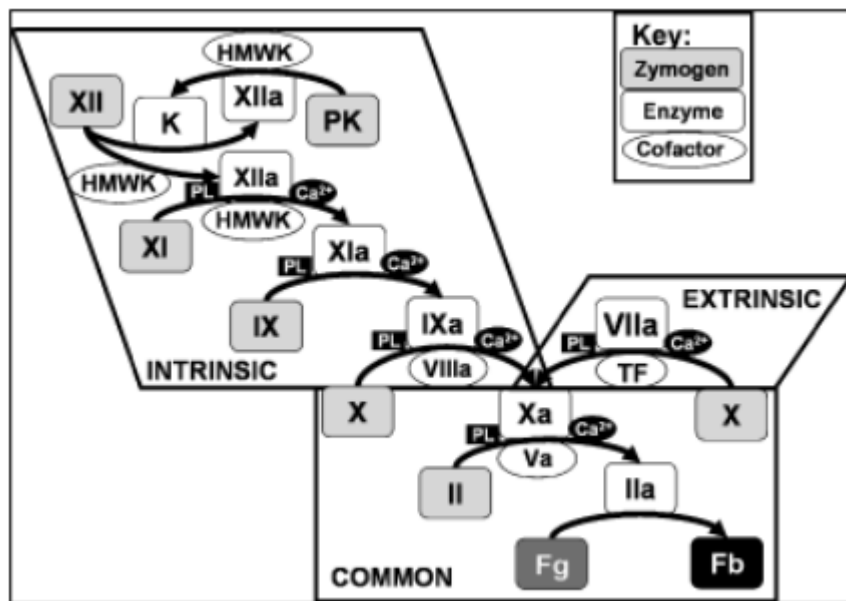
High molecular weight kininogen (HMWK) djeluje kao kofaktor i veže se na površinu krvnih žila nakon njihovog oštećenja, aktivirajući faktor XII. Aktivirani faktor XII (XIIa) aktivira prekallikrein (PK) u kallikrein (K), koji pojačava aktivaciju faktora XII i cijepa HMWK, oslobađajući bradikinin, što povećava vaskularnu propusnost. Faktor XIIa aktivira faktor XI, koji zatim aktivira faktor IX (IXa). Faktor IXa veže se za kofaktor VIIIa na površini trombocita, čime se dodatno aktivira faktor X i osigurava masovna proizvodnja trombina, ključnog za formiranje stabilnog fibrinskog ugruška. Faktor VIII u krvotoku postoji u neaktivnom obliku, vezan za VWF koji ga štiti od razgradnje i omogućuje njegov transport kroz krvotok. Kada dođe do ozljede trombin ga pretvara u aktivni oblik VIIIa (4).

U zadnjoj fazi sekundarne hemostaze, faktor Xa zajedno s aktiviranim faktorom V (Va) pretvara protrombin (faktor II) u trombin (faktor IIa), koji potom katalizira konverziju fibrinogena (Fg) u netopivi fibrin (Fb), iz kojeg se formira mreža fibrinskih niti. Ove niti se križno povezuju i stabiliziraju fibrinski ugrušak, čineći ga otpornim i trajnim (4).

U završnoj fazi hemostaze, fibrinolizi, dolazi do razgradnje i uklanjanja fibrinskog ugruška jer je krvarenje zaustavljeno. Fibrin, glavna komponenta ugruška, razgrađuje se djelovanjem plazmina, aktivnog oblika plazminogena. Aktivaciju plazminogena mogu potaknuti tkivni plazminogen aktivator (tPA) i urokinazni plazminogen aktivator (uPA) (Slika 1.D) (4).

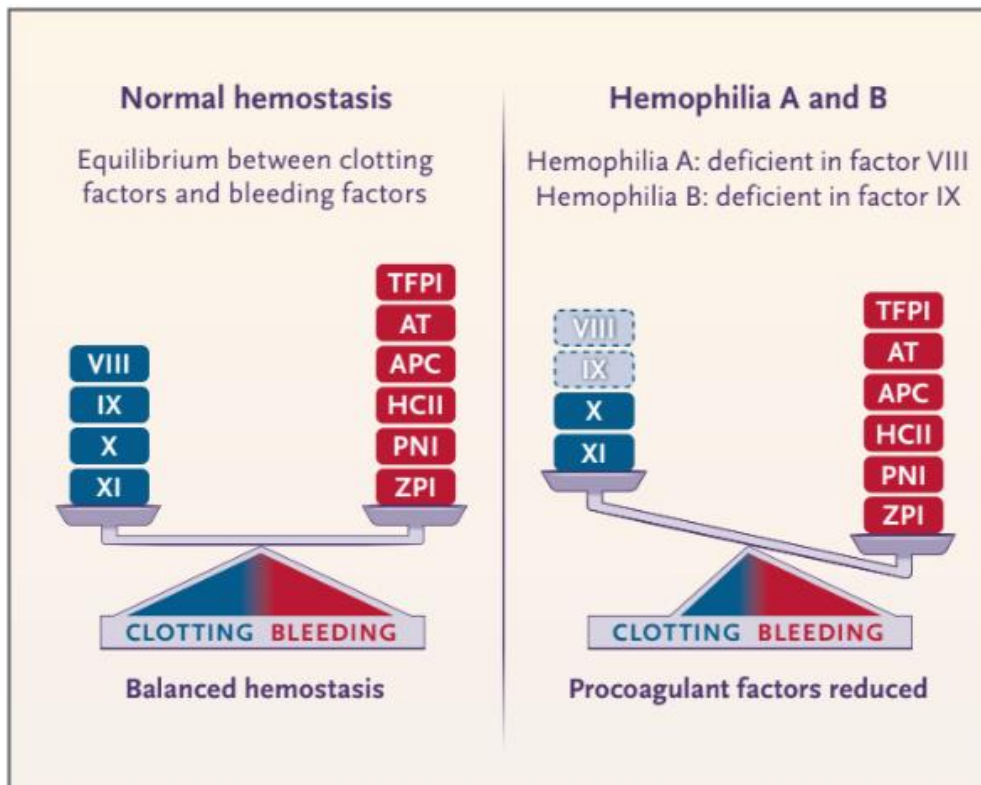


Slika 1. Ilustracija procesa zgrušavanja krvi koja prikazuje četiri glavna koraka hemostaze (vazokonstrikcija, primarna hemostaza, sekundarna hemostaza i fibrinoliza). (S. Cito et al, 2013., „Elsevier Journal“ (5))



Slika 2. Kaskadni model stvaranja fibrina. Model dijeli koagulacijski sustav na unutarnji i vanjski put zgrušavanja krvi . (S.A. Smith et al, 2009., „*Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*“ (4))

Kod osoba s hemofilijom unutarnji put koagulacije je inaktiviran zbog deficijencije faktora zgrušavanja VIII (FVIII) ili IX (FIX), što rezultira niskom razinom trombina. Zbog toga su te osobe podložne krvarenju. U procesu zgrušavanja krvi, osim prokoagulantnih faktora sudjeluju i antikoagulantni faktori poput proteina C, proteina S, antitrombina i fibrinolitičkih čimbenika, pa hemostaza ovisi o ravnoteži tih sustava (Slika 3). Međutim, kod hemofilije dolazi do nedostatka prokoagulantnih faktora, što dovodi do povećane sklonosti krvarenju (6).



Slika 3. Faktori koji sudjeluju u hemostazi zdravih osoba i onih s hemofilijom. (H. Marijke van den Berg et al, 2023., „The New England Journal of Medicine” (6))

1.3. POVIJEST HEMOFILIJE

Hemofilija je ljudima poznata već stoljećima i često se naziva kraljevskom bolešću. Prva poznata članica kraljevske obitelji s ovim poremećajem bila je kraljica Viktorija (1). Kako se mutacija prenosi preko X kromosoma, muški potomci su oboljevali od hemofilije, dok su žene prenosile poremećaj na sljedeće generacije. U to vrijeme brakovi su često bili dogovoreni među kraljevskim obiteljima. Zbog čega se hemofilija proširila iz Ujedinjenog Kraljevstva u njemačke, španjolske i ruske kraljevske obitelji. Upravo zbog toga hemofilija se često nazivala kraljevskom bolešću. Jedan od glavnih simptoma hemofilije su modrice po tijelu pa se zbog toga govorilo da je „hemofilična krv” plava krv, aludirajući na plemićku krv (7).

1.4. NASLJEĐIVANJE HEMOFILIJE

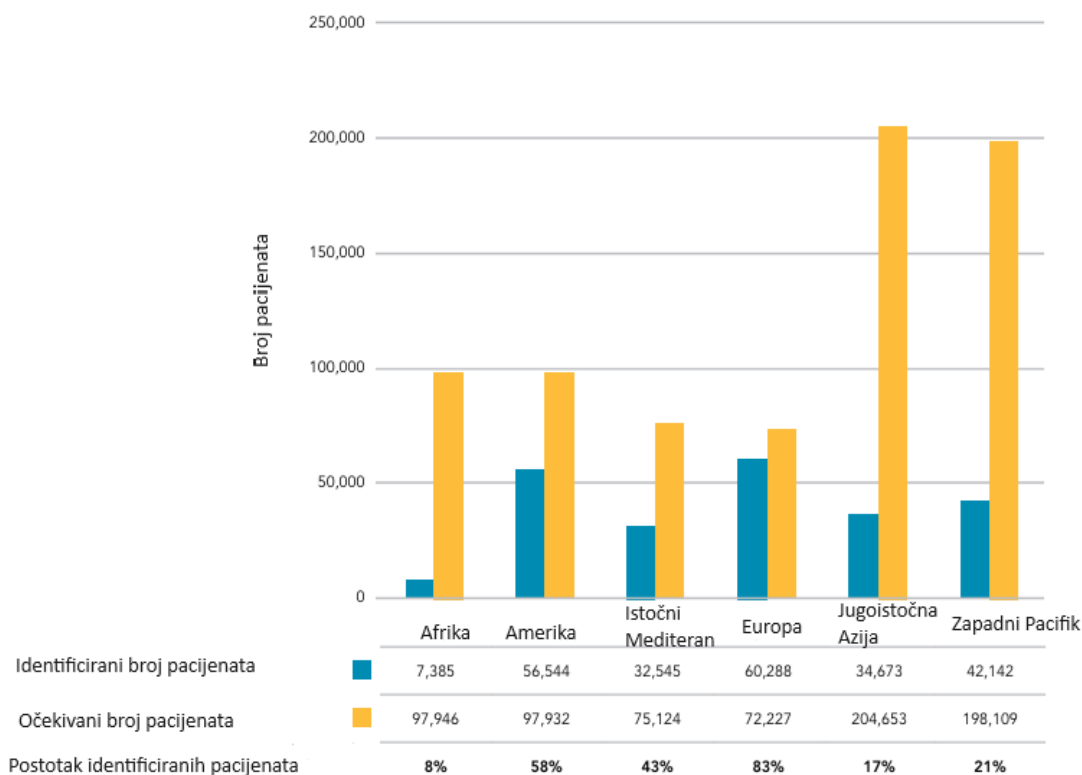
Hemofilija je poremećaj koagulacije koji je uzrokovan deficijencijom jednog od koagulacijskih faktora. Kada nedostaje koagulacijski faktor VIII riječ je hemofiliji A, dok se hemofilija B odnosi na manjak faktora IX. Hemofilija A puno je češća u populaciji u usporedbi s hemofilijom B. Bilo da se radi o hemofiliji A ili B poremećaj se nasljeđuje recesivno, preko X kromosoma što znači da je češće prisutna u muškaraca nego u žena. Muškarcima sa zahvaćenim alelom na X kromosomu se bolest zasigurno manifestira, dok žene moraju imati zahvaćena oba alela na X kromosomima, što je mnogo rjeđe. Muškarci hemofiličari ne mogu prenijeti poremećaj na svoje sinove, ali sve njihove kćeri su obavezne nositeljice mutiranog alela. Zdrave žene sa zahvaćenim jednim alelom, mogu prenijeti poremećaj na svoje sinove (8).

1.5. RASPROSTRANJENOST HEMOFILIJE

Prema podacima Svjetske federacije hemofilije (World Federation of Hemophilia, WFH) iz 2022. svake godine rodi se oko 20 000 djece s hemofilijom, od kojih 7 000 ima težak oblik ove bolesti. 2021. godine identificirano je 386 966 pacijenata diljem svijeta, uključujući 185 318 s hemofilijom A, 37 998 s hemofilijom B te 89 848 s VWB. Od kraja prošlog stoljeća do danas broj oboljelih stalno raste, što je u skladu s povećanjem opće populacije u svijetu (9).

Što se tiče rasprostranjenosti pacijenata, najviše osoba s hemofilijom dolazi iz Amerike, zatim Europe pa Azije, a potom iz Afrike (Slika 4). Međutim, važno je naglasiti da ne dostavljaju sve zemlje svijeta podatke o oboljelima Svjetskoj federaciji hemofilije. Zbog toga je broj identificiranih hemofiličara iz Afrike vrlo mali, iako se očekuje veći broj. Zbog ekonomskih poteškoća, dio pacijenata u Africi nema pristup liječenju, dok je pacijentima iz ostatka svijeta pružena medicinska pomoć (9).

U Hrvatskoj od hemofilije boluje oko 500 ljudi, a među njima, otprilike 150 pacijenata pati od teškog oblika ove bolesti (11).



Slika 4. Broj identificiranih u odnosu na očekivane pacijente s hemofilijom prema regijama. (Srivastava A et al, 2020., „World Federation of Hemophilia“ (9))

Svjetski dan hemofilije obilježava se svake godine 17. travnja kako bi se podigla svijest o ovoj bolesti, ali i drugim nasljednim poremećajima krvarenja. Svjetska federacija hemofilije procjenjuje da 75% osoba s hemofilijom nije svjesno da ima ovu bolest. Povećanje svijesti omogućilo bi bolju zdravstvenu skrb pacijentima. Obilježavanje Svjetskog dana hemofilije pokrenuto je još 1989. godine od strane Svjetske federacije hemofilije, a 17. travnja izabran je kao datum okupljanja zajednice u čast rođendana Franka Schnabela, osnivača ove organizacije (10). Društvo hemofiličara Hrvatske (DHH) nastoji povezati članove udruge i poboljšati kvalitetu života pacijentima. Od osnivanja 1992. godine u

Zagrebu, udruga broji više od 400 članova. DHH je vrlo aktivna i ima za cilj pružiti nove informacije o bolesti oboljelima i njihovim obiteljima te organizirati skupove i edukacije na kojima kontinuirano prate razvoj novih terapija za liječenje (11).

Ovim preglednim radom pruža se detaljan uvid u različite aspekte hemofilije. Počevši od nasljeđivanja i rasprostranjenosti ove bolesti pa do kliničke slike bolesnika, molekularnih mehanizama hemofilije, različitih načina dijagnosticiranja i liječenja hemofilije. Individualizirani pristupi liječenju predstavljaju budućnost medicine. Samo detaljna istraživanja pojedinih bolesti, uz interdisciplinarno povezivanje, mogu pružiti cjelovitu sliku i detaljne informacije o bolesti, čime se omogućuje učinkovito ostvarivanje takvih tretmana.

2. SVRHA RADA

Cilj pretraživanja i uspoređivanja znanstvene literature o hemofiliji bio je objediniti različite aspekte promatranja ove bolesti na jedno mjesto. Analizom simptoma i kliničke slike pacijenata te usporedbom starijih i novijih metoda dijagnosticiranja i liječenja, može se dobiti cjelovita slika o hemofiliji.

Ovim radom nastoji se objasniti molekularni mehanizam hemofilije te usporediti normalnu hemostazu u zdravih osoba s neravnotežom zgrušavanja krvi kod osoba s hemofilijom. Također, se analiziraju podaci o incidenciji ove bolesti.

Razumijevanje molekularnog mehanizma hemofilije i starijih metoda liječenja omogućava objašnjenje novih i potencijalnih terapija za ovu bolest. Genska terapija cilja na liječenje samog uzroka bolesti u genomu, dok tradicionalne nadomjesne terapije sprječavaju krvarenje, jedan od glavnih simptoma hemofilije. Također, analiza i razumijevanje metoda za dijagnosticiranje hemofilije važno je jer pruža temelj za preciznije propisivanje terapije i učinkovitije liječenje.

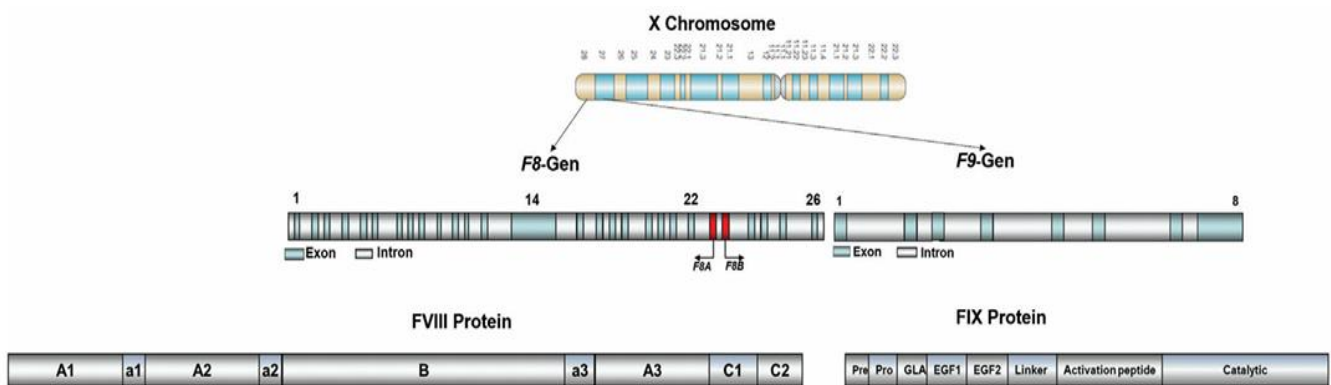
3. MOLEKULARNI MEHANIZAM HEMOFILIJE

Hemofilija A i hemofilija B su poremećaji koagulacije najčešće uzrokovani monogenetskim mutacijama u genima F8 i F9, koji kodiraju faktore koagulacije VIII ili IX. Ovi geni smješteni su na q kraku X kromosoma. Gen F8, sa svojih 180 kb, značajno je veći i strukturno kompleksniji za proučavanje u odnosu na F9 gen koji je dugačak 34 kb. Prema podacima o broju identificiranih pacijenata s poremećajima krvarenja, 47.65% oboljelih pati od hemofilije A, dok 9% boluje od hemofilije B, što ukazuje na znatno veću učestalost mutacija u F8 genu u odnosu na F9 gen (9). U rijetkim slučajevima, otprilike 30% slučajeva, hemofilija nastaje zbog *de novo* mutacija (12).

Molekularni mehanizam hemofilije je raznolik, iako se gotovo sve genske mutacije javljaju u F8 i F9 genima. Vrsta genetske mutacije ima ključnu ulogu u određivanju težine simptoma bolesti. Na primjer, mutacije koje uzrokuju potpuni nedostatak faktora VIII svrstavaju se u skupinu nultih varijanti, pri čemu je jedna od takvih mutacija inverzija između 22. i 1. introna F8 gena (Slika 5). S druge strane, mutacije koje spadaju u *missense* varijante mogu dovesti do smanjene funkcije koagulacijskog faktora, uzrokujući time umjereni do blagi oblik hemofilije (12).

U intronu 22, F8 gena nalazi se intronski reverzni transkript (int22h), koji sadrži tri kopije gena prepisane reverzno (u suprotnom smjeru) od ostatka F8 gena. Taj int22h se može integrirati u F8 gen putem reverzne transkripcije, što rezultira inverzijom 22. introna. Ova inverzija je glavni uzrok teške hemofilije A jer ometa sintezu funkcionalnog faktora VIII te sprječava pravilnu transkripciju i translaciju F8 gena (12).

Što se tiče hemofilije B i mutacija u F9 genu, *missense* mutacije odgovorne su za većinu slučajeva, uključujući i teže i lakše oblike bolesti. Udio nultih mutacija, koje uzrokuju potpuni nedostatak faktora IX, znatno je manji nego u F8 genu (12).



Slika 5. Profil genetskih varijanti u hemofiliji A i hemofiliji B, (Pavlova A et al, 2022., „Thieme Medical Publishers“ (12))

3.1. GRAĐA FAKTORA VIII

Faktor VIII je glikoprotein velike molekularne mase sastavljen od nekoliko domena: A1-A2-B-A3-C1-C2. Srednja domena B nije uključena u koagulacijsku aktivnost, te se njezinim uklanjanjem od strane trombina faktor VIII aktivira. Tijekom aktivacije, proteolitičkim cijepanjem nastaju „laki“ i „teški“ lanci. Teški lanci čine A1 i A2 domene, koje predstavljaju N-terminalni dio molekule. Laki lanac uključuje A3, C1 i C2 domene, što čini C-terminalni dio molekule. Laki lanac je ključan za interakciju s VWF-om i membranom trombocita, što štiti protein od razgradnje i pravilno ga usmjerava prema mjestu ozljede krvne žile (13).

3.2. POVEZANOST KRVNIH GRUPA I RIZIKA OD KRVARENJA

Krvne grupe AB0 sustava određene su genima smještenim na 9. kromosomu. Ovi geni kodiraju enzime koji dodaju specifične ugljikohidrate na površinu crvenih krvnih stanica. Svaka krvna grupa razlikuje se po vrsti dodatnih šećera na ugljikohidratnoj osnovi koji su prisutni na eritrocitima. Na primjer, kod osoba s krvnom grupom A, dodatni šećer je N-acetilgalaktozamin koji prenosi enzim N-acetil-galaktozil-transferaza. Ovaj

enzim je kodiran genima na 9. kromosomu. Osobe s krvnom grupom B imaju gen koji kodira galaktozil-transferazu, što rezultira prisustvom galaktoze na ugljikohidratnoj osnovici eritrocita. Kod osoba s krvnom grupom AB prisutna su oba šećera- N-acetilgalaktozamin i galaktoza. S druge strane, kod osoba s krvnom grupom 0, gen na 9. kromosomu ne kodira nijednu transferazu, što znači da na površini eritrocita nema dodatnih ugljikohidrata (14). Koagulacijski faktor VIII cirkulira u plazmi vezan za VWF, što doprinosi njegovoj stabilnosti. Međutim, kod osoba s krvnom grupom 0, koje nemaju dodatne šećere na svojoj ugljikohidratnoj osnovi, razine VWF-a su niže. To rezultira kraćim poluživotom faktora VIII. Utjecaj krvne grupe AB0 na razinu VWF-a primjetan je ne samo kod zdravih ispitanika, već i kod onih koji su nositelji hemofilije A (15). Osobe s krvnom grupom 0, koje imaju niže razine VWF-a i pate od hemofilije, mogu iskusiti dodatno pogoršanje simptoma bolesti. Smanjene razine VWF-a smanjuju učinkovitost stabilizacije faktora VIII, što može otežati kontrolu krvarenja. Stoga je važno prilagoditi terapijske pristupe, uključujući doze faktora VIII i korištenje specijaliziranih pripravaka, kako bi se poboljšala hemostaza i smanjio rizik od krvarenja (16).

4. SIMPTOMI HEMOFILIJE

Osobe s teškim oblikom hemofilije pate od dugotrajnih krvarenja u zglobove, mišiće i tkiva, često i bez očiglednog uzroka. Takva krvarenja mogu biti opasna po život. S druge strane, kod osoba s blažim oblikom hemofilije, obilna krvarenja se obično javljaju tek nakon teške traume (17).

Kontinuirano krvarenje kod pacijenata s hemofilijom može uzrokovati razvoj sinovitisa i osteohondralnih oštećenja, što posljedično doprinosi nastanku artropatije (18). Artropatija za pacijente s hemofilijom predstavlja značajan problem jer česta krvarenja uzrokuju upalu, bol i oštećenje hrskavice i kostiju unutar zglobova (19).

S druge strane, povećane razine faktora zgrušavanja povećavaju rizik od arterijske tromboze. U tom kontekstu, hipokoagulacija povezana s hemofilijom može pružiti zaštitu od kardiovaskularnih bolesti poput moždanog udara i duboke venske tromboze. Naime, nedostatak određenog koagulacijskog faktora može smanjiti stvaranje trombina, čime se smanjuje rizik od začepjenja krvnih žila (19). Stoga je smrtnost od kardiovaskularnih bolesti niža kod pacijenata s hemofilijom u usporedbi s ostatkom populacije, a tome pridonosi i njihov redovit medicinski nadzor i liječenje, što ih potiče na usvajanje zdravijih životnih navika poput redovite tjelovježbe i uravnotežene prehrane. Međutim, zbog artropatije koja može nastati uslijed učestalih krvarenja u zglobove, smanjuje se pokretljivost, što može rezultirati povećanom pojavom pretilosti i dijabetesa (19).

Neke studije pokazuju da je hipertenzija češća kod pacijenata s težim oblikom hemofilije. Jedan od mogućih uzroka hipertenzije je smanjena funkcija bubrega i povećana razina kreatinina. Krvarenje u bubrezima, koje je uobičajeno kod osoba s hemofilijom, može dovesti do renovaskularne hipertenzije i fibroze. Stoga je krvarenje u bubrezima jedan od mogućih razloga za razvoj hipertenzije kod ovih pacijenata (19).

4.1. HEMOFILNA ARTROPATIJA I SINOVITIS

Hemofilna artropatija je bolest zglobova uzrokovana čestim krvarenjem u zglobove (hemartroza), što može biti posljedica ozljeda ili se pojaviti spontano. Ponavljana krvarenja uzrokuju ireverzibilne promjene u zglobovima, što rezultira kroničnom boli, koja se često pogoršava tijekom ili nakon krvarenja (Slika 6). Uz bol, javlja se i ograničenje pokreta, atrofija mišića i osteoporoza. Deformacija zglobova nastaje uslijed proliferativnog sinovitisa koji uključuje upalu sinovijalne membrane, te degeneracije hrskavice i kosti, što u konačnici dovodi do funkcionalnih oštećenja zglobova (20).

Nakupljanje krvi u zglobnoj šupljini (hemartroza) uzrokuje proliferaciju sinoviocita, stanica koje igraju ključnu ulogu u održavanju zdravlja zglobova. Neki sinoviociti djeluju kao makrofagi, uklanjajući otpadne tvari i strane čestice iz zglobova. Drugi sinoviociti funkcioniraju kao fibroblasti, proizvodeći sinovijalnu tekućinu koja smanjuje trenje u zglobnoj hrskavici (18).

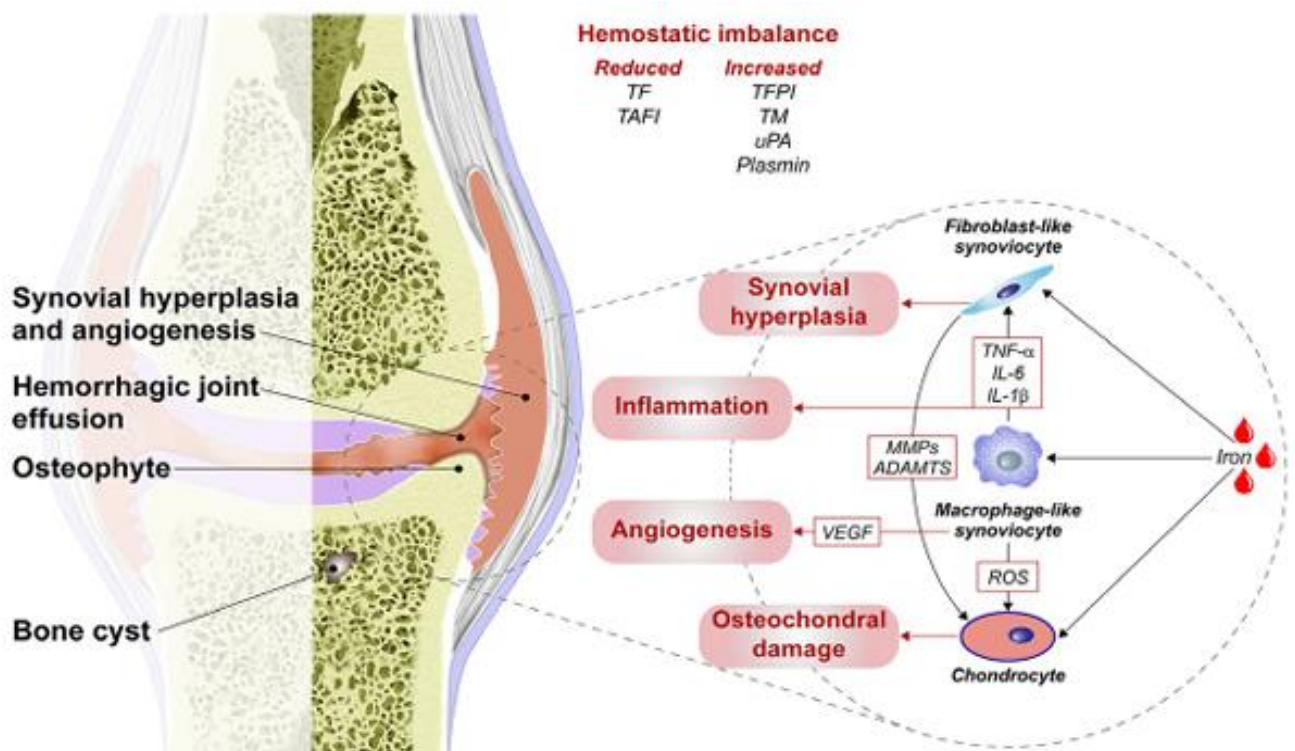
U normalnim zglobovima, nakon krvarenja, proteinski kompleks hemosiderin zadužen za skladištenje željeza, nakuplja se u sinoviocitima nalik makrofagima, a zatim se vraćaju u cirkulaciju. Kod osoba s hemofilijom, ti se kompleksi nakupljaju u stanicama, što, uz ponovljena krvarenja, dovodi do preopterećenja sinoviocita i hiperplazije sinovijalne membrane. Sinoviociti slični makrofagima također proizvode vaskularni endotelni faktor rasta (eng. vascular endothelial growth factor, VEGF), koji potiče angiogenezu. Na taj način dovodi do stvaranja novih krvnih žila, što povećava rizik od krvarenja u zglobovima i pogoršava hemofilnu artropatiju. Osim toga, makrofagi kod pacijenata s hemofilijom imaju smanjenu funkciju u odgovoru na M-CSF (eng. macrophage-colony stimulating factor), što rezultira sporijim zacjeljivanjem rana i regeneracijom tkiva, čineći ih sklonima hemartrozi (18).

Osim toga, sinoviociti nalik fibroblastima proizvode citokine poput IL-6, (interleukin-6); IL-1 β , (interleukin 1-beta); TNF- α , (eng. tumor necrosis

factor-alpha); koji dodatno potiču proliferaciju sinoviocita i stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (eng. reactive oxygen species, ROS). Ove reaktivne molekule induciraju apoptozu hondrocita, stanica koje tvore hrskavicu. Kao i sinoviociti nalik makrofagima, sinoviociti nalik fibroblastima također naglo proliferiraju uslijed nakupljanja željeza (18).

Hemokromatoza je bolest karakterizirana nakupljanjem željeza, koja također može dovesti do artropatije uslijed preopterećenja željezom. Međutim, simptomi su obično blaži u usporedbi s hemofilijom, jer se manifestiraju tek kasnije u životu, kada bolest napreduje. U slučaju hemofilije, krvarenje u zglobovima počinje već u djetinjstvu, pa se artropatija uočava puno ranije (18).

Osteohondralna oštećenja nastaju kada su hondrociti izloženi željezu i drugim produktima sinoviocita potaknutih upalom. Krv može postati toksična za hrskavicu već nakon dva dana zbog stvaranja hemosiderina, jednog od kompleksa koji skladište željezo u tijelu. U naprednim stadijima bolesti, osteohondralna oštećenja postaju izraženija zbog povećane proizvodnje proupalnih citokina i proteaza, što može dovesti do stvaranja subhondralnih cista (18).



Slika 6. Struktura zgloba s hemofilnom artropatijom, (*Gualtierotti R. et al, 2021., „Journal of Thrombosis and Haemostasis“ (18)*)

5. DIJAGNOSTICIRANJE HEMOFILIJE

Dijagnosticiranje hemofilije je složen i izazovan proces kako bi se pacijentima što prije pružila pomoć i spriječile teže epizode krvarenja (21). Kada se primijete simptomi krvarenja kod pacijenta, najprije se utvrđuje radi li se o urođenom ili stečenom poremećaju krvarenja. Na urođeni poremećaj može ukazivati spontano krvarenje koje se javlja bez ikakvog vidljivog uzroka. U takvim slučajevima, obiteljska anamneza najčešće je pozitivna. Tek onda se može započeti s laboratorijskim testovima probira kako bi se dijagnosticiralo o kojem se hemostatskom poremećaju radi (22).

5.1. TEST PROBIRA

Protrombinsko vrijeme (PT), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTT) su testovi probira koji se provode u laboratorijima kako bi se odredila vrsta koagulacijskog poremećaja. PT je vrijeme potrebno za zgrušavanje plazme pacijenta nakon dodavanja kalcija i tromboplastina. Kod pacijenata s nedostatkom vanjskih faktora zgrušavanja, PT je produljeno. APTT je vrijeme potrebno za zgrušavanje plazme pacijenta nakon dodavanja fosfolipida, aktivatora unutarnjeg puta i kalcija. Dakle, pacijenti s produljenim APTT-om imaju nedostatak faktora zgrušavanja u unutarnjem putu koagulacije, što je karakteristično za osobe koje pate od hemofilije (22). Kod blagih oblika hemofilije, gdje simptomi krvarenja nisu jako izraženi, liječnici mogu uspostaviti dijagnozu jedino ispitivanjem APTT-a (23).

5.2. LABORATORIJSKO ISPITIVANJE

PT reagensi koji se koriste u laboratorijima prilikom testiranja osjetljiviji su na nedostatak faktora VII, koji sudjeluje u vanjskom putu

zgrušavanja krvi, nego što su na taj faktor osjetljivi APTT reagensi. S druge strane, APTT reagensi su puno osjetljiviji na unutarnje faktore zgrušavanja poput faktora VIII i IX. Reagensi i instrumenti koji se koriste u ispitivanjima prisutnosti faktora zgrušavanja se mogu razlikovati od laboratorija do laboratorija te mogu ovisiti o proizvođaču. Zbog toga je uveden međunarodni normalizirani omjer (international normalized ratio, INR) kako bi se smanjila odstupanja u rezultatima među laboratorijima. INR uzima u obzir osjetljivost korištenog tromboplastina i vrijednost međunarodnog indeksa osjetljivosti dobivenog od proizvođača reagensa (22).

Nakon što obiteljska anamneza za hemofiliju pokaže pozitivan rezultat, nužno je ispitati je li APTT produljeno. Pacijentu se izvadi krv pomoću vakuumske epruvete koja sadrži puferirani natrijev citrat kao antikoagulans. Krv se mora centrifugirati, a zatim se mjeri APTT (23). Mjerenje se mora obaviti unutar četiri sata od vađenja krvi zbog toga što faktor VIII postaje nestabilan nakon duljeg vremena, što može dovesti do netočnih rezultata. Ovaj postupak se ponavlja dvaput kako bi se sa sigurnošću utvrdilo da je APTT zaista produljeno (22).

Kako bi se utvrdio uzrok produljenog APTT-a provodi se studija miješanja. Ovim testom se dijagnosticira nedostatak faktora koagulacije ili prisutnost inhibitora. Pomiješaju se pacijentova krvna plazma s normalnom prikupljenom plazmom u omjeru 1:1, a zatim se ponavlja test zgrušavanja. Moguća su dva ishoda ovog testiranja. Prvi je korekcija vremena zgrušavanja, što ukazuje na nedostatak jednog ili više faktora u unutarnjem ili vanjskom putu hemostaze. Drugi mogući ishod je inhibicija vremena zgrušavanja, što upućuje na prisutnost inhibitora koji utječu na rad jednog ili više faktora zgrušavanja, sprječavajući ih u obavljanju njihovih funkcija. Inhibitori mogu biti neki lijekovi poput heparina, koji izravno inhibiraju trombin, zatim inhibitori koji djeluju specifično na faktore zgrušavanja ili nespecifični inhibitori odnosno protutijela (22).

U slučajevima kada pacijenti imaju produljeni APTT koji se normalizira nakon studije miješanja i normalni PT, radi se o nedostatku nekog od faktora

zgrušavanja unutarnjeg puta, što ukazuje na to da pacijent boluje od hemofilije ili VWB-a, ovisno o tome koji faktor je u pitanju. Za procjenu aktivnosti koagulacijskih faktora koriste se specifični reagensi, supstrati i aktivatori koji se dodaju u plazmu te se mjeri brzina koagulacije. S druge strane, za mjerenje razine koagulacijskih faktora u plazmi koristi ELISA test. Ovaj test koristi specifična protutijela koja se vežu za faktor, omogućujući mjerenje njegove koncentracije (22). Klasifikacija hemofilije prema težini i ozbiljnosti temelji se prema razini aktivnosti faktora VIII i IX. Osobe s teškim oblikom ove bolesti imaju razinu faktora manju od 1% od normale. Umjereni oblik definiran je razinom faktora od 1 do 5%, dok se blagi oblik karakterizira razinom faktora većom od 5, a manjom od 40% (17).

Nakon što se dijagnosticira težina bolesti i ozbiljnost prisutnih krvarenja, posljednji korak je odrediti radi li se o urođenom ili stečenom poremećaju. Urođeni poremećaji se nasljeđuju poput hemofilije, dok se stečeni poremećaji koagulacije mogu pojaviti zbog nedostatka vitamina K ili bolesti jetre i nisu nasljedni. Ako su inhibitori uzrok produljenog APTT-a, najčešće se radi o stečenom poremećaju hemostatskog sustava. Međutim, kod nekih se pacijenata može razviti autoimuna hemofilija čiji je uzrok stečeni inhibitor faktora VIII ili faktora IX. Ovaj vrlo rijedak poremećaj teže je dijagnosticirati (22).

5.3. GENETSKO SEKVENCIRANJE

Genetske analize predstavljaju jedini pouzdan način za postavljanje točne i precizne dijagnoze hemofilije, što je jako važno za odabir odgovarajuće terapije za liječenje. Prilikom prvih analiza F8 gena, koja je imala za cilj otkriti varijantu gena odgovornu za težak koagulacijski poremećaj hemofiliju, korištena je denaturirajuća gel elektroforeza. Međutim, tom metodom nije utvrđen uzrok poremećaja. Tek kasnije je ustanovljeno da je inverzija u 22. intronu glavni molekularni uzrok u polovici slučajeva teških oblika hemofilije (12).

Na početku primjene genetskih analiza, cilj je bio identificirati genetskog nositelja hemofilije unutar obitelji, pri čemu su se koristile tehnike poput Southern blottinga i PCR testova. Danas se primjenjuje tehnologija Next-Generation Sequencing (NGS) koja omogućava izravnu karakterizaciju genetske varijacije odgovorne za poremećaj. Ova metoda započinje umnožavanjem gena od interesa, kao što su F8 ili F9, pomoću PCR-a. Nakon toga gen se sekvencira i uspoređuje s odgovarajućom sekvencom ljudskog genoma zdrave osobe. Ova metoda omogućava analizu više gena istovremeno, što štedi vrijeme i resurse. Iako NGS tehnika nudi brojne prednosti, ima i svoje mane, poput nemogućnosti otkrivanja nekih velikih mutacija koje obuhvaćaju više egzona. Unatoč tome, NGS omogućuje preciznu analizu F8 i F9 gena, čime se identificiraju točne mutacije odgovorne za poremećaj. Osim toga, NGS predstavlja temelj za razvoj naprednijih molekularnih metoda koje će omogućiti dublje razumijevanje povezanosti genotipa i fenotipa, što će osigurati učinkovitiju njegu za pacijente (12).

5.4. PRENATALNA DIJAGNOSTIKA

Prenatalna dijagnostika omogućuje roditeljima da se unaprijed pripreme na mogućnost da njihovo dijete ima hemofiliju. Na taj način mogu na vrijeme biti upoznati s potencijalnim opasnostima i spremniji za odgovarajuću skrb o djetetu. Osim toga, saznanje o djetetovoj dijagnozi pruža pogodnosti u vezi s planiranjem poroda. Primjerice, unaprijed se može znati da bi trebalo izbjegavati uporabu vakuumom potpomognute ekstrakcije tijekom poroda, kako bi se smanjio rizik od mogućih komplikacija. Prenatalna dijagnoza najčešće se preporučuje obiteljima koje imaju poznatu obiteljsku anamnezu teškog oblika hemofilije. S druge strane testiranje se rijetko indicira u obiteljima s blažim fenotipom. U nekim slučajevima, dijagnoza može biti toliko teška da roditelji odluče prekinuti trudnoću, a na tu odluku često utječu vjerska uvjerenja obitelji. Također,

kod žena može postojati strah od postupka prenatalne dijagnostike zbog rizika povezanih s dijagnosticiranjem, kao i strah od rezultata analize (12).

Prenatalna dijagnoza obično se provodi između 11. i 14. tjedna trudnoće putem biopsije korionskih resica. Prije nego se majke odluče na ovaj pregled, važno je da budu dobro upoznate s mogućom posljedicom spontanog pobačaja koji se može dogoditi. U posljednje vrijeme provode se testiranja s ciljem pružanja psihološke podrške roditeljima nakon dobivenih rezultata, a ne isključivo kao pomoć pri odluci o prekidu trudnoće u slučaju teškog oblika hemofilije. Osim biopsije korionskih resica, koja se koristi za ispitivanje određenih bolesti kod fetusa, sve veću važnost ima i preimplantacijska genetska dijagnostika (PGD). Cilj te metode je probir embrija te odabir onih koji nisu nositelji genetskih bolesti, uključujući hemofiliju. Podrazumijeva se da PGD metoda uključuje *in vitro* oplodnju kako bi se odabrani embriji implantirali u maternicu (12).

6. LIJEČENJE HEMOFILIJE

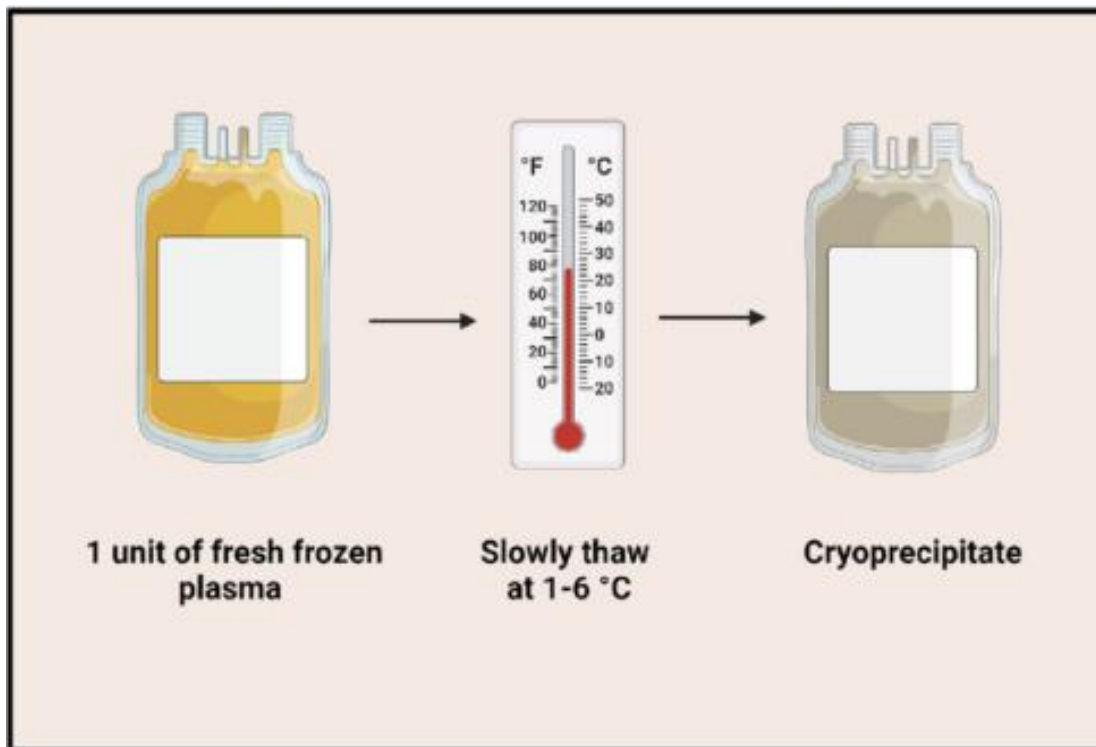
Liječenje hemofilije značajno je napredovalo tijekom godina. U prošlosti se terapija uglavnom temeljila na nadomještanju nedostajućih koagulacijskih faktora VIII ili IX putem koncentrata faktora. Iako je ovaj pristup omogućio kontrolu krvarenja, imao je mnoge nedostatke, uključujući rizik od prijenosa infekcija poput HIV-a (Human immunodeficiency virus) i hepatitisa te kratko trajanje terapijskog učinka, što je zahtijevalo česte infuzije. Razvojem rekombinantnih tehnologija poboljšana je sigurnost terapije, no izazov čestih infuzija ostao je prisutan. Ovaj se jaz u liječenju sada može premostiti primjenom genske terapije i produljenim poluživotom faktora, čime se omogućuje dugotrajna kontrola krvarenja.

6.1. KRIOPRECIPITAT

Prvi koncentrat faktora VIII razvijeni su četrdesetih godina prošlog stoljeća, zahvaljujući Edwinu Cohnu koji je prvi frakcionirao krvnu plazmu. Frakcioniranje je omogućilo izdvajanje fibrinogena, faktora VIII i VWF. U početku su se frakcije koristile samo u razvijenim zemljama. Kasnije je postala dostupna komercijalna verzija koncentrata fibrinogena, iznimno obogaćena faktorom VIII u koncentraciji sedam puta većoj nego u normalnoj krvnoj plazmi. Prije toga, za liječenje su se koristile plazme iz pune krvi, ali njihova učinkovitost je bila ograničena zbog volumenskih restrikcija koje su smanjivale količinu infundirane plazme (24).

Početak šezdesetih godina Judith Graham Pool i Jean Robinson radili su na proizvodnji boljeg koncentrata faktora VIII. Koristili su zamrznutu plazmu koju su polako odmrzavali kako bi identificirali faktor VIII. Utvrdili su da je koncentracija faktora VIII veća u neodmrznutom dijelu, jer se njegova aktivnost smanjuje pri višim temperaturama. Pool je tada došla na ideju da se prilikom odmrzavanja plazme izdvoji krioprecipitat, koji se zatim pohranjuje u vrećice i zamrzava. Ova metoda omogućila je davanje većih količina krioprecipitata pacijentima odjednom, što nije bilo moguće s običnom plazmom. Ova jednostavna i jeftina metoda brzo je prihvaćena širom svijeta, pružajući značajne koristi pacijentima s hemostatskim

poremećajima zbog nedostatka faktora zgrušavanja. Međutim, metoda ima i svoje nedostatke. Transport krioprecipitata zahtijeva održavanje smrznutog stanja što otežava distribuciju. Također, postoji rizik od prijenosa virusnih infekcija putem krvi, što je dodatni problem u primjeni ove terapije (24).



Slika 7. Dobivanje krioprecipitata iz krvne plazme, (Espanol, M.G. et al, 2023., „Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis“ (25))

6.2. METODE INAKTIVACIJE ILI IZOLIRANJA VIRUSA IZ KONCENTRATA

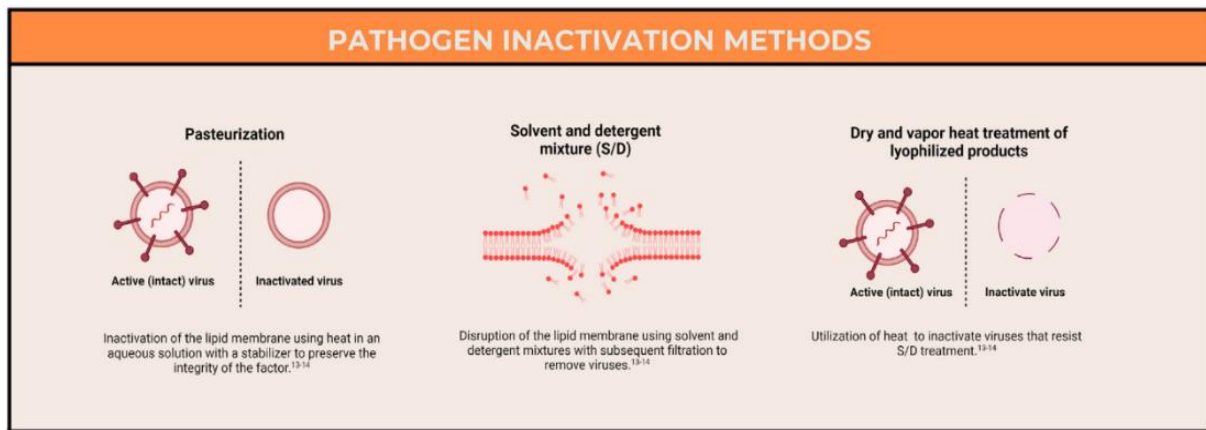
Sedamdesetih godina prošlog stoljeća, glavni cilj u napretku terapije za liječenje hemofilije bio je sprječavanje prijenosa virusa na primatelje krvne plazme, s naglaskom na HIV i hepatitis C. U svrhu smanjenja rizika od infekcije, bilo je ključno provoditi rigorozan probir davatelja plazme, ali i inaktivirati viruse tijekom proizvodnog procesa (26).

Jedna od metoda uklanjanja virusa bila je inaktivacija procesom pasterizacije. Ovaj postupak uključuje zagrijavanje proteina plazme u vodenoj otopini na visokim temperaturama tijekom deset sati. Kako su koagulacijski faktori izuzetno osjetljivi na toplinu, potrebno ih je zaštititi stabilizatorima, najčešće šećerima, kako bi se očuvao njihov integritet. Istovremeno, pasterizacijom se inaktiviraju virusi, uključujući one s lipidnom membranom, kao i virusi bez ovojnice. Ovaj postupak učinkovito uništava širok raspon virusa, među kojima su HIV, HAV (Hepatitis A virus), BVDV (Bovine viral diarrhea virus), PRV (Pseudorabies virus) i WNV (West Nile virus) (26).

Drugi način inaktivacije virusa je tretmanom s mješavinom organskog otapala (S) i anionskog deterdženta (D), poznat kao S/D, (solvent/detergent) tretman. Ova metoda sprječava virus da se veže za stanicu i time izazove infekciju. Kako bi se uklonili virusi zarobljeni u česticama, koji su na taj način zaštićeni od djelovanja S/D tretmana, otopine proizvoda moraju se dodatno filtrirati. Temperatura procesa, koncentracija proteina te pH vrijednost ne utječu na učinkovitost inaktivacije virusa. Međutim, koncentracija otopine S/D mješavine je ključna; ako je ispod specificirane vrijednosti, tretman može biti neučinkovit. Nadalje, primijećeno je da neki pacijenti s hemofilijom koji su primali koncentrate faktora VIII tretirane S/D metodom i dalje razvijaju HAV infekcije, što ukazuje na potrebu za daljnjim razvojem ove terapije (26).

Za liofilizirane proizvode koji su otporni na S/D tretman, koristi se metoda suhog zagrijavanja kako bi se inaktivirali virusi. Tijekom ovog procesa, liofilizirani proizvodi moraju imati nisku razinu vlage, jer vlaga može negativno utjecati na stabilnost proizvoda. Suho zagrijavanje liofiliziranog faktora VIII na 80°C tijekom 72 sata inaktivira širok spektar virusa, uključujući HAV, HBV (Hepatitis B virus) i HIV, dok koagulacijski faktor zadržava visoku razinu aktivnosti, što je velika prednost ove metode. Međutim, unatoč ovim prednostima, kod pacijenata koji su primali liofilizirane proizvode tretirane suhim zagrijavanjem ponekad se pojavljuju

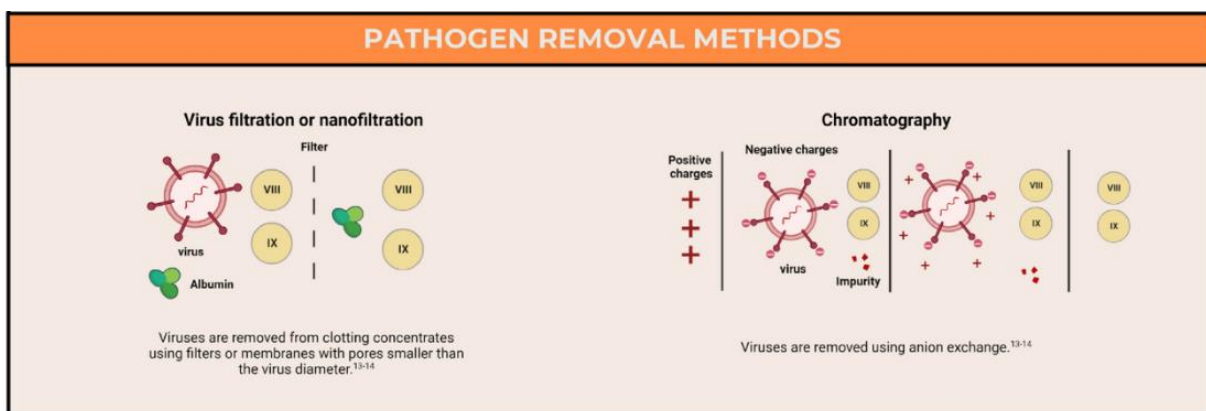
simptomi virusnih infekcija. To se događa jer liofilizacija ne samo da stabilizira koagulacijske faktore, već i viruse. Jedan od načina da se smanji ovaj rizik je dodavanje vodene pare liofiliziranim proizvodima prije suhog zagrijavanja. Ovaj dodatni tretman povezan je s nižim rizikom od virusne infekcije (26).



Slika 8. Metode inaktivacije virusa, (Espanol, M.G. et al, 2023., „Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis" (25))

Osim metoda inaktivacije virusa, postoji i mogućnost uklanjanja virusa iz koncentrata faktora zgrušavanja putem filtracije. Ova metoda koristi filtre s porama manjim od promjera virusa, omogućujući njihovo fizičko uklanjanje iz otopine. Iako je filtracija učinkovita u uklanjanju virusa s ovojnicom i bez ovojnice, poput HIV-a, BVDV-a, PRV-a, HAV-a i drugih, ona ima i svoje nedostatke. Glavni problem ove metode je njezina ograničena primjenjivost na proteine koji su približno iste veličine kao i virusi ili čak veći. U tim slučajevima, filtracija može biti neizvediva ili može dovesti do značajnih gubitaka ciljanih proteina. Na primjer, kod filtracije koncentrata faktora VIII virusi se uspješno uklanjaju, ali kod filtracije VWF-a, osim virusa, gubi se i dio samog faktora, što može smanjiti učinkovitost terapije (26).

Osim filtracije, koja fizički uklanja viruse iz proizvoda, postoji i metoda frakcioniranja, poput kromatografije, koja doprinosi čišći proizvoda smanjujući ukupni broj virusa u derivatima plazme. Taloženje etanolom je najrasprostranjenija metoda frakcioniranja plazme, ali ima jedan značajan nedostatak: može denaturirati željene proteine iz koncentrata koagulacijskih faktora. Zbog toga se koncentrat faktora zgrušavanja pročišćavaju putem kromatografskih metoda. Na primjer, pročišćavanje koncentrata faktora IX može se provesti pomoću afinitetne kromatografije s metalnim kelatom. U ovom postupku pozitivno nabijeni metali vežu se s negativno nabijenim dijelovima virusa, i obrnuto, čime se virus odvoji od koagulacijskih faktora. Na sličan način, umjesto metalnih kelata, ponekad se koriste monoklona antitijela za izolaciju virusa. Ova metoda omogućuje uspješno uklanjanje virusa iz proizvoda, uz očuvanje učinkovitosti koncentrata koagulacijskih faktora (26).



Slika 9. Metode izoliranja virusa, (Espanol, M.G. et al, 2023., „Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis" (25))

6.4. PROIZVODNJA NOVIH KONCENTRATA PUTEM DNA REKOMBINANTNE TEHNOLOGIJE

1984. godine je prvi put kloniran gen za faktor VIII što je omogućilo proizvodnju ovog proteina korištenjem rekombinantne DNA tehnologije.

Ubrzo nakon toga proizvela se prva generacija koncentrata faktora VIII izrađena u stanicama jajnika kineskog hrčka (eng. chinese hamster ovary cells, CHO), koje su bile transficirane ljudskom cDNA koja kodira koagulacijski faktor VIII. Taj proces odvijao se u mediju koji je sadržavao humani albumin. U drugoj generaciji ovih proizvoda, albumin je uklonjen iz medija kulture kako bi se poboljšala čistoća proizvoda. U trećoj generaciji albumin je potpuno eliminiran, a neposredno prije liofilizacije dodan je neproteinski stabilizator. Nedugo nakon razvoja koncentrata rekombinantnog faktora VIII, razvijen je i rekombinantni faktor IX (27).

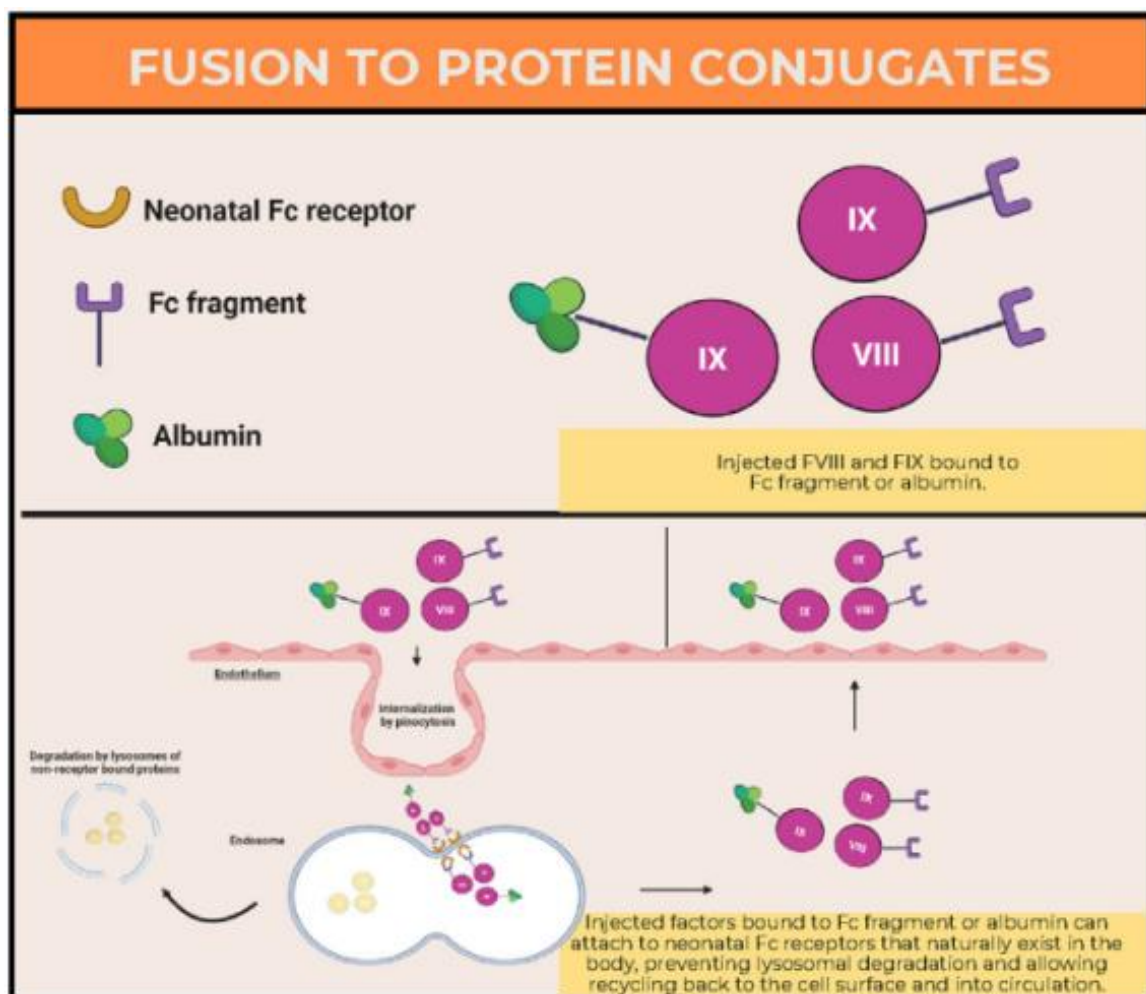
Rekombinantni faktori se injiciraju intravenozno, izravno u krvotok, gdje ostaju aktivni otprilike osam do dvanaest sati. S obzirom na relativno kratak poluživot ovih proteina, pacijenti moraju primati injekcije tri do četiri puta tjedno kako bi se održala odgovarajuća razina faktora u krvi i spriječile epizode krvarenja. Ovaj izazov u održavanju optimalne razine faktora u krvi istaknuo je potrebu za razvojem novih terapijskih pristupa, uključujući rekombinantne faktore s produljenim poluživotom (27).

Također, ubrzo nakon primjene rekombinantnih faktora dio bolesnika je počeo razvijati inhibitore koji su ometali učinkovitost infundiranih proizvoda (27). Ovi inhibitori su IgG neutralizirajuća protutijela koja sprječavaju da primljeni rekombinantni faktori učinkovito obavljaju svoju funkciju liječenja (25). Protutijela mogu aktivirati komplement, a ponekad čak izazvati teške anafilaktičke reakcije (27).

6.5. PRODULJENI POLUŽIVOT KONCENTRATA

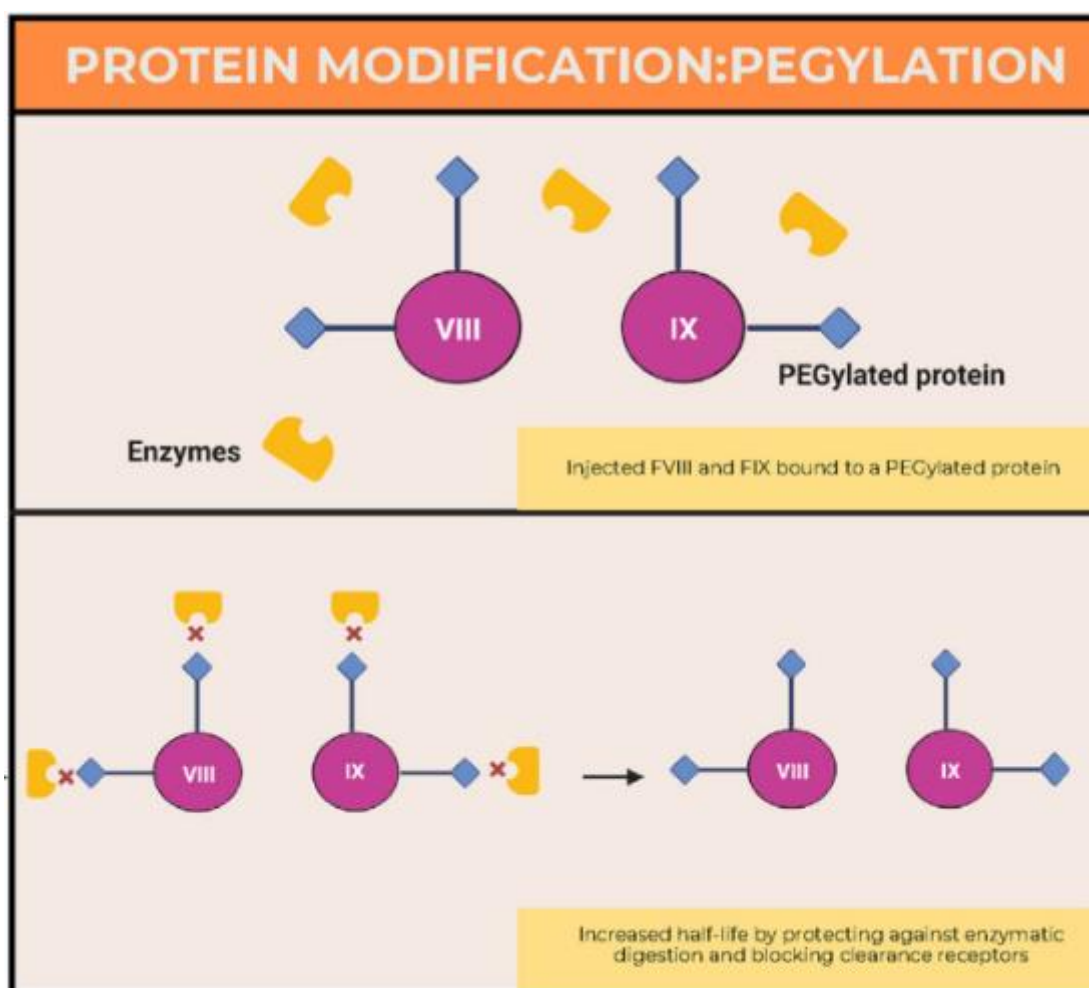
Jedan od pristupa dobivanja koncentrata s produljenim poluživotom uključuje spajanje proteinskih konjugata s albuminom ili Fc fragmentom protutijela. Rekombinantno proizvedena molekula faktora VIII kovalentno se veže s Fc domenom IgG protutijela, čime se postiže produljenje poluživota ovog faktora zgrušavanja. Rezultat je smanjenje potrebe za učestalim doziranjem. Takav proizvod pokazuje visoku učinkovitost, s

niskim stopama krvarenja kod pacijenata, a također je i manja učestalost razvoja inhibitora u usporedbi s koncentratima dobivenim ranijom rekombinantnom tehnologijom. Imunoglobulin G i albumin su proteini koji se mogu unutarstanično reciklirati uz pomoć neonatalnog Fc receptora (FcRn), jer ovaj receptor sprječava njihovu razgradnju u lizosomima. Kad se koagulacijski faktori spoje s Fc proteinom ili albuminom i internaliziraju u stanicu, vežu se na FcRn receptor u endosomu, čime su zaštićeni od lizosomske razgradnje. Ovim postupkom, koagulacijski faktori postižu produljeni poluživot u organizmu (28).



Slika 10. Spajanje proteinskih konjugata s Fc fragmentom, (Espanol, M.G. et al, 2023., „Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis“ (22))

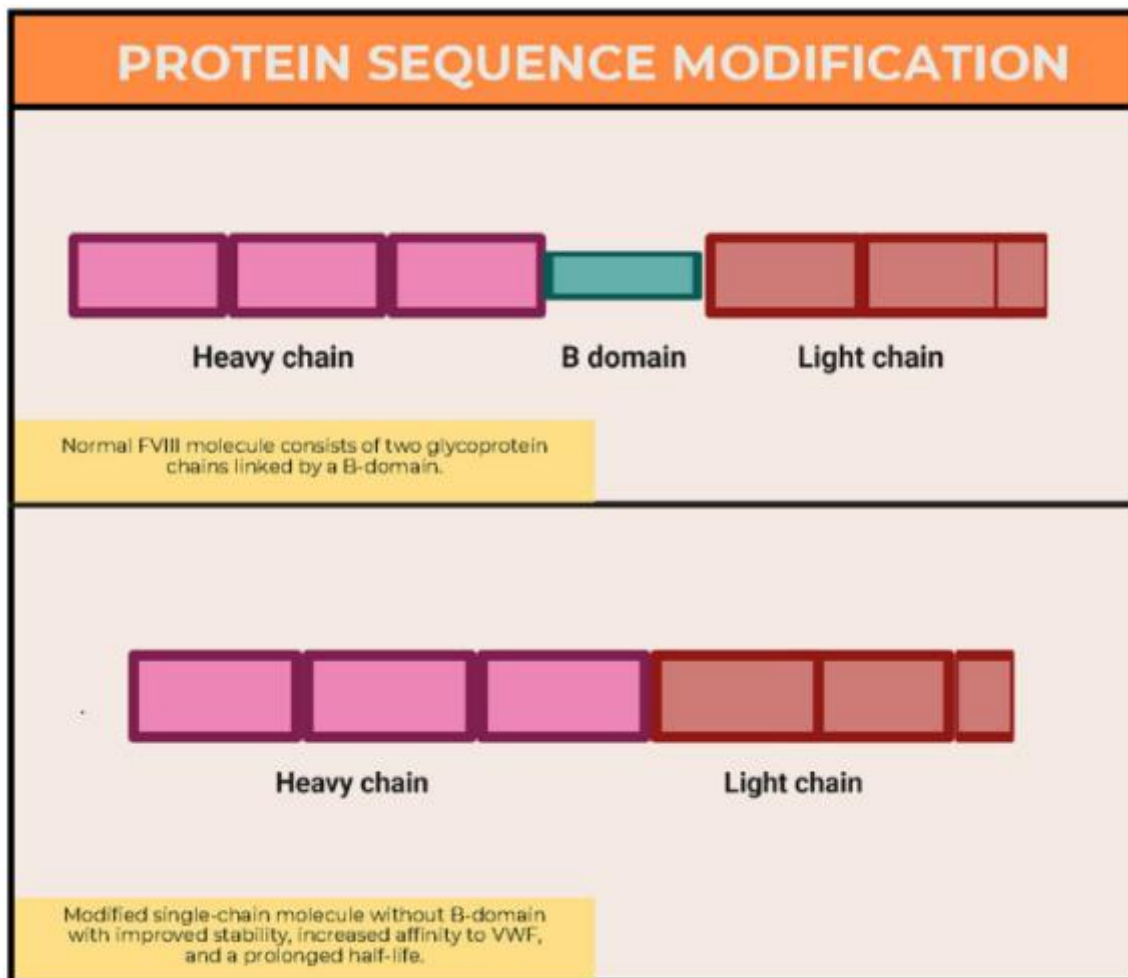
Drugi način produljenja poluživota koncentrata faktora VIII je modifikacija proteina metodom PEGilacije. U ovom postupku, biološka molekula, u ovom slučaju faktor zgrušavanja, modificira se kovalentnom konjugacijom s polietilen glikolom (PEG), čime se mijenjaju njena fizikalna i kemijska svojstva. Rezultat toga je poboljšana farmakokinetika lijeka, bolja topljivost te smanjena imunogenost. Time se smanjuje rizik razvoja inhibitora kod pacijenata. Također, povećava se stabilnost koagulacijskih faktora, što omogućava dulje zadržavanje u krvi i smanjuje učestalosti doziranja. PEGilirani faktori VIII razlikuju se prema mjestima PEGilacije i duljini molekule faktora VIII. Primjer takvog proizvoda je BAX855, nemodificirani rekombinantni faktor VIII sintetiziran iz CHO stanica i modificiran PEGilacijom. Ovaj proizvod se pokazao sigurnim i učinkovitim u postizanju hemostaze kod bolesnika s teškom hemofilijom A (29).



Slika 11. Modifikacija proteina metodom PEGilacije, (*Espanol, M.G. et al, 2023., „Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis“ (22)*)

Faktore zgrušavanja moguće je modificirati i na druge načine, čime se također može utjecati na produljenje njihovog poluživota. „Laki“ i „teški“ lanci faktora VIII međusobno su povezani nekovalentnim interakcijama u takozvanoj B domeni. Međutim, kako bi rekombinantni proizvod bio stabilniji i imao povećani afinitet prema VWF-u, dvolančana molekula faktora VIII može se skratiti i postati jednolančana uklanjanjem B domene.

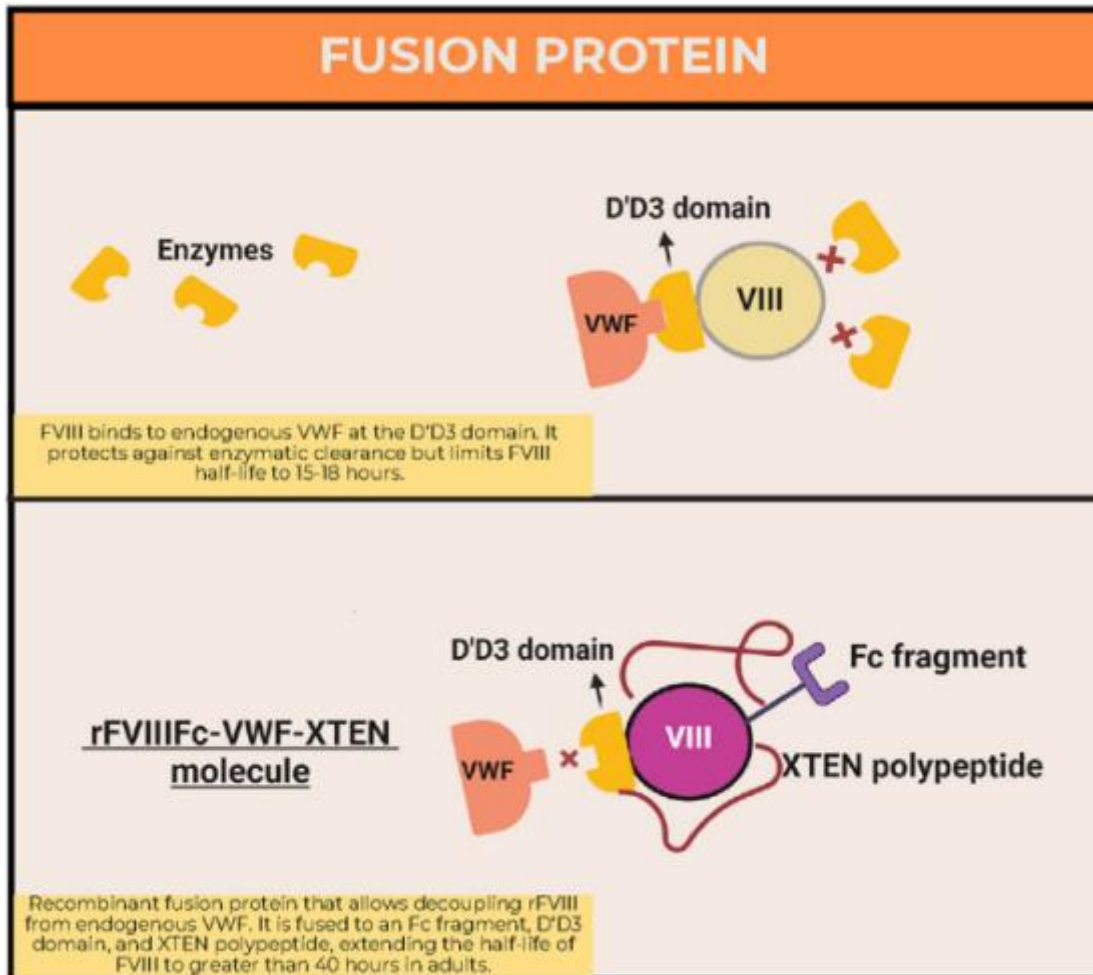
Veći afinitet prema VWF-u poboljšava farmakokinetička svojstva faktora VIII, produljujući njegov poluživot (28).



Slika 12. Uklanjanje B domene iz FVIII, (Espanol, M.G. et al, 2023., „Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis“ (22))

Osim što VWF sudjeluje u stabilizaciji faktora VIII, on također ograničava poluživot tog faktora. Ovo otvara mogućnost produljenja poluživota rekombinantnog faktora VIII odvajanjem od VWF-a. Molekula koja je razvijena s ovim ciljem zove se rFVIII-Fc-VWF-XTEN i ima poboljšana farmakokinetička svojstva zahvaljujući odvajanju od VWF-a (Slika 13). U ovoj molekuli, D'D3 domena je povezana s rFVIII pomoću Fc domene imunoglobulina G i Extended Terminal Elongation of Natural proteins“ (XTEN). D'D3 domena je dio strukturne modifikacije faktora VIII koja se koristi u terapijskim pripravcima za povećanje stabilnosti proteina i

poboljšane njegove interakcije s trombocitima i VWF-om. XTEN je sintetički polipeptid koji može poboljšati farmakokinetiku faktora VIII, produljujući njegov poluživot u cirkulaciji čak tri do četiri puta uz očuvanje hemostatske funkcije (30).



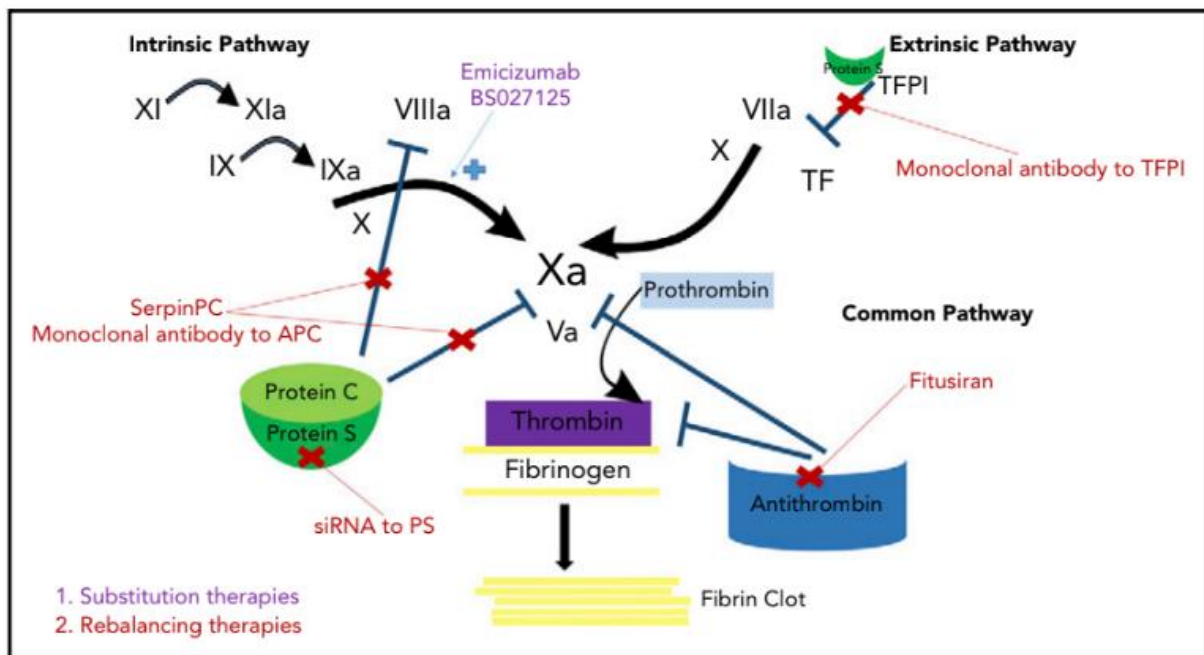
Slika 13. Blokiranje veze između VWF i FVIII, (Espanol, M.G. et al, 2023., „Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis“ (22))

6.6. EMICIZUMAB

Razvoj emicizumaba proširio je mogućnosti liječenja hemofilije A, kako za pacijente koji nisu razvili inhibitore, tako i za one kod kojih su se inhibitori pojavili. Emicizumab je bispecifično protutijelo koje se jednom domenom veže na aktivirani faktor IX (FIXa), a drugom za faktor X u hemostatskoj kaskadi, omogućujući tako zgrušavanje krvi. Na taj način,

emicizumab djeluje kao zamjena za faktor VIII kod pacijenata kojima ovaj faktor nedostaje (31).

Međutim, za razliku od faktora VIII, emicizumab djeluje na potpuno drugačiji način, jer ne podliježe mehanizmima aktivacije i inaktivacije koji reguliraju aktivnost koagulacijskih faktora. Njegov poluživot je znatno dulji u usporedbi s faktorima zgrušavanja, što omogućuje rjeđe doziranje terapije. Primjenom emicizumaba značajno se skraćuje APTT. Učinak lijeka na pacijentove testove koagulacije može biti prisutan mjesecima nakon prestanka terapije, što potvrđuje njegov izuzetno produljeni poluživot (30). Profilaksa emicizumabom primjenjuje se subkutano jednom tjedno, što značajno smanjuje stope krvarenja kod pacijenata, daleko više nego nadomjesna terapija faktorom koji nedostaje (32).



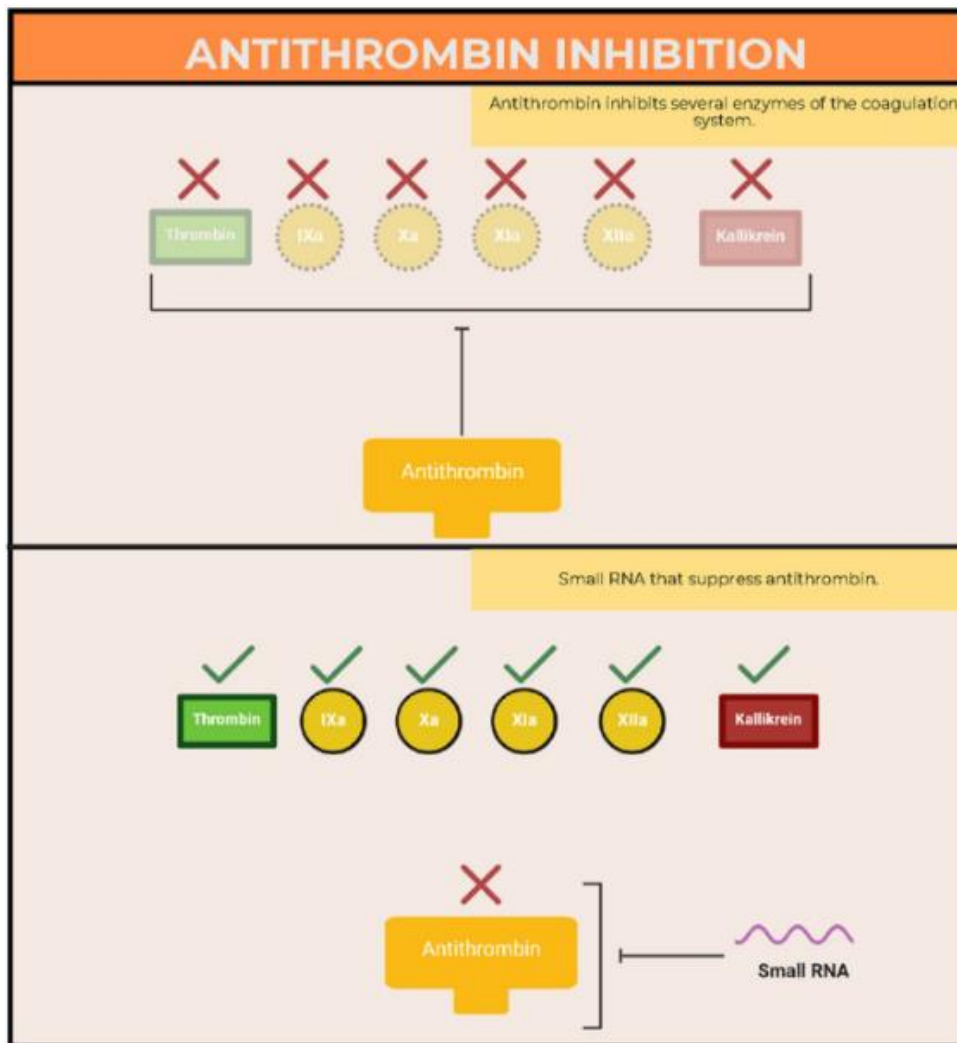
Slika 14. Mehanizam djelovanja emicizumaba, supstitucijska terapija za faktor VIII i rebalancing terapije; mala interferirajuća RNA koja remeti prirodu antikoagulansa, (Angela C. et al, 2019., Blood (33))

6.7. OSTALE TERAPIJE KOJE NE UKLJUČUJU FAKTOR

6.7.1. FITUSIRAN

Uz emicizumab postoje i druge terapije koje ne uključuju korištenje faktora koji nedostaje, a mogu doprinijeti liječenju hemofilije. Jedna od njih je fitusiran, koji djeluje kao inhibitor antitrombina. Antitrombin suprimira određene koagulacijske faktore u hemostatskoj kaskadi, čime sprječava zgrušavanje krvi. Korištenjem male interferirajuće RNA, povezane s N-acetilgalaktozaminom, moguće je smanjiti razinu antitrombina u krvnoj plazmi (Slika 14), što poboljšava stvaranje trombina i ublažava teške simptome krvarenja. N-acetilgalaktozamin omogućuje ciljanu dostavu fitusirana do hepatocita u jetri, što je ključno jer se antitrombin, primarna meta fitusirana, sintetizira upravo u jetri. Smanjenjem sinteze antitrombina, fitusiran može poboljšati hemostazu kod pacijenata s hemofilijom (34).

Fitusiran se primjenjuje subkutano, slično kao i emicizumab, ali bi njegova primjena trebala biti češća kako bi se postigla učinkovitost. Velika prednost ove terapije je mogućnost trajnog smanjenja razine antitrombina, čime se obnavlja hemostaza povećanjem potencijala za stvaranje trombina (34).

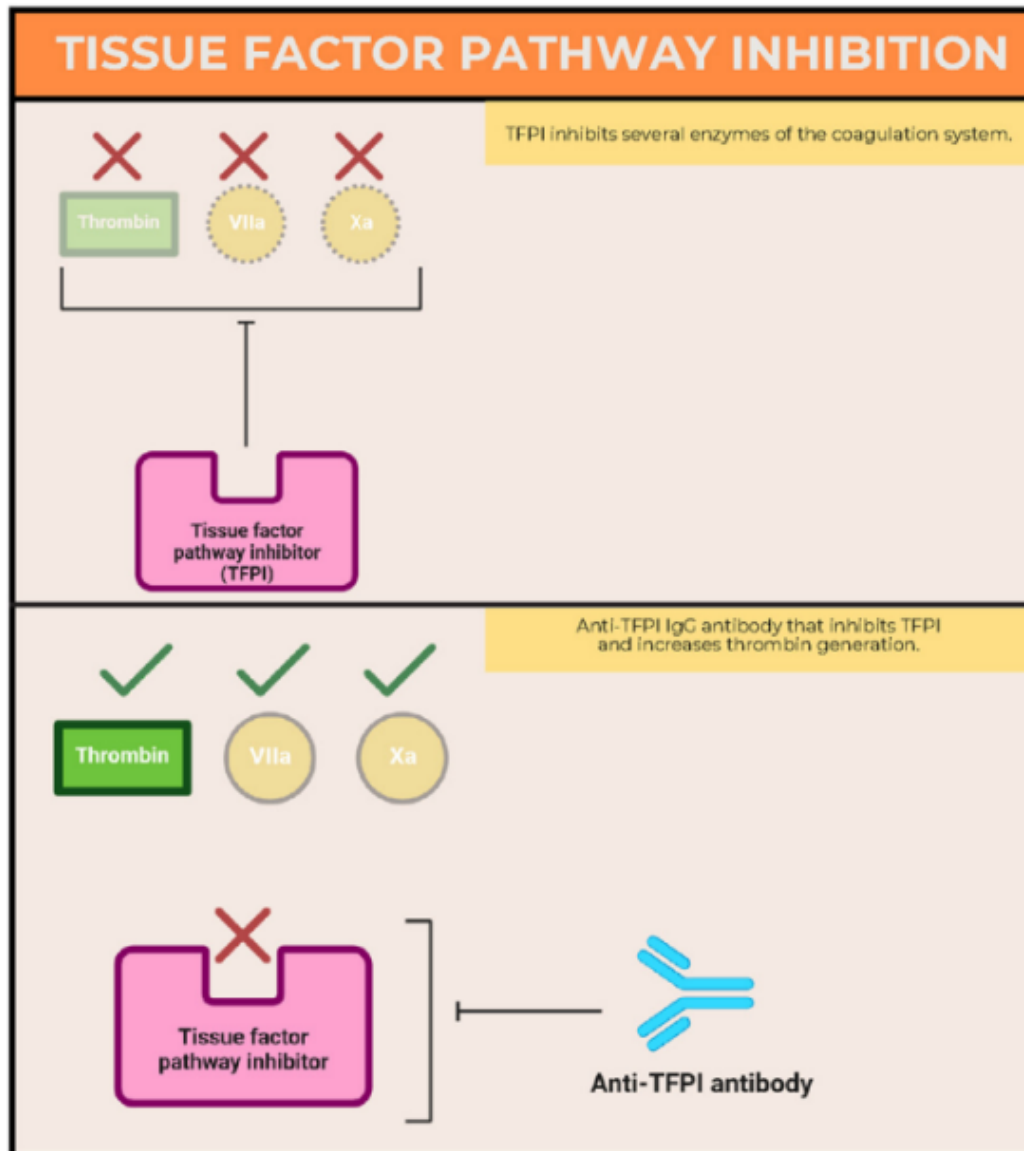


Slika 14. Inhibicija antitrombina, (Espanol, M.G. et al, 2023., „Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis“ (22))

6.7.2. KONCIZUMAB

TFPI (eng. tissue factor pathway inhibitor; inhibitor puta tkivnog faktora) inaktivira protrombin te aktivirane oblike faktora VII i X, sprječavajući tako početak hemostaze. TFPI se veže na faktor VIIa preko svoje K1 domene, dok se K2 domenom veže na Xa. Korištenjem specifičnih monoklonalnih humaniziranih protutijela koja se vežu za TFPI, moguće je blokirati njegovo djelovanje (Slika 15.). Ova terapija rezultira povećanom tvorbom ugruška i smanjenjem krvarenja kod hemofilije. Ovaj način liječenja predstavlja alternativni put za terapiju hemofilije A ili B. Poput

drugih terapija koje ne koriste faktore za liječenje hemofilije, takvo protutijelo na TFPI, koncizumab, primjenjuje se subkutano i značajno pomaže u smanjenju epizoda krvarenja (34).



Slika 15. Inhibicija TFPI protutijelom (koncizumab) (Espanol, M.G. et al, 2023., „Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis" (22))

6.8. GENSKA TERAPIJA

Genska terapija može se koristiti za liječenje hemofilije, budući da je hemofilija monogenetska bolest uzrokovana nedostatkom gena koji kodira

ekspresiju koagulacijskog faktora VIII ili IX. Čak i blagi porast razine tih faktora u plazmi može značajno poboljšati fenotip pacijenta, smanjujući učestalost krvarenja (35).

Prvi pokušaj genske terapije temeljene na adenovirusnom vektoru (AAV) u liječenju hemofilije B proveden je 2006. godine, kada je vektor prenesen u jetru kako bi se postigla privremena ekspresija faktora IX. Ovaj tip terapije rezultirao je smanjenjem krvarenja bez štetnih učinaka na jetru, poput razvoja hepatocelularnog karcinoma (HCC). Pacijenti koji su primili ovu terapiju intravenozno pokazali su dugotrajno stabilnu ekspresiju nedostajućeg faktora IX (35).

Što se tiče hemofilije A, prva intravenozna primjena genske terapije koja se temelji na AAV u jetri isprobana je 2017. godine. Zbog velike veličine faktora VIII, koji je prevelik za pakiranje u AAV, razvoj genske terapije za hemofiliju A bio je otežan. Međutim, nakon uklanjanja B domene, koja povezuje laki i teški lanac faktora VIII, terapija je uspješno isprobana iste godine (35).

Vektor baziran na adenovirusu koji sadrži komplementarnu DNA molekulu koagulacijskog faktora VIII (Valoctocogene roxaparvovec, dostupan pod imenom Roctavian kompanije BioMarin Pharmaceutical) ili komplementarnu DNA molekulu koagulacijskog faktora IX (Etranacogene dezaparvovec, dostupan pod imenom Hemgenix) prenosi se do jetre, gdje ih pokreće promotor koji kodira stvaranje faktora koji nedostaje (35).

Iako genska terapija za hemofiliju A može smanjiti epizode krvarenja, razina ekspresije faktora VIII znatno opada nakon nekoliko mjeseci, što ovu terapiju čini manje dugotrajnim rješenjem. Moguće je da su pacijenti već bili izloženi AAV-u i razvili neutralizirajuća protutijela protiv njega, što smanjuje učinkovitost terapije. Osim toga, citotoksični T limfociti mogu uništiti hepatocite koji proizvode koagulacijski faktor. Kako bi se spriječilo odbacivanje AAV vektora i produžio terapijski učinak, pacijentima se ponekad primjenjuju imunosupresivi (35).

Također, u nekim slučajevima zabilježene su nuspojave ove terapije, uključujući vrućicu, hipotenziju i povišene razine alanin transaminaze u jetri (35). Osim toga, razine koagulacijskih faktora s vremenom opadaju, a genska terapija je izrazito skupa, s cijenom koja se kreće od dva do tri milijuna dolara po terapiji. Ova terapija također nije primjenjiva za djecu, a postoji značajna varijacija u odgovorima među pacijentima (22).

Genska terapija predstavlja značajan napredak u liječenju hemofilije, nudeći potencijal za dugoročno rješenje ove bolesti. Iako su terapije u fazi kliničkih ispitivanja, što zahtijeva daljnja istraživanja, već su u nekim razvijenim zemljama dostupni terapijski preparati temeljeni na genskoj terapiji za liječenje hemofilije B (36).

8. ZAKLJUČAK

Hemofilija je genetski poremećaj koagulacije krvi uzrokovan nedostatkom faktora VIII (hemofilija A) ili faktora IX (hemofilija B). Bolest se prenosi recesivno putem X kromosoma i najčešće pogađa muškarce. Mutacije u genima F8 ili F9 dovode do nedovoljne proizvodnje ili disfunkcije koagulacijskih faktora. Posljedice toga su hemartroza i artropatija koje uzrokuju dugotrajnu bol i oštećenje zglobova.

Liječenje hemofilije je tijekom godina prošlo značajnu evoluciju, s brojnim inovacijama koje su poboljšale kvalitetu života pacijenata. Krioprecipitat, jedna od prvih terapija, omogućio je nadomještanje faktora VIII i IX, no ova metoda nosila je veliki rizik od prijenosa infekcija i zahtijevala česte transfuzije. Razvojem rekombinantnih faktora, rizik od infekcija je smanjen, ali kratak poluživot faktora u cirkulaciji i potreba za čestim injekcijama i dalje su predstavljali izazov u liječenju hemofilije. S napretkom tehnologije, pojavili su se faktori s produljenim poluživotom, koji su omogućili rjeđe infekcije i značajno poboljšali kvalitetu života pacijenata. Ipak, potreba za redovitim primjenama i dalje je postojala. Novije terapije, kao što su emicizumab, koncizumab i fitusiran predstavljaju revolucionarne pristupe u liječenju hemofilije. Na primjer, emicizumab djeluje kao „most“ između faktora IX i X, čime zamjenjuje funkciju faktora VIII. Genska terapija predstavlja najnapredniji pristup s potencijalom za dugotrajno rješenje. Ova terapija cilja na uvođenje kopija gena za faktor VIII ili IX u stanice jetre, čime se omogućuje trajna proizvodnja tih faktora i smanjuje se potreba za čestim infuzijama. Iako svi ovi napreci u terapiji hemofilije donose poboljšanja u upravljanju bolesti, svaki pristup ima svoje prednosti i ograničenja. S razvojem novih tehnologija, budućnost liječenja hemofilije obećava unapređenje i veću učinkovitost u tretiranju ovog složenog poremećaja koagulacije.

9. LITERATURA

- [1] P. Mehta and A. K. R. Reddivari, *Hemophilia*. StatPearls Publishing, 2023.
- [2] A. Srivastava et al., "Guidelines for the management of hemophilia," *Haemophilia*, vol. 19, no. 1, 2013.
- [3] A. C. Weyand and V. H. Flood, "Von Willebrand disease," *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 35, no. 6, pp. 1085–1101, 2021.
- [4] S. A. Smith, "The cell-based model of coagulation," *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)*, vol. 19, no. 1, pp. 3–10, 2009.
- [5] S. Cito, M. D. Mazzeo, and L. Badimon, "A review of macroscopic thrombus modeling methods," *Thromb. Res.*, vol. 131, no. 2, pp. 116–124, 2013.
- [6] H. M. van den Berg and A. Srivastava, "Hemostasis — A balancing act," *N. Engl. J. Med.*, vol. 389, no. 9, pp. 853–856, 2023.
- [7] N. Lannoy and C. Hermans, "The 'royal disease'— haemophilia A or B? A haematological mystery is finally solved," *Haemophilia*, vol. 16, no. 6, pp. 843–847, 2010.
- [8] M. Basta and A. M. Pandya, *Genetics, X-linked inheritance*. StatPearls Publishing, 2023.
- [9] "Home," World Federation of Hemophilia, 08-Oct-2021. [Online]. Available: <https://wfh.org/>. [Accessed: 02-Aug-2024].
- [10] "World haemophilia day," Haemophilia Foundation Australia, 20-Feb-2022. [Online]. Available: <https://www.haemophilia.org.au/events-news/events/world-haemophilia-day/>. [Accessed: 02-Aug-2024].

- [11] "No title," Dhh.hr. [Online]. Available: <https://www.dhh.hr/o-nama>. [Accessed: 02-Aug-2024].
- [12] B. Pezeshkpoor, J. Oldenburg, and A. Pavlova, "Insights into the molecular genetic of hemophilia A and hemophilia B: The relevance of genetic testing in routine clinical practice," *Hamostaseologie*, vol. 42, no. 06, pp. 390–399, 2022.
- [13] L. Graf, "Extended half-life factor VIII and factor IX preparations," *Transfus. Med. Hemother.*, vol. 45, no. 2, pp. 86–91, 2018.
- [14] L. Svensson et al., "Forssman expression on human erythrocytes: biochemical and genetic evidence of a new histo-blood group system," *Blood*, vol. 121, no. 8, pp. 1459–1468, 2013.
- [15] J. Rejtó et al., "Influence of blood group, von Willebrand factor levels, and age on factor VIII levels in non-severe haemophilia A," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 18, no. 5, pp. 1081–1086, 2020.
- [16] M. Laffan, J. Sathar, and J. M. Johnsen, "von Willebrand disease: Diagnosis and treatment, treatment of women, and genomic approach to diagnosis," *Haemophilia*, vol. 27, no. S3, pp. 66–74, 2021.
- [17] G. Castaman and D. Matino, "Hemophilia A and B: molecular and clinical similarities and differences," *Haematologica*, vol. 104, no. 9, pp. 1702–1709, 2019.
- [18] R. Gualtierotti, L. P. Solimeno, and F. Peyvandi, "Hemophilic arthropathy: Current knowledge and future perspectives," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 19, no. 9, pp. 2112–2121, 2021.
- [19] P. W. Kamphuisen and H. ten Cate, "Cardiovascular risk in patients with hemophilia," *Blood*, vol. 123, no. 9, pp. 1297–1301, 2014.

- [20] P. Wojdasiewicz et al., "Cytokines in the pathogenesis of hemophilic arthropathy," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 39, pp. 71–91, 2018.
- [21] G. Dolan et al., "Principles of care for acquired hemophilia," *Eur. J. Haematol.*, vol. 106, no. 6, pp. 762–773, 2021.
- [22] A. H. Kamal, A. Tefferi, and R. K. Pruthi, "How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 82, no. 7, pp. 864–873, 2007.
- [23] D. Neofotistos, M. Oropeza, and C.-H. Ts' ao, "Stability of plasma for add-on PT and APTT tests," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 109, no. 6, pp. 758–763, 1998.
- [24] C. K. Kasper, "Judith Graham Pool and the discovery of cryoprecipitate," *Haemophilia*, vol. 18, no. 6, pp. 833–835, 2012.
- [25] M. G. Español, J. N. Mistretta, M. D. Tarantino, and J. C. Roberts, "The evolution of hemophilia therapeutics: An illustrated review," *Res. Pract. Thromb. Haemost.*, vol. 8, no. 3, p. 102308, 2024.
- [26] R. Klamroth, A. Gröner, and T. L. Simon, "Pathogen inactivation and removal methods for plasma-derived clotting factor concentrates," *Transfusion*, vol. 54, no. 5, pp. 1406–1417, 2014.
- [27] E. Marchesini, M. Morfini, and L. Valentino, "Recent advances in the treatment of hemophilia: A review," *Dovepress.com*. [Online]. Available: <https://www.dovepress.com/article/download/65883>. [Accessed: 20-Aug-2024].
- [28] L. Graf, "Extended half-life factor VIII and factor IX preparations," *Transfus. Med. Hemother.*, vol. 45, no. 2, pp. 86–91, 2018.

- [29] F. M. Veronese and A. Mero, "The impact of PEGylation on biological therapies," *BioDrugs*, vol. 22, no. 5, pp. 315–329, 2008.
- [30] E. Seth Chhabra et al., "BIVV001, a new class of factor VIII replacement for hemophilia A that is independent of von Willebrand factor in primates and mice," *Blood*, vol. 135, no. 17, pp. 1484–1496, 2020.
- [31] P. V. Jenkins et al., "Laboratory coagulation tests and emicizumab treatment A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline," *Haemophilia*, vol. 26, no. 1, pp. 151–155, 2020.
- [32] J. Mahlangu et al., "Emicizumab prophylaxis in patients who have hemophilia A without inhibitors," *N. Engl. J. Med.*, vol. 379, no. 9, pp. 811–822, 2018.
- [33] A. C. Weyand and S. W. Pipe, "New therapies for hemophilia," *Blood*, vol. 133, no. 5, pp. 389–398, 2019.
- [34] K. Nogami and M. Shima, "New therapies using nonfactor products for patients with hemophilia and inhibitors," *Blood*, vol. 133, no. 5, pp. 399–406, 2019.
- [35] F. W. G. Leebeek and W. Miesbach, "Gene therapy for hemophilia: a review on clinical benefit, limitations, and remaining issues," *Blood*, vol. 138, no. 11, pp. 923–931, 2021.
- [36] K. Kihlberg *et al.*, "Treatment outcomes in persons with severe haemophilia B in the Nordic region: The B-NORD study," *Haemophilia*, vol. 27, no. 3, pp. 366–374, 2021.

10. ŽIVOTOPIS

Osobne informacije

Ime i prezime: Ena Babac
Datum rođenja: 26.12.2002.
e-mail: ena.babac1@gmail.com

Obrazovanje

2021. – danas
Preddiplomski studij Biotehnologije
i istraživanje lijekova, Fakultet
biotehnologije i razvoja lijekova,
Sveučilište u Rijeci

2017. – 2021.
Prva sušačka hrvatska gimnazija u
Rijeci

Osobne vještine i kompetencije

- usvojene komunikacijske vještine kroz prezentacije i seminare tijekom studija, sezonskih poslova i rada s ljudima te rada kao radijska voditeljica
- organiziranost i marljivost te uspješnost pri rješavanju raznih zadataka u seminarskim grupama ili samostalno tijekom studija i srednje škole

Jezične vještine

materinski jezik – hrvatski jezik
ostali jezici

- engleski jezik B1/B2

- njemački jezik A1/A2
- talijanski jezik A1/A2

Digitalne vještine

iskusni korisnik programa Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)

poznavanje programa za informatičko modeliranje molekula i dizajn biomolekula; stečeno tijekom 3. godine studija na kolegiju Kemoinformatika (PyMol, Avogadro, CHARMM-GUI, GROMACS, VMD i cluster analiza

Vozačka dozvola

AM, B, F, G kategorija

Radno iskustvo

Stručna praksa – Nastavni zavod za javno zdravstvo, Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša, Rijeka, mentorica - Darija Vukić Lušić

2024. – demonstratorica na kolegiju Opća fiziologija i patofiziologija Preddiplomskog studija „Biotehnologija i istraživanje lijekova“

2021. - danas

- prodavačica (Sport Vision, Springfield, BIPA)

Rad u muzeju – Kuća halubajsega
zvončara

Jednokratni studentski poslovi-
(konobarenje na festivalima,
promocije)

Volontiranje

2022. – danas

- radijska voditeljica na Radio Sovi, studentskom programu Radio Rijeke (urednica emisije Kemijska minuta)
- Ljetna škola SOBRI – projekt USBRI namijenjen za bruoše preddiplomskog studija Biotehnologija i istraživanje lijekova
- sudjelovanje u aktivnosti Studenti Mentori USBRI