

Vrijednost biljega hrskavice serumskog hondroitin sulfata epitopa 846 i urinarnog C-terminalnog telopeptida kolagena tipa II u ocjeni težine hemofilične artropatije

Kalebota, Nataša

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:475323>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-21**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Nataša Kalebota

**Vrijednost biljega hrskavice
serumskog hondroitin sulfata epitopa
846 i urinarnog C-terminalnog
telopeptida kolagena tipa II u ocjeni
težine hemofilične artropatije**

DISERTACIJA



Zagreb, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Nataša Kalebota

**Vrijednost biljega hrskavice
serumskog hondroitin sulfata epitopa
846 i urinarnog C-terminalnog
telopeptida kolagena tipa II u ocjeni
težine hemofilične artropatije**

DISERTACIJA

Zagreb, 2024.

Disertacija je izrađena u Klinici za reumatske bolesti i rehabilitaciju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, u Centru za hemofiliju Zavoda za hematologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb, u Odjelu za proteomiku, Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta u Zagrebu i u laboratoriju Central European Institute of Technology, Masaryk University, Republika Češka.

Mentor: prof. dr. sc. Porin Perić

Komentor: prof. dr. sc. Silva Zupančić Šalek

Zahvaljujem svom mentoru, prof. dr. sc. Porinu Periću, na neprocjenjivoj pomoći i ustrajnoj podršci tijekom planiranja, provođenja istraživanja i izrade disertacije. Izražavam veliku zahvalnost komentorici prof. dr. sc. Silvi Zupančić Šalek za razvoj idejnog koncepta, pomoći u istraživačkom procesu, formiranju ispitivanih skupina i dragocjenim savjetima.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Lovorki Grgurević na velikoj pomoći u planiranju, provođenju istraživanja i pisanju rada. Izražavam zahvalnost dr. sc. Ruđeru Novaku i suradnicima Odjela za proteomiku na vrijednoj suradnji.

Posebno zahvaljujem prof. dr. sc. Dunji Rogić, prof. dr. sc. Kseniji Fumić, spec. med. biokemije i lab. medicine Kristini Dukić te doc. dr. sc. Saši Kralik-Oguić na laboratorijskoj analizi i iznimnoj i nesebičnoj podršci. Zahvalnost dugujem svim djelatnicima laboratorija na njihovom predanom radu pri primarnoj obradi i skladištenju bioloških uzoraka.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Nadici Laktašić Žerjavić i dr. sc. Kristini Kovač Durmiš na ultrazvučnoj analizi, prim. dr. sc. Mariju Vodanoviću na pomoći pri prikupljanju ispitanika i savjetima, te prof. dr. sc. Milanu Miloševiću na statističkoj obradi i pomoći u izradi poglavlja rezultata. Zahvaljujem se medicinskim sestrama Centra za hemofiliju na pomoći.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj obitelji na neizmjerne podršci u stvaranju ovog rada.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. Hemofilija.....	1
1.1.1. Klinička obilježja hemofilije	2
1.1.2. Liječenje hemofilije	3
1.2. Patofiziologija hemofilične artropatije	5
1.2.1. Sinovitis i oštećenje hrskavice	5
1.2.2. Oštećenje kosti	7
1.3. Zglobna hrskavica	8
1.3.1. Struktura i funkcija kolagena	9
1.3.2. Struktura i funkcija agrekana.....	11
1.3.3. Degenerativne promjene agrekana.....	12
1.4. Biljezi pregradnje hrskavice CS846 i uCTX-II.....	13
1.4.1. Istraživanja CS846 i uCTX-II u ocjeni težine hemofilične artropatije.....	15
1.5. Disintegrin i metaloproteinaza s motivom trombospondina – 4 (ADAMTS-4).....	20
1.6. Koštana pregradnja	22
1.6.1. Biljezi pregradnje kosti.....	24
1.6.2. Istraživanja CTX-I, osteokalcina i koštane ALP u hemofiličnoj artropatiji	25
1.7. Slikovne metode u hemofiličnoj artropatiji	27
1.7.1. Heamophila Early Arthropathy Detection with Ultrasound (HEAD – US).....	29
1.7.2. Istraživanja HEAD-US u hemofiličnoj artropatiji	30
1.8. Proteomika i masena spektrometrija	32
1.8.1. Proteomika.....	32
1.8.2. Masena spektrometrija.....	32
1.8.3. Bioinformatička obrada podataka.....	33
1.8.4. Proces validacije biljega u metodi „shotgun“ proteomike	33
1.9. Svrha rada	34
2. HIPOTEZA.....	36
3. CILJEVI RADA.....	37

4.	MATERIJALI I METODE	38
4.1.	Materijali	38
4.1.1.	Ispitanici	38
4.2.	Metode	39
4.2.1.	Anamneza i status	39
4.2.2.	Laboratorijske pretrage	39
4.2.3.	Analiza biljega	40
4.2.4.	Klinička ocjena hemofilične artropatije	44
4.2.5.	Ultrazvučna ocjena hemofilične artropatije	45
4.2.6.	Proteomska analiza	46
4.2.7.	Statistička analiza	50
5.	REZULTATI	52
5.1.	Antropometrijski i demografski podaci ispitanika	52
5.1.1.	Klinička obilježja ispitanika i liječenje	53
5.2.	Klinički i HEAD-US skorovi i usporedba između skupina	54
5.3.	Laboratorijski nalazi i usporedba između skupina	58
5.4.	Vrijednosti OC, CS846, uCTX-II, IGF-1, CTSG i ADAMTS-4 i usporedba između skupina	63
5.4.1.	Korelacije CS846, uCTX-II i ADAMTS-4 s drugim ispitivanim biljezima, te sa ultrazvučnim i kliničkim skorom	65
5.5.	Korelacije IGF-1 i CTSG s drugim ispitivanim biljezima, te sa ultrazvučnim i kliničkim skorom	69
5.6.	Korelacije OC, CTX-I i koštane ALP s drugim ispitivanim biljezima, te sa ultrazvučnim i kliničkim skorom	72
5.7.	Proteomika	75
5.7.1.	Proteini pojačano izraženi u teškoj hemofiliji u odnosu na zdrave	75
5.7.2.	Proteini smanjeno izraženi u teškoj hemofiliji u odnosu na zdrave	78
5.7.3.	Proteini pojačano izraženi u teškoj hemofiliji u odnosu na blagu hemofiliju	81
5.7.4.	Proteini smanjeno izraženi u teškoj hemofiliji u odnosu na blagu hemofiliju	84
5.7.5.	Proteini pojačano izraženi u blagoj hemofiliji u odnosu na zdrave	86
5.7.6.	Proteini smanjeno izraženi u blagoj hemofiliji u odnosu na zdrave	88

6.	RASPRAVA.....	94
6.1.	Vrijednost biljega uCTX-II i CS846 u ocjeni težine hemofilične artropatije	95
6.2.	Povezanost biljega koštane pregradnje s CS846, uCTX-II i hemofiličnom artropatijom	98
6.3.	Vrijednost biljega ADAMTS-4 u ocjeni težine hemofilične artropatije	101
6.4.	Proteomska analiza	102
6.5.	Vrijednost biljega IGF-1 i CTSG u ocjeni težine hemofilične artropatije	107
7.	ZAKLJUČCI.....	110
8.	SAŽETAK.....	113
9.	SUMMARY	114
10.	POPIS LITERATURE	115
11.	BIOGRAFIJA.....	136

POPIS OZNAKA I KRATICA

ADAMTS	– disintegrin i metaloproteinaze s motivom trombospondina (engl. a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs)
Apo (a)	– apolipoprotein (a)
BMD	– gustoća koštane mase (engl. bone mineral density)
BMI	– indeks tjelesne mase (engl. body mass index)
BSH	– bolesnici s hemofilijom
CDHR2	– član obitelji kadherina 2 (engl. cadherin-related family member 2)
COMP	– oligomerni protein hrskavičnog matriksa (engl. cartilage oligomeric matrix protein)
COX-2	– ciklooksigenaza 2
CRP	– C-reaktivni protein
CS846	– hondroitin sulfat epitop 846
CTSG	– katepsin G (engl. cathepsin G)
CTX-I	– C-terminalni telopeptid kolagena tipa I
uCTX-II	– urinarni C-terminalni telopeptid kolagena tipa II
ECM	– izvanstanični matriks (engl. extracellular matrix)
ERAP2	– endoplazmatska retikulumska aminopeptidaza 2 (engl. endoplasmic reticulum aminopeptidase 2)
FVIII	– faktor zgrušavanja VIII
FIX	– faktor zgrušavanja IX
HA	– hemofilična artropatija
HBV	– hepatitis B virus
HCV	– hepatitis C virus
HEAD-US	– engl. Heamophila Early Arhtropathy Detection with Ultrasound
HIF-1	– hipoksijom induciran faktor 1 (engl. hypoxia inducible factor 1)

HIV	– virus humane imunodeficijencije (engl. human immunodeficiency virus)
IGF-1	– inzulinu sličan faktor rasta 1 (engl. insulin-like growth factor 1)
IL-1 β	– interleukin 1 beta
IFN- γ	– interferon gama
koštana ALP	– koštana alkalna fosfataza
LTBP-1	– protein koji veže latentni transformirajući faktor rasta beta 1 (engl. latent transforming growth factor beta-binding protein 1)
MMP	– matriks metaloproteinaza (engl. matrix metalloproteinase)
MR	– magnetska rezonancija
OC	– osteokalcin
OPG	– osteoprotegerin
OPN	– osteopontin
PZP	– engl. pregnancy zone protein
RANK	– engl. receptor activator of nuclear factor – kappa B
RANKL	– engl. receptor activator of nuclear factor kappa – B ligand
TAFI	– inhibitor fibrinolize koji se aktivira trombinom (engl. thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor)
TGF- β	– transformirajući faktor rasta beta (engl. transforming growth factor beta)
TIMP	– tkivni inhibitor matriks metaloproteinaze (engl. tissue inhibitor of matrix metalloproteinase)
TNF α	– faktor nekroze tumora alfa (engl. tumor necrosis factor alpha)
VCAM-1	– engl. vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	– faktor rasta vaskularnog endotela (engl. vascular endothelial growth factor)
vs.	– naspram
WFH	– Svjetska federacija za hemofiliju (engl. World Federation of Hemophilia)

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Hemofilija

Hemofilija je rijedak nasljedni poremećaj koji se prenosi recesivno preko X kromosoma, što dovodi do manjka faktora zgrušavanja VIII (hemofilija A) ili IX (hemofilija B). Hemofilija dominantno pogađa muškarce koji nasljeđuju majčin zahvaćeni kromosom. Karakteristika hemofilije je sklonost krvarenju, a intenzitet krvarenja korelira s razinom deficita faktora zgrušavanja. Tešku hemofiliju obilježava razina faktora zgrušavanja ispod 1 % normalne, što dovodi do spontanih krvarenja u zglobove ili mišiće. Umjerena hemofilija, s razinama faktora zgrušavanja između 1-5 % normalne, rezultira povremenim spontanijim krvarenjima i produljenim krvarenjem nakon manje traume ili operacije. U blagoj hemofiliji, s razinama faktora zgrušavanja između 5 % i 40 % normalne, dolazi do krvarenja nakon veće traume ili operacije, dok je spontano krvarenje rijetko. Krvarenja u hemofiliji najčešće se javljaju u mišićno-koštanom sustavu (1).

Zglobovi su najčešća mjesta krvarenja, sa učestalošću od 70-80 % svih slučajeva. Najčešće se javljaju u gležnjevima, koljenima i laktovima, dok su krvarenja u drugim zglobovima (ramena, ručni zglobovi, kukovi) rjeđa. Krvarenja u mišiće čine 10-20 % svih slučajeva. Krvarenja opasna po život su rijetka, kao što su ona u mozgu (< 5 %) i unutarnjim organima (1, 2). Hemofilija A i B se ne razlikuju u kliničkim obilježjima. Učestala krvarenja mogu uzrokovati razvoj bolne i hendikepirajuće hemofilčne artropatije (HA) (2).

Hemofilija A i B se nasljeđuju zbog promjena u genima faktora VIII ili IX (1). Žene su obično asimptomatske prenositeljice mutiranog gena, a mogu biti zahvaćene blagim oblikom bolesti (2). U teškoj hemofiliji A dominantne genetske promjene su velike inverzije i translokacije u genu faktora VIII, dok su u hemofiliji B najučestalije točkaste mutacije u genu faktora IX. U oko 30 % slučajeva nastaju nove mutacije bez prethodne obiteljske povijesti bolesti (3).

Prevalencija hemofilije A je 1 na 5000, a hemofilije B 1 na 30 000 muškaraca. Hemofilija A je češća, čini 80-85 %, dok hemofilija B čini 15-20 %

svih slučajeva (1, 2). Procjenjuje se da prevalencija hemofilije A pri rođenju iznosi 24,6 slučajeva na 100 000 muškaraca za sve težine hemofilije, od čega je 9,5 teška hemofilija. Za hemofiliju B prevalencija je 5,0 slučajeva na 100 000 muškaraca, od čega 1,5 predstavlja tešku hemofiliju (1).

1.1.1. Klinička obilježja hemofilije

Krvarenja koja se javljaju spontano ili zbog traume osnovno je kliničko obilježje hemofilije (1). Ponavljajuća krvarenja u zglobovima predstavljaju glavni klinički simptom teške hemofilije. Čak i subklinička krvarenja mogu dovesti do HA (4). Stoga se bolesnici s teškom hemofilijom često suočavaju s ozbiljnim problemima zglobova, što negativno utječe na njihovu pokretljivost, samostalnost, sposobnost obavljanja svakodnevnih aktivnosti i kvalitetu života (1, 3, 5).

Također, često dolazi do krvarenja u mišićima, posebno u iliopsoasu i gastrocnemiusu. Sklonost krvarenju proizlazi iz bogate vaskularizacije sinovijalnog tkiva te mehaničkog opterećenja, u kombinaciji s poremećenom ravnotežom procesa koagulacije. Važnost mehaničkog stresa ističe se činjenicom da se prva krvarenja u zglobove i mišiće javljaju kada djeca s teškom hemofilijom počnu puzati i hodati (1, 4, 6).

HA može nastati zbog jednog ili više krvarenja, uzrokujući razvoj kroničnog sinovitisa i erozije zglobne površine. Bol je često prisutna, a oteklina se manifestira tijekom pogoršanja. Dolazi do smanjenje opsega pokreta zgloba, a kontraktura se mogu razviti i kao posljedica krvarenja u mišićima. Kako artropatija napreduje, javljaju se deformacije, subluksacija i nestabilnost zgloba, a u najtežim slučajevima i ankiloza (1, 5). Bolesnici s hemofilijom (BSH) imaju smanjenu gustoću koštane mase (engl. bone mineral density, BMD). Čimbenici poput smanjene pokretljivosti zglobova, atrofije mišića, ograničene tjelesne aktivnosti, sjedilačkog stila života i povećane tjelesne težine utječu na niži BMD (1).

Patofiziologija HA još uvijek nije u potpunosti poznata, naročito kada je riječ o ranoj i subkliničkoj fazi bolesti te u kontekstu razvoja upalnih procesa (4).

Klinički pregled zglobova obuhvaća mjerenje opsega pokreta, evaluaciju izljeva u zglob, ocjenu mišićne snage, kuta zgloba i boli. S obzirom da se kliničkim pregledom ne može pouzdano otkriti rani sinovitis, Svjetska federacija za hemofiliju (engl. World Federation of Hemophilia, WFH) savjetuje evaluaciju zglobova sa slikovnim tehnikama kao što je ultrazvuk (UZV) koji je koristan u evaluaciji mekih tkiva i perifernih hrskavičnih struktura u ranoj fazi HA. Standardni rendgen nije osjetljiv na rane promjene i obično se primjenjuju za procjenu kasnijih artropatskih promjena. Magnetska rezonancija (MR) pokazuje rane znakove artropatije, promjene u mekim tkivima i osteohondralnim strukturama (1).

1.1.2. Liječenje hemofilije

Profilaktično liječenje obuhvaća redovitu intravensku primjenu FVIII za hemofiliju A i FIX za hemofiliju B i standard je u liječenju teške hemofilije. Cilj je osigurati hemostazu povećanjem razine FVIII/FIX, čime se sprječavaju krvarenja, posebno u zglobovima i izbjegava razvoj artropatije i potencijalne invalidnosti (1).

Za razliku od nadomjesne terapije faktorima zgrušavanja, nefaktorska nadomjesna terapija postiže hemostazu putem drugačijeg mehanizma. Emicizumab, namijenjen liječenju hemofilije A, jest bispecifično monoklonsko protutijelo koje oponaša kofaktorsku aktivnost FVIII te se primjenjuje subkutano (1).

Profilaktička terapija podrazumijeva redovitu zamjensku terapiju, dok se epizodična terapija (po potrebi) primjenjuje samo prilikom krvarenja. Primjena faktora po potrebi ne smanjuje učestalost krvarenja, što može dovesti do mišićno-koštanih komplikacija (1).

Profilaktička terapija, bilo da se koriste koncentracije faktora zgrušavanja ili nefaktorska nadomjesna sredstva, pruža značajne prednosti u odnosu na terapiju po potrebi, jer smanjuje krvarenje i razvoj HA. Najbolji rezultati u očuvanju funkcionalnosti zglobova postižu se ako se terapija započne do treće godine života (1, 4, 7).

Tri su vrste profilaktičkog liječenja: primarna, sekundarna i tercijarna. Primarna započinje prije treće godine života u odsustvu bolesti zglobova prema fizikalnom pregledu i/ili slikovnim metodama. Sekundarna se primjenjuje nakon dvije ili više epizoda krvarenja, ali prije razvoja bolesti zglobova, obično nakon treće godine. Tercijarna počinje u odrasloj dobi nakon evidentirane bolesti zglobova (1).

U posljednjim desetljećima ostvarena su značajna postignuća u liječenju hemofilije zahvaljujući učinkovitim i sigurnim koncentratima faktora zgrušavanja. No, prije uvođenja sigurnih krvnih proizvoda, mnogi BSH koji su primali koncentrate faktora zgrušavanja iz plazme bili su izloženi riziku od krvlju prenosivih bolesti, poput infekcija virusima hepatitisa B, C i humane imunodeficijencije (HIV) (2, 8). Koncentrati faktora zgrušavanja predstavljaju primarnu terapiju i postoje dva tipa (1). Prvi se proizvode iz pročišćene ljudske plazme u kojima su virusi inaktivirani. Drugi su rekombinantni proizvodi i često se koriste zbog sigurnosti jer ne prenose infekcije, visoko su učinkoviti i neovisni su o dostupnosti ljudske plazme (1, 8).

Inhibitori su aloantitijela koja neutraliziraju aktivnost FVIII i FIX u nadomjesnoj terapiji. Pojavljuju se u 30 % bolesnika s hemofilijom A, te u 5 % s hemofilijom B (1, 3). Pojava antitijela povećava rizik krvarenja i razvoj HA (2). Razvoju inhibitora doprinose težina deficita faktora, genetska podloga, vrsta nadomjesne terapije te dob u kojoj je započeto liječenje (3).

Cilj liječenja kroničnog sinovitisisa jest smanjiti broj krvarenja, bolove i upalu te očuvati funkciju zgloba i sudjelovanje u aktivnostima svakodnevnog života. Konzervativno liječenje uključuje profilaktičnu nadomjesnu terapiju, primjenu fizikalne terapije, te upotrebu selektivnih COX-2 inhibitora. Za liječenje boli koristi se paracetamol ili u kombinaciji s tramadolom. Fizikalna terapija uključuje vježbe opsega pokreta zglobova, jačanje mišića, vježbe propriocepcije i ravnoteže te funkcionalni trening (1).

U akutnom krvarenju liječenje uključuje faktore zgrušavanja, imobilizaciju i mirovanje, te primjenu analgetika. U težim artropatijama mogu se primijeniti ortopedске intervencije kao što su sinovektomija ili artroplastika (3). Unatoč primjene profilaktičnog liječenja od djetinjstva, krvarenja u zglobove i razvoj HA se

ne mogu u potpunosti spriječiti. Dokaz za to je da između trećine i polovine odraslih s hemofilijom iz razvijenih zemalja pokazuje kliničke znakove artropatije (7, 9).

1.2. Patofiziologija hemofilične artropatije

Patofiziologija HA složena je i proizlazi iz izravne interakcije krvi sa zglobnom hrskavicom, kao i neizravno zbog upalnih procesa. Ponavljajuća krvarenja u zglobovima mogu uzrokovati teška oštećenja koja pokazuju sličnosti s degenerativnim oštećenjem hrskavice karakterističnim za osteoartritis (OA), kao i s upalnim procesima tipičnim za reumatoidni artritis (RA) (2, 4, 7). S druge strane, HA specifično nastaje i pogoršava se zbog krvarenja u zglobu, što je razlikuje od RA kojeg obilježava sistemska upala ili s dobi povezana degeneracija u OA (7, 10). Primarni procesi uključeni u HA su sinovitis, degeneracija hrskavice i kosti, te vaskularno remodeliranje (9).

Stvaranje krvnog ugruška je narušeno u zdravom zglobu zbog niske ekspresije tkivnog faktora (engl. tissue factor, TF) koji pokreće koagulacijsku kaskadu i visoke razine inhibitora puta tkivnog faktora (engl. tissue factor pathway inhibitor, TFPI) u sinovijalnoj membrani (4-6). Mehaničko oštećenje i promijenjena ravnoteža u koagulaciji čine zglobove u hemofiliji osjetljivima na krvarenje. Lokalna fibrinoliza, ili razgradnja krvnog ugruška, povećana je u zglobu u hemofiliji. Ova kombinacija čimbenika rezultira smanjenim stvaranjem trombina i ubrzanom razgradnjom ugruška (5). Smanjena aktivacija inhibitora fibrinolize koji se aktivira trombinom (engl. thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, TAFI) može dodatno poremetiti regulaciju fibrinolize (4, 7).

1.2.1. Sinovitis i oštećenje hrskavice

Oštećenje hrskavice može biti pokrenuto direktnom interakcijom s krvlju ili neizravno kao rezultat kataboličkih procesa tijekom upale (7). Nakon akutnog hemartrosa, sinovijalne stanice i makrofazi čiste krv iz zglobne šupljine. Ponovljene epizode krvarenja dovode do nakupljanja željeza iz eritrocita u obliku hemosiderinskih depozita unutar sinovijalnog tkiva, što potiče upalni proces (9).

Željezo, zajedno s upalnim citokinima poput IL-1 β i TNF α , ima središnju ulogu u ovom procesu. Pretjerano oslobađanje željeza iz eritrocita u sinovijalno tkivo potiče proliferaciju sinovije te makrofage na proizvodnju citokina poput IL-1 β , TNF α , interferona- γ (IFN γ), monocitnog kemotaktičkog proteina 1 (engl. monocyte chemoattractant protein-1, MCP1), IL-6 i IL-8. Ovi citokini inhibiraju aktivnost hondrocita i sintezu proteoglikana što dovodi do degeneracije hrskavice (2, 9, 11).

Proupalni citokini doprinose degradaciji hrskavice poticanjem MMP-a i agrekanaza koje imaju ulogu u razgradnji kolagena i proteoglikana (9). Hemoglobin pojačava proizvodnju i oslobađanje aktivatora plazminogena, MMP-2 i -9, te povećava ekspresiju ADAMTS-5 i -9 u sinoviocitima (11).

Željezo također potiče ekspresiju proto-onkogeno c-myc (engl. cellular myelocytomatosis) povezanog s proliferacijom stanica, dok povećanje proteina mdm2 (engl. murine double minute 2), supresora gena tumora p53, inhibira apoptozu sinovijalnih stanica (5, 9, 11).

Upala i hipertrofija sinovije uzrokuju hipoksiju što potiče ekspresiju faktora HIF-1 α (engl. hypoxia-inducible factor-1 α), HIF-2- α (engl. hypoxia-inducible factor-2 α), VEGF (engl. vascular endothelial growth factor), SDF-1 α (engl. stromal cell-derived factor 1 α), pro-matriks metaloproteinaza (proMMP)3 i proMMP13, te MMP-9. Zajedno, ovi čimbenici uzrokuju povećanu angiogenezu i enzimatsko oštećenje tkiva (5, 7). Štoviše, krvarenje u zglobu dovodi do sistematskog oslobađanja VEGF što može uzrokovati hipervaskularnost u zglobovima koji nisu izravno pogođeni krvarenjem (9).

Aktivacija signalnih puteva koji uključuju nuklearni faktor- κ B (NF- κ B), ključan u regulaciji citokina (poput IL-1 β , TNF α , IFN γ), faktora rasta i odgovora na hipoksiju, vjerojatno predstavlja glavni put u razvoju sinovijalne upale i povećane vaskularizacije (5, 9).

Kombinacija upale, hipertrofije i neovaskularizacije sinovije povećava njezinu osjetljivost na mehaničke ozljede i krvarenje. Ovaj štetni ciklus može rezultirati stvaranjem „ciljnog zgloba“. Ciljni zglob definira se kao zglob u kojem se dogodi tri ili više spontanih krvarenja unutar šest mjeseci i često napreduje u HA (7, 9).

Drugi način oštećenja hrskavice je izravnim izlaganjem krvi, što uzrokuje razgradnju izvanstaničnog matriksa i apoptozu hondrocita. Čak i kratko izlaganje maloj količini krvi može dovesti do poremećaja u pregradnji matriksa (9). Dolazi do smanjenja sinteze i povećanog otpuštanja proteoglikan-glikozaminoglikana (GAG) iz hrskavice. Željezo i citokini povezani su s ovim učincima (7, 11).

Monociti/makrofazi i hondrociti, pod utjecajem IL-1 β , stvaraju reaktivne kisikove spojeve superoksid i vodikov peroksid (H₂O₂). Kada željezo iz razgrađenih eritrocita reagira s H₂O₂, nastaju snažni hidroksilni radikali koji dovode do apoptoze hondrocita i oštećenja matriksa (7, 11). Istraživanja provedena in vitro, gdje je hrskavica kultivirana sa eritrocitima kao izvorom željeza i mononuklearnim stanicama jer proizvode IL-1 β , pokazala su smanjenje sinteze sulfatiranih glikozaminoglikana (11).

1.2.2. Oštećenje kosti

S progresijom kroničnog sinovitisa, proupalni citokini i proteaze doprinose osteohondralnom oštećenju. Dodatno, neravnoteža u RANK/RANKL/osteoprotegerin (OPG) putu narušava lokalnu koštanu homeostazu, što rezultira povećanom resorpcijom kosti i subhondralnim oštećenjima (4).

Koštane promjene obuhvaćaju formiranje cista, subhondralnu sklerozu, stvaranje osteofita, povećanje epifiza. Neravnoteža između resorpcije i formiranja kosti dovodi do smanjenja BMD-a i razvoja osteoporoze (5, 6, 9).

Razvoj osteoporoze je multifaktorijalan. Smanjena tjelesna aktivnost zbog akutnog hemartrosa i kronična HA doprinosi smanjenju BMD. Također, postoji veza između smanjenog BMD-a i infekcija virusom hepatitisa C ili HIV-a. Smanjenje BMD-a može biti potaknuto jednim krvarenjem i pogoršano neaktivnošću, atrofijom mišića i ponovljenim krvarenjima (5, 6, 9).

Oštećenje kosti u hemofiliji je složen proces koji uključuje mnogo čimbenika, pri čemu hemartros igra ključnu ulogu (9). Točni mehanizmi koji leže u osnovi ovih promjena nisu u potpunosti poznati, iako subhondralna skleroza i formiranje osteofita mogu biti sekundarni zbog degradacije hrskavice, slično OA

(6). Istraživanje na mišjem modelu pokazuje da intra-artikularna krvarenja mogu uzrokovati neposredne koštane promjene, što dovodi do smanjene gustoće kosti (5).

RANKL/RANK/OPG su glavne komponente signalnog puta u koštanoj pregradnji. Lokalne promjene u pregradnji kosti nakon hemartrosa mogu biti povezane s modifikacijama u putu RANKL/RANK/OPG koji igra značajnu ulogu u upalom induciranoj resorpciji kosti. RANK-L, koji je primarno izražen na osteoblastima, potiče resorpciju kosti osteoklastima kada se veže za svoj receptor RANK. OPG se kompetitivno veže za RANK-L čime sprječava njegovu interakciju s RANK. Ovaj zaštitni mehanizam pomaže regulirati resorpciju kosti i sprječava prekomjerni gubitak kosti. Pojačana ekspresija RANK-a i RANK-L-a, uz smanjenu ekspresiju OPG-a, u sinovijalnom tkivu teške HA potiče diferencijaciju osteoklasta i resorpciju kosti (5, 6, 9).

1.3. Zglobna hrskavica

Hrskavica je građena od hondrocita i međustanične tvari. Više od 70 % njezinog sastava čini voda, dok hondrociti čine do 10 % ukupnog volumena. Na površinama zglobova nalazi se hijalina hrskavica koja omogućava glatko klizanje zglobova. Hondrociti sintetiziraju komponente ekstracelularnog matriksa (ECM-a), pri čemu su glavni sastojci kolagen tipa II i proteoglikan agrekan. Osim toga, prisutni su i drugi manje zastupljeni kolageni, mali proteoglikani te različiti nekolagenski proteini, poput hrskavičnog oligomernog proteina matriksa (engl. cartilage oligomeric matrix protein, COMP). Zglobna hrskavica ne sadrži živce i krvne žile, stoga je njezina prehrana ovisna o difuziji hranjivih tvari iz sinovijalne tekućine. Zglobna hrskavica sastoji se od četiri sloja: površinski sloj karakteriziraju tangencijalno raspoređena tanka kolagenska vlakna, srednji sloj sadrži deblje radijalne snopove kolagena, u dubokom sloju kolagenski snopovi usmjereni su okomito, dok se kalcificirani sloj nalazi iznad subhondralne kosti. U površinskom sloju prevladava kolagen u odnosu na proteoglikane, dok se s povećanjem dubine sloja povećava količina proteoglikana. Biomehanička svojstva zglobne hrskavice proizlaze iz mreže kolagena, koja pruža otpornost na istezanje.

Agregati proteoglikana zadržavaju vodu u matriksu, što doprinosi otpornosti hrskavice na tlačne sile. U fiziološkim uvjetima hondrociti održavaju ravnotežu između sinteze i razgradnje komponenti matriksa s niskom stopom pregradnje kolagena tipa II i agrekana, dok se lanci glikozaminoglikana na agrekanu brže zamjenjuju. Tijekom procesa starenja i u bolestima zglobova ova se ravnoteža narušava, dolazi do smanjenja sposobnosti za popravak i kvalitete matriksa. Kada su hondrociti izloženi traumi ili upali, povećava se njihova metabolička aktivnost. To se događa pod utjecajem anaboličkih faktora poput IGF-1 (engl. insulin-like growth factor-1) i TGF- β (engl. transforming growth factor- β), koji potiču aktivnost hondrocita i sintezu proteoglikana, kao i pod kataboličkim faktorima poput proupalnih citokina koji stimuliraju proteaze, MMP i agrekanaze, koje razgrađuju matriks. Ova dinamika dovodi do remodeliranja ECM-a. U početku, radi nadoknade gubitka komponenti matriksa, dolazi do pojačane proizvodnje. Međutim, s vremenom dolazi do smanjenja sinteze. Štetni utjecaji dovode do gubitka proteoglikana i oštećenja strukture mreže kolagena, nakon toga dolazi i do gubitka hondrocita (12-15).

1.3.1. Struktura i funkcija kolagena

Kolagen predstavlja skup proteina koji tvore prepoznatljivu trostruku uzvojnica putem tri polipeptidna lanca. Kolageni su najzastupljeniji proteini, čine oko 30 % ukupne proteinske mase u organizmu. Dosad je identificirano 28 genetski različitih tipova kolagena koji su označeni rimskim brojevima. Najobimnija i najrasprostranjenija grupa kolagena, koja čini 90 % ukupnog kolagena, uključuje one koji formiraju vlakna poput kolagena tipa I, II i III. Kolagen tipa I čini više od 90 % kolagena u tijelu i sastavni je dio kosti, tetiva, ligamenata, kože itd. Nasuprot tome, hrskavica se primarno sastoji od kolagena tipa II (16-18).

Glavna funkcija kolagena je potpora strukturi i čvrstoći tkiva i pruža mehaničku stabilnost, elastičnost i snagu. Kolagen je najobilniji protein u ECM-u. Torzijska stabilnost i visoka čvrstoća kolagena pri istezanju igraju ključnu ulogu u očuvanju stabilnosti i integriteta tkiva (16, 19).

Kost se sastoji od kolagenskih vlakana prožetih čvrstim kristalima minerala hidroksiapatita. U organskom matriksu kosti, kolagen tipa I čini 90 %, dok preostalih 10 % otpada na nekolagenske protein (20).

Svi tipovi kolagena imaju zajedničko obilježje, desno usmjerenu trostruku uzvojnica sastavljenu od tri alfa (α) lanca, omeđenih s karboksi (C) i amino (N) propeptidima. Ova struktura se može formirati putem tri identična α -lanca (homotrimeri) kao što je kod kolagena II, III, VII, VIII, X. S druge strane, struktura se može oblikovati korištenjem više različitih α -lanaca (heterotrimer) karakteristično za kolagen tipa I, IV, V, VI, IX i XI. Kolagen tipa I je sastavljen od dva α 1 lanca i jednog α 2 lanca. Alfa lanci se razlikuju po sekvencama aminokiselina (21).

Svaki od tri α -lanca unutar molekule tvori heliks koji je orijentiran u lijevo, s 18 aminokiselina po navoju. U fibrilarnim kolagenima prevladava ponavljajuća struktura (Gly-X-Y) sa glicinom na svakom trećem mjestu polipeptidnog lanca što je otprilike 1000 aminokiselina. X i Y pozicije često zauzimaju prolin i hidroksiprolin (18).

Sinteza kolagena započinje sintezom pojedinačnih polipeptidnih α -lanaca, koji se potom kombiniraju u prekursorsku molekulu preprokolagena koja prolazi modifikacije, uključujući hidroksilaciju prolina i lizina, te glikozilaciju hidroksilizina. Nakon ovih modifikacija propeptidi se uvijaju u trostruku uzvojnica formirajući prokolagen. Nakon što se prekursor prokolagen spoji, proteaze odvajaju C-propeptid i N-propeptid i nastaje molekula tropokolagena. Tropokolagenska vlakna se dalje povezuju kako bi stvorila kolagenska vlakna, koja se dodatno stabiliziraju kovalentnim unakrsnim vezama, pridonoseći mehaničkoj čvrstoći. Molekula kolagena, duga oko 300 nm i široka 1,5 nm, sastoji se od središnje jedinice tropokolagena, s nespiralnim kratkim telopeptidima na krajevima. Ovi telopeptidi, smješteni na amino (N) i karboksilnom (C) kraju svakog lanca, sadrže između 9 i 26 aminokiselinskih ostataka i igraju ključnu ulogu u inicijaciji fibrilogeneze i mehaničkoj stabilizaciji fibrila. Oni su bitni za stvaranje vezivnih mjesta potrebnih za sklapanje kolagenskih fibrila. Glicin, koji čini više od 30 % kolagena, doprinosi stabilizaciji trostruke uzvojnice kroz formiranje međulančanih

vodikovih veza, dok prolin i hidroksiprolin ograničavaju rotaciju oko C-N veze, dodatno doprinoseći stabilnosti (16, 19, 21, 22).

1.3.2. Struktura i funkcija agrekana

Agrekan je veliki proteoglikan s brojnim lancima glikozaminoglikana (GAG) i ima sposobnost stvaranja agregata vezanjem s hijaluronskom kiselinom. Agrekan je ključna komponenta ECM-a hrskavice kojeg proizvode hondrociti. Uz kolagen tipa II čini mrežu unutar ECM-a te ima ulogu u strukturi i funkciji (23, 24). Primarna svojstva agrekana uključuju njegovu osmotsku funkciju i otpornost na kompresijska opterećenja. Razgradnja i gubitak agrekana mogu dovesti do oštećenja funkcije hrskavice i pokretanja degenerativnih procesa (25).

Proteoglikani se mogu podijeliti u dvije kategorije: prva uključuje male proteoglikane bogate leucinom, kao što su npr. dekorin i biglikan. Druga kategorija obuhvaća veće agregacijske proteoglikane kao što su agrekan, versikan, brevikan i neurokan. Versikan se može naći u krvnim žilama i koži, a brevikan i neurokan u neuronima (26).

Agrekan je građen od središnjeg proteina na kojeg su kovalentno vezani bočni lanci GAG-a, hondroitin sulfat i keratan sulfat. Središnji protein težine je 250 kDa i sastavljen je od tri globularne domene (G1, G2 i G3) te dvije interglobularne domene (IGD) koje ih razdvajaju. N-terminalna G1 domena ključna je za vezanje s hijaluronskom kiselinom i veznim proteinom. Između G2 i G3 domene smješteno je veliko područje koje služi kao mjesto vezanja za približno 100 lanaca hondroitin sulfata (CS) i 30 lanaca keratan sulfata (KS). Sulfatirani sastav ovih lanaca daje molekuli agrekana visoki anionski naboj. Domena bogata KS sastoji se od ponavljajućih sekvenci od šest aminokiselina, koje uključuju prolin-serin sekvencu. Svaki serinski ostatak unutar ovih sekvenci može biti mjesto pričvršćivanja O-vezanih oligosaharida koji formiraju strukturu za vezanje KS. Slijedi područje bogato CS, podijeljeno na dvije poddomene CS1 i CS2, koje se razlikuju po aminokiselinskim sekvencama što utječe na njihovu osjetljivost na proteolizu. CS1 domena sastoji se od ponavljajućih devetnaest aminokiselina sa serin-glicin sekvencama, koje su potencijalna mjesta za vezanje

CS. G3 područje, smješteno na C (karboksi) kraju središnjeg proteina, sastoji se od dijelova sličnih epidermalnom faktoru rasta (engl. epidermal growth factor, EGF), jedne C-tipa lektin-slične domene i jedne domene nalik komplementarnom regulatornom proteinu. G3 domena ima ulogu u transportu agregata unutar hondrocita i njegovom izlučivanju u ECM. Agregati agregata nastaju interakcijom G1 domene s hijaluronskom kiselinom i veznim proteinom. Gusti negativni naboj GAG lanaca omogućuje privlačenje iona i molekule vode, stvarajući pozitivan osmotski tlak koji je ključan za zadržavanje vode i otpornost zglobne hrskavice na kompresijske sile (23, 24, 27, 28).

Privlačenjem vode agregati proteoglikana se šire u opuštenom stanju, sve dok ne postignu ravnotežu s vlačnim silama kolagenskih vlakana. Pod kompresijom, voda se istiskuje, lanci GAG-a se zbližavaju, povećavajući kapacitet za bubrenje i balansirajući pritisak. Nakon uklanjanja pritiska, kapacitet za bubrenje se smanjuje, vraćajući tkivo u izvorno stanje ravnoteže. Kretanje vode unutar hrskavice tijekom ponavljajućih kompresijskih opterećenja ima važnu ulogu u prehrani hondrocita. S obzirom da je hrskavica avaskularno tkivo, nutrijenti joj dolaze iz sinovijalne tekućine putem difuzije, a otpadni proizvodi se uklanjaju na isti način. Proces istiskivanja vode tijekom kompresije pomaže u uklanjanju otpadnih materija, dok se povratkom vode, nakon smanjenja pritiska, olakšava dostava hranjivih tvari u hrskavicu. Za normalno funkcioniranje zglobne hrskavice važna je visoka koncentracija agregata, visok stupanj sulfatacije i sposobnost formiranja velikih agregata (24).

1.3.3. Degenerativne promjene agregata

Struktura i količina molekula agregata nisu konstantni tijekom života. Dolazi do promjena koje utječu na sintezu GAG-a i razgradnju središnjeg proteina i hijaluronske kiseline. Promjene se odnose na dužinu i obrazac sulfatacije GAG lanaca. Najznačajnija promjena u uzorku sulfatacije odnosi se na CS. Promjene u sintezi događaju se tijekom fetalnog i postnatalnog razvoja i stabiliziraju se do dvadesete godine života kada količina agregata doseže vrhunac, te potom opada zbog degenerativnih procesa. Gubitak agregata predstavlja rani događaj u

procesu degeneracije zglobne hrskavice, pri čemu niska stopa obnove agrekana dodatno doprinosi ovom procesu. MMP i ADAMTS su ključni u degradaciji agrekana. MMP 1, 8 i 13 djeluju kao kolagenaze, cijepajući trostruku uzvojnici kolagena, dok MMP 3 cijepa agrekan na različitim mjestima duž središnjeg proteina. ADAMTS4 i ADAMTS5 specifično razgrađuju agrekan u IGD i CS2 domeni. U razgradnji sudjeluju i određene cisteinske i serinske proteaze. Proteaza kalpain je uključena u fragmentaciju agrekana, dok cisteinska proteaza katepsin K sudjeluje u razgradnji kolagena u hrskavici. S obzirom da je poznato da katepsin K cijepa agrekan in vitro, pretpostavlja se da doprinosi ovom procesu i in vivo. Pored enzimske razgradnje dolazi i do neenzimske glikacije središnjeg proteina, što može narušiti njegovu interakciju s hijaluronskom kiselinom. Osim toga hijaluronska kiselina podliježe razgradnji pod utjecajem hijaluronidaza. Također, i proteinske i polisaharidne komponente mogu biti modificirane pod utjecajem reaktivnih kisikovih radikala, što dovodi do fragmentacije lanaca (24, 25).

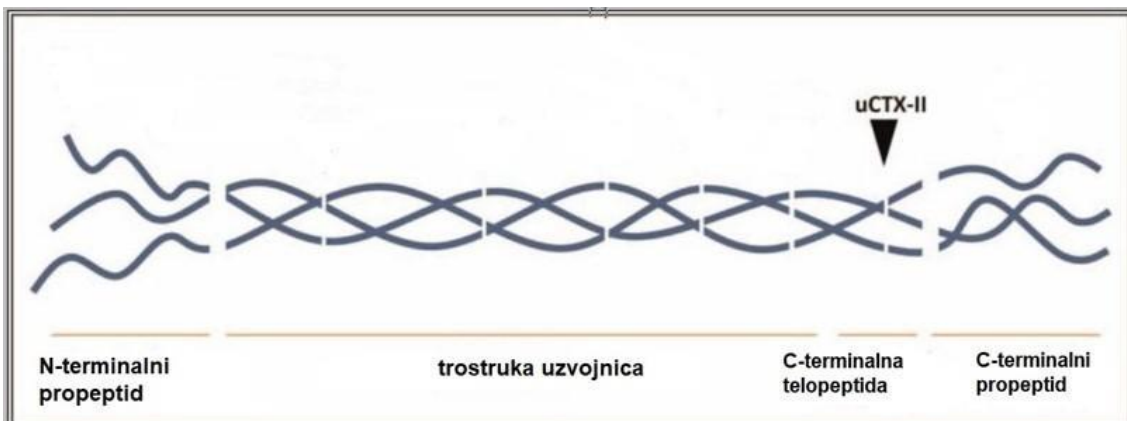
1.4. Biljezi pregradnje hrskavice CS846 i uCTX-II

Tijekom procesa pregradnje (engl. turnover) zglobne hrskavice dolazi do razgradnje i sinteze proteina ECM-a. Produkti razgradnje i sinteze mogu se detektirati u krvi i urinu i nazivaju se epitopima. Zbog toga se epitopi mogu koristiti kao biljezi koji odražavaju remodeliranje ECM-a. Nakon što dođe do degradacije hrskavice, fragmenti kolagena se oslobađaju u krvotok, a zatim se izlučuju putem urina. C-terminalni telopeptid kolagena tipa II predstavlja epitop koji se sastoji od niza aminokiselina i koji nastaje uslijed razgradnje kolagena tipa II pod utjecajem proteaza katepsina B, MMP-1, -3, -7, -9, -13 (slika 1.) (29).

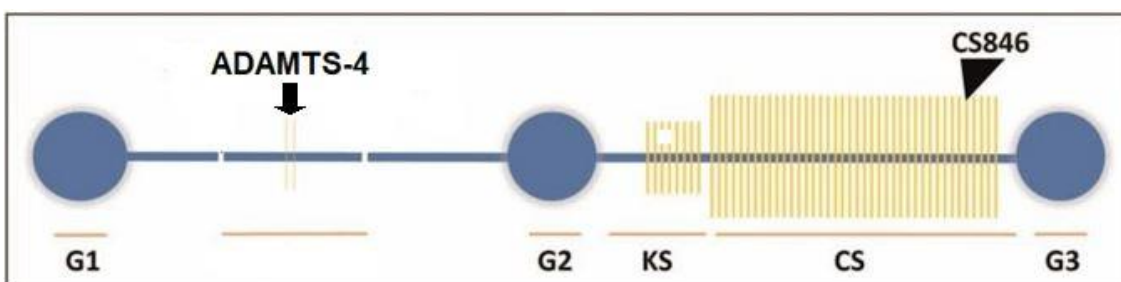
Istraživanja su otkrila da je epitop 846 hondroitin sulfata agrekana prirodno prisutan u fetalnoj ili juvenilnoj zglobnoj hrskavici, dok je u zrelih hrskavicama odraslih gotovo u potpunosti odsutan. Iako je odgovor zglobne hrskavice na oštećenje ograničen, dolazi do reakcije koja uključuje proliferaciju stanica i sintezu proteoglikana. Analizom agrekana iz hrskavice pogođene osteoartritisom utvrđen je obrazac sulfatacije hondroitin sulfata koji više odgovara onome u juvenilnoj hrskavici. Uočena je povećana prisutnost epitopa 846 u OA hrskavici.

Ovaj epitop, izražen na novo sintetiziranim molekulama agrekana, smješten je na hondroitin sulfatu blizu G3 domene (slika 2.). Pokazano je da epitop 846 pozitivno korelira s proizvodnjom agrekana i koristi se kao biljeg za njegovu sintezu. Specifično monoklonsko antitijelo koje se koristi u imunološkim testovima, identificira epitop 846 na novosintetiziranim molekulama agrekana. Pokazano je da smanjenje aktivnosti RA koincidira s povećanjem markera sinteze agrekana, epitopa CS846. Kod bolesnika s ranim, brzo napredujućim RA sa značajnim gubitkom zglobne hrskavice, primijećene su snižene razine CS846 što može ukazivati na inhibiciju sinteze agrekana. Prijašnje studije su zabilježile povišene koncentracije CS846 kod bolesnika s kroničnim RA. CS846 se koristio se za procjenu sinteze agrekana u bolesnika s RA koji su bili na terapiji inhibitorima TNF- α . Uočene su povišene razine CS846 što bi moglo ukazivati da antiupalna terapija dovodi do reparativne reakcije hondrocita i obnavljanja oštećenog matriksa (24, 27, 30-32).

CS846 i uCTX-II su biljezi pregradnje zglobne hrskavice, pri čemu CS846 ukazuje na sintezu agrekana, dok uCTX-II, koji odražava razgradnju kolagena tipa II, služi kao biljeg za degradaciju hrskavice. Iako biljezi predstavljaju obećavajući alat za praćenje promjena u HA, zasada nemaju kliničku primjenu. Standardne metode, poput kliničkog pregleda i slikovnih tehnika, glavni su alat za ocjenu težine i praćenje artropatije i pružaju informacije o prošlim dinamičkim procesima. Biljezi pregradnje zglobne hrskavice i kosti imaju potencijal za identifikaciju manjih promjena u ranoj fazi HA. Istraživanja biljega u HA karakterizira heterogenost, uključujući raznolikost populacija bolesnika, relativno male uzorke i nedostatak referentnog standarda za procjenu artropatije (30, 33, 34).



Slika 1. Kolagen tipa II se sastoji od tri alfa lanca. Tijekom razgradnje cijepa se na više mjesta u području trostruke uzvojnice i telopeptida. C-terminalni telopeptid, epitop sastavljen od niza aminokiselina, nastaje pod utjecajem proteaza.



Slika 2. Agrekan se sastoji od tri globularne domene G1-G3 i dvije interglobularne domene. C-terminalna interglobularna domena sadrži područja bogata keratan sulfatom (KS) i hondroitin sulfatom (CS). Agrekanaze ADAMTS cijepaju fragmente u području N-terminalne interglobularne domene. Epitop CS846 je biljeg stvaranja agrekana. (Slike 1. i 2. preuzete su i prilagođene iz: Bay-Jensen AC, Mobasheri A, Thudium CS, Kraus VB, Karsdal M. Blood and urine biomarkers in osteoarthritis – an update on cartilage associated type II collagen and aggrecan markers. *Curr Opin Rheumatol.* 2022 Jan 1;34(1):54-60. (35))

1.4.1. Istraživanja CS846 i uCTX-II u ocjeni težine hemofilične artropatije

U istraživanjima koja procjenjuju potencijal biljega u ocjeni težine artropatije koriste se radiološki i/ili klinički skorovi za ocjenu težine bolesti (36, 37). Dosadašnja istraživanja o ulozi CS846 i uCTX-II u ocjeni HA pokazala su različite

rezultate. Dok je studija Jansena (38) identificirala povezanost oba biljega s radiološkim skorom, studija Oldenburga (39) zabilježila je povezanost CS846 s MR skorom samo među ispitanicima s teškom hemofilijom koji su liječeni prema potrebi. Studija Kloostermana (40) nije uočila povezanost između CS846 i MR skora i pokazala je slabu povezanost uCTX-II s MR skorom. Studija Putza (41) istraživala je korelaciju između CS846, uCTX-II i kliničkog skora i nije pronašla značajne povezanosti.

Osim procjene težine bolesti, značaj CS846 i uCTX-II istraživani su i u drugim kontekstima. Studija Pullesa (42) usmjerila se na istraživanje prognostičke vrijednosti ovih biljega, dok je istraživanje van Vulpena (43) bilo fokusirano na analizu dinamike promjena njihovih vrijednosti nakon krvarenja u zglob. Studija van Bergena (44) je ispitala vrijednost ovih biljega u dijagnozi aktivne subkliničke sinovijalne proliferacije.

U studiji Jansena i sur. (2009. god.), (38) prvoj koja je istraživala biljege u HA, analizirani su serumski CS846 i CTX-I te urinarni CTX-II. Uz navedene, u serumu su kvantificirali i CTX-II, COMP, C1,2C i C2C (produkti cijepanja kolagena tipa I i II), dok je u urinu analiziran CTX-I. Studija je obuhvatila 36 ispitanika (31 hemofilija A, 5 hemofilija B; prosječna dob 35 ± 2 godine) s različitim stupnjemima HA (teška i umjerena hemofilija). Težina HA procijenjena je radiološkim Petterssonovim skora koji boduje promjene u laktovima, koljenima i gležnjevima. Rezultati su pokazali statistički značajne korelacije između uCTX-II, C1,2C i CS846 i ukupnog Petterssonovog skora ($r=0,387$, $p=0,010$; $r=0,314$, $p=0,033$; $r=0,312$, $p=0,032$) i sa suženjem zglobnog prostora ($r=0,348$, $p=0,019$; $r=0,291$, $p=0,045$; $r=0,424$, $p=0,005$). COMP je pokazao statistički značajnu, ali slabu korelaciju sa suženjem zglobnog prostora ($r=0,284$, $p=0,047$). Nije bilo povezanosti između koštanih biljega serumski/urinarni CTX-I i C1,2C sa značajkama Petterssonovog skora koji se odnose na koštane promjene (osteoporoza i erozije na rubovima zglobova). Kako bi se pojačala korelacija pojedinih biljega, autori su koristili kombinirane indekse. Posebno se istaknula kombinacija uCTX-II, COMP i CS846, koja je pokazala najbolju povezanost s ukupnim Petterssonovim skorom ($r=0,672$, $p<0,001$) i suženjem zglobnog

prostora ($r=0,698$, $p<0,001$), sugerirajući njihovu potencijalnu ulogu u procjeni i praćenju HA.

Studija Oldenburga i sur. (2016. god.), (39) bila je prva koja je istraživala povezanost između potencijalnih biljega za HA i MR skora koljena i gležnjeva u bolesnika s teškom hemofilijom. U ovom istraživanju uključeno je 117 ispitanika u dobi od 12 do 35 godina koji su primali terapiju profilaktički ili prema potrebi. Analiza je obuhvatila biljege iz krvi povezane s degradacijom hrskavice i kosti i angiogenezom, uključujući COMP, TIMP-1 (engl. tissue inhibitor of metalloproteinase 1), VEGF, MMP3 i MMP9, kao i CTX-I i CS846, koji su analizirani u našem istraživanju. Vrijednosti svih biljega bile su unutar normalnih raspona bez korelacija s MR skorom. Iznimka je bio CS846, za kojeg još nije definiran normalni raspon, pokazana je značajna povezanost s MR skorom samo u subgroupi od 22 bolesnika liječenih po potrebi ($r=0,436$, $p=0,04$). Ovaj nalaz sugerira potencijalnu korelaciju između razine CS846 i učestalosti krvarenja, iako povezanost nije definitivno potvrđena zbog činjenice da je većina bolesnika bila na profilaktičkom liječenju. Rezultati ove studije ukazuju da MR i biljezi daju komplementarne informacije: MR pokazuje akumulirano oštećenje zglobova tijekom života, dok biljezi odražavaju trenutnu aktivnost bolesti. Rezultati CS846 podupiru korist profilaktičkog liječenja.

U studiji iz 2020. godine, Putz i sur. (41) su usporedili vrijednosti biljega degradacije hrskavice u 18 bolesnika s teškom i umjerenom hemofilijom (dob 18-49, prosječno 29,5 godina, na profilaktičkoj terapiji) sa zdravim kontrolama. Nisu uočene statistički značajne razlike u razinama COMP, C1,2C, CS846 i uCTX-II između oboljelih i zdravih ispitanika (medijani: 199,5 vs. 212,7, $p=0,819$; 0,37 vs. 0,41, $p=0,162$; 1794 vs. 2011, $p=0,134$; 468 vs. 272, $p=0,253$). Iako nisu statistički značajne, razine uCTX-II bile su znatno više u BSH. Izračunat je kombinirani skor biljega od prosječnih vrijednosti COMP, C1,2C, CS846 i uCTX-II, ali nije bilo razlika između dviju grupa (47,0 vs. 48,7, $p=0,658$), niti je uočena korelacija s kliničkim HJHS (engl. Hemophilia Joint Health Score) skorom ($r=0,22$, $p=0,388$). Razine vitamina D nisu se značajno razlikovale između BSH i zdravih (medijani 30,2 vs. 29,3, $p=0,585$). Međutim, značajan deficit vitamina D ispod 25 nmol/L se češće javljao u BSH (7,4 %) u odnosu na zdrave (5,2 %).

Kloosterman i sur. (2023. god.), (40) istraživali su povezanost između biljega i MR-a u osoba s umjerenom i blagom hemofilijom. Studija je obuhvatila 48 sudionika (17 s umjerenom i 31 s blagom hemofilijom), s medijanom dobi od 43 godine (raspon: 24-55 godina). Većinu su činili bolesnici koji su se liječili po potrebi (n=45), dok je nekoliko njih bilo na profilaktičkom tretmanu (potpuna profilaksa n=1, povremena profilaksa n=2). Analizirani su uCTX-II i CS846. U serumu su analizirani i drugi biljezi, uključujući one za degradaciju hrskavice (COMP, C2M), formaciju hrskavice (PRO-C2), upalu (osteopontin, VCAM-1) te vaskularno remodeliranje (C4M i PRO-C4). Nije pronađena jaka korelacija između biljega i ukupnog IPSTG (engl. International Prophylaxis Study group) MR skora, te sa dva podskora: mekotičnog (koji obuhvaća hipertrofiju sinovije, izljev, depozite hemosiderina) i osteohondralnog (koji obuhvaća erozije, oštećenja hrskavice i subhondralne ciste). Nije primijećena korelacija između CS846 i ukupnog IPSTG MR skora, kao ni s podskorovima. Slabe negativne korelacije uočene su između uCTX-II i ukupnog IPSTG MR skora i ($R_s = -0,31$; $p = 0,03$), te sa podskorom mekog tkiva ($R_s = -0,36$; $p = 0,01$). Autori zaključuju da biljezi koji odražavaju različite aspekte HA nisu pokazali korelaciju s MR-om. Rezultati sugeriraju da sistemski mjereni biljezi trenutno nisu adekvatni za identifikaciju blažih oštećenja zglobova kod bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom.

U retrospektivnoj studiji iz 2018., Pulles i sur. (42) istraživali su prognostičku vrijednost biljega iz prethodne presječne studije Jansena i sur. (38) u predviđanju radiološke progresije HA. Od početnih 36 ispitanika, njih 31 (28 s teškom i 3 s umjerenom hemofilijom) završilo je studiju. Praćenje je trajalo prosječno 6,5 godina, uz kontrolni RTG i Petterssonov skor svakih pet godina, gdje je srednja godišnja progresija skora bila 0,2 boda (interkvartilni raspon 0,0-0,3). Sedam ispitanika (22,6 %) svrstano je u skupinu brzih radioloških progresora, s progresijom većom od 0,4 boda godišnje. Nijedan pojedinačni biljeg izmjeren 2009. godine nije pokazao prognostičku vrijednost. No, kombinirani indeks uCTX-II i CS846 bio je značajno povezan s radiološkom progresijom (OR 8,8, 95 % CI: 1,1-70,6, $p=0,04$). Ovaj prediktivni model kombiniranog indeksa pokazao je umjerenu diskriminativnu sposobnost s površinom ispod krivulje (engl. area under the curve, AUC) od 0,77 (95 % CI: 0,60-0,95) i značajno je

razlikovao spore od brzih radioloških progresora (medijan -0,095 vs. 0,33, $p=0,03$). Zaključak studije je da kombinirani indeks uCTX-II i CS846 ima potencijalnu vrijednost u predviđanju progresije HA.

U studiji van Vulpena i sur. (43) istražena je osjetljivost biljega na promjene koje nastaju nakon krvarenja u zglob u 10 ispitanika s hemofilijom (7 s teškom, 3 s umjerenom hemofilijom, dob 18-71, prosječna 53 godine). Analiza je obuhvatila serumski COMP, C1,2C i CS846, te urinarni CTX-II. Petog dana nakon krvarenja u zglob, zabilježeno je značajno povećanje razine uCTX-II (+52 %, $p=0,021$) i CS846 (+14 %, $p=0,011$) u usporedbi s osnovnim vrijednostima. Nakon 14 dana, koncentracije su se smanjile, približivši se početnim vrijednostima za uCTX-II (+16 %, $p=0,037$) i za CS846 (+2 %, $p=0,285$). Kako bi znali osnovne vrijednosti biljega, 90 dana nakon krvarenja uzeti su uzorci krvi i urina. Razine COMP i C1,2C nisu pokazale značajne promjene tijekom promatranog razdoblja ($p=0,435$ i $p=0,316$). Među analiziranim biljezima, uCTX-II je pokazao najveću promjenu, s povećanjem na približno 150 % osnovne vrijednosti. Rezultati ove studije sugeriraju da se porast specifičnih biljega može detektirati nakon jednog krvarenja u zglob kod bolesnika s HA, ukazujući na njihov potencijal kao alata u detekciji oštećenja zglobova. Ovo istraživanje potvrđuje da jedno krvarenje može inducirati značajne promjene u homeostazi zgloba.

U studiji van Bergena i sur. (2023. god.) (44) koja je obuhvatila 79 bolesnika s teškom hemofilijom (srednja dob 31 godina, raspon 16,5–50,8 godina), istraživan je potencijal biljega u identificiranju bolesnika s aktivnom subkliničkom sinovijalnom proliferacijom koja je dijagnosticirana u laktovima, koljenima i gležnjevima kliničkim, ultrazvučnim (HEAD-US) i Power Doppler pregledom. Kod jednakog broja bolesnika (22 %) zabilježena je kako aktivna, tako i inaktivna forma proliferacije. Analizirani su serumski biljezi upale, osteopontin i sVCAM-1 (engl. soluble vascular cell adhesion molecule 1), osteohondralni biljezi Coll2-1, COMP, CS846, TIMP, te uCTX-II. Otkriveno je da biljezi nisu pokazali statistički značajne razlike među bolesnicima s aktivnom, inaktivnom ili bez sinovijalne proliferacije. Kombinirani indeksi upalnih i osteohondralnih biljega nisu pokazali korelaciju s aktivnom subkliničkom

proliferacijom sinovijalne membrane, što pokazuje da nisu učinkoviti za njezinu detekciju.

1.5. Disintegrin i metaloproteinaza s motivom trombospondina – 4 (ADAMTS-4)

Disintegrin i metaloproteinaze s motivima trombospondina, poznate kao ADAMTS, su skupina proteinaza koje zajedno sa matriks-proteinazama (MMP) pripadaju velikoj nadobitelji cink metaloproteinaza poznatih pod nazivom metzincini. Karakteristična struktura ovih enzima uključuje metioninski ostatak blizu aktivnog mjesta s cinkovim ionom. ADAMTS i MMP sudjeluju u fiziološkim i patološkim procesima pregradnje ECM-a (45).

Ljudska obitelj ADAMTS enzima uključuje 19 članova koji se prema funkciji dijele u četiri skupine. Prvu skupinu čine agrekanaze (ADAMTS-1, -4, -5, -8, -15), a drugu proteoglikanaze (ADAMTS-9 i -20). Agrekanaze osim na agrekan djeluju i na druge proteoglikane. Prokolagen-N-peptidaze (ADAMTS-2, -3 i -14) sudjeluju u sintezi kolagena, dok ADAMTS-13, proteinaza von Willebrandova faktora, ima ulogu u koagulaciji. U četvrtu skupinu (ADAMTS-6, -10, -16, -17, -18 i -19) pripadaju i ADAMTS-7 i -12 koji sudjeluju u pregradnji hondroitin-sulfatnih lanaca u hrskavici (45).

Osnovna struktura ADAMTS-a uključuje katalitičku metaloproteinaznu domenu i karboksi-terminalnu pomoćnu domenu koja određuje specifičnost supstrata. Unutar metaloproteinazne domene nalazi se katalitička jedinica koja obuhvaća tri histidinska ostatka raspoređene oko iona cinka i niz metionina. Unutar ove domene nalazi se i disintegrinski segment (engl. disintegrin-like). Prodomena se nalazi ispred katalitičke jedinice. Pomoćna domena sadrži trombospondin tip-1 motiv (TSR), domenu bogatu cisteinom i spacer domenu. TSR dio se sastoji od približno 50 aminokiselina podudarnih s onima u trombospondinu 1. Domena bogata cisteinom sastoji se od približno 100 aminokiselina, dok dužina spacer regije varira. Nakon spacer domene dolazi varijabilan broj TSR motiva, te segmenti bitni za prepoznavanje ciljnog supstrata.

ADAMTS enzime inhibiraju tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMPs), pri čemu TIMP3 djeluje kao inhibitor ADAMTS-4 (45).

ADAMTS-4, prvi identificirani član ADAMTS proteaza i poznat kao agrekanaza-1, zajedno s ADAMTS-5 (agrekanaza-2), smatraju se primarnim za degradaciju agrekana u hrskavici. Zbog toga bi mogli biti važni biljezi zglobnih bolesti. Gubitak agrekana je kritičan u ranoj fazi destrukcije zglobne hrskavice, što dovodi do degradacije kolagenih vlakana (46).

ADAMTS-5 sadrži dodatnu trombospondin domenu koja slijedi nakon spacer domene. Agrekanaze cijepaju središnji protein agrekana na vezi glutamat-alanin (Glu373-Ala374) u interglobularnoj regiji (45, 47).

Regulacija aktivnosti agrekanaza je bitna za održavanje ravnoteže između izgradnje i razgradnje agrekana. U OA dolazi do narušavanja ravnoteže između TIMP-3 i aktivnosti ADAMTS-4 u prilog katabolizma. ADAMTS-4 može cijepati različite proteoglikane, uključujući brevikan, versikan, dekorin i fibromodulin, te COMP (48).

Istraživanja su pokazala da postoji različita regulacija gena ADAMTS-4 i ADAMTS-5. Ekspresija mRNA ADAMTS-4 u ljudskoj hrskavici i hondrocitima aktivira se proupalnim citokinima IL-1 β i TNF- α , dok se mRNA ADAMTS-5 konstitutivno izražava i nije regulirana citokinima. Osim toga, primijećen je porast ADAMTS-4 pod utjecajem TGF- β u zglobnoj hrskavici. Inhibicija ekspresije ADAMTS-4 u ljudskim sinoviocitima postiže se upotrebom TNF- α blokatora etanercepta i antitijela protiv IL-1 β . Nasuprot tome, ekspresija ADAMTS-5 u istim stanicama ostaje nepromijenjena, neovisno o neutralizaciji IL-1 β ili TNF- α , bilo pojedinačno ili u kombinaciji (47, 48).

ADAMTS-4 i ADAMTS-5 su najzastupljeniji u hrskavici i sinoviji bolesnika s OA i RA, te se smatraju glavnim agrekanazama. Uočeno je da inhibicija ovih enzima dovodi do prevencije degradacije agrekana in vitro. Unatoč brojnim studijama usmjerenim na određivanje dominantnog enzima u procesu razgradnje agrekana u ljudskoj hrskavici, ta specifičnost još uvijek nije potpuno razjašnjena. Rezultati istraživanja sugeriraju da je ADAMTS-4 glavna agrekanaza u ljudi s OA, s obzirom da se selektivno prekomjerno izražava i pozitivno korelira s oštećenjem

hrskavice. S druge strane, ADAMTS-5 se izražava slično u normalnoj i OA hrskavici (47, 48). TNF- α inducira ekspresiju ADAMTS-4 u hondrocitima u ljudskom OA (49). Mimata i sur. istraživali su učinak IL-6 na ekspresiju ADAMTS-4 i ADAMTS-5 u fibroblastima u sinoviji u RA i pokazali su da pojačava ekspresiju ADAMTS-4 (50).

U istraživanju koje su proveli Li i sur., proučavali su povezanost serumskih razina ADAMTS-4, ADAMTS-5, MMP-1 i MMP-3 i težine OA koljena. Zaključili su da je ADAMTS-4 značajno viši u ranom OA u usporedbi s umjerenim i naprednim stadijima OA i zdravim kontrolama. Razine ADAMTS-5 i MMP-a su bile više u umjerenom i naprednom OA u odnosu na rani OA i zdrave kontrole (51).

Druga studija je pokazala da su razine ADAMTS-4 u sinovijalnoj tekućini značajno više u kasnom OA koljena u usporedbi s ranim OA i kontrolnom grupom (52). Istraživani su ADAMTS-4 i ADAMTS-9 u sinovijalnoj tekućini vezano za napredovanje OA koljena, i nije pronađena značajna razlika u razinama ADAMTS-4 kod ispitanika sa 3. i 4. stupnjem OA (53).

Studija koja je analizirala ADAMTS-4 u sinovijalnoj tekućini kod bolesnika s ozljedom koljena ili OA pokazala je da su razine ADAMTS-4 najjače povezane s intenzitetom upale i veličinom izljeva (54).

Rezultati istraživanja razina ADAMTS-4 i ADAMTS-5 te njihovog proteolitičkog produkta ARGxx u sinovijalnoj tekućini bolesnika s različitim fazama OA koljena pokazali su da su razine ADAMTS-4 bile više u ranoj fazi u usporedbi sa srednjom ili kasnom fazom OA. Također su više korelirale s ARGxx nego ADAMTS-5, što sugerira da bi ADAMTS-4 mogao biti glavna agreganaza u degradaciji agregana u ljudskom OA (55).

1.6. Koštana pregradnja

Kosti su sastavljene od gustog vanjskog kortikalnog sloja i unutarnje spužvaste trabekularne strukture. Mineralizirano tkivo čini 90 % kortikalne kosti što omogućuje mehaničku funkciju kosti. Trabekularna kost sadrži oko 20 % mineraliziranog tkiva, a preostali dio čini koštana srž, krvne žile i mezenhimalne

matične stanice. Kostí imaju mehaničku i metaboličku ulogu i predstavljaju glavni izvor kalcija i fosfora u organizmu. Anorganski mineralni sadržaj čini 50-70 % koštanog matriksa, voda čini 5-10 %, a preostali dio čini organski dio (14, 56).

Koštana pregradnja je osnovni proces obnove koštanog tkiva u kojem osteoblasti sudjeluju u izgradnji, a osteoklasti u razgradnji kosti. Osteoblasti su mononuklearne stanice koje nastaju iz mezenhimalnih matičnih stanica. Oni proizvode kolagene i nekolagene proteine, formirajući osteoid, organski dio koštanog matriksa. Osim toga imaju ulogu u procesu mineralizacije osteoida s hidroksiapatitom (56-58).

Osteoblasti proizvode proteoglikane, glukoproteine i enzime poput alkalne fosfataze (ALP). Osnovni proteinski element kosti je kolagen tipa I, koji formira lamelarnu strukturu i povećava otpornost kosti na mehanička opterećenja. Kostí sadrže nekolagene proteine kao što su osteokalcin i osteopontin, koji sudjeluju u regulaciji mineralizacije (14, 56).

Osteoklasti su multinuklearne stanice koje potječu iz hematopoetskih monocitnih prekursorskih stanica i sudjeluju u resorpciji kosti. Oni razgrađuju koštani matriks izlučujući enzime poput tartarat rezistentne kisele fosfataze, katepsina K i MMP-a. Ovaj proces uključuje demineralizaciju anorganskih sastojaka i uklanjanje organskog matriksa. Osteoklasti otpuštaju minerale, uključujući kalcij, radi održavanja normalne koncentracije u serumu (14, 56, 58).

Enzimi osteoklasta cijepaju komponente koštanog matriksa što dovodi do stvaranja dijelova kolagenih vlakana, N-terminalnih (Ntx) i C-terminalnih telopeptida (Ctx) kolagena tipa I (59).

Pregradnja kosti je kontinuirani proces tijekom cijelog života koji održava homeostazu skeleta i kalcija. Lokalni čimbenici, uključujući interakcije između osteoklasta i osteoblasta, kao i sustavni imunološki i neuroendokrini faktori, igraju ulogu u regulaciji pregradnje. Neravnoteža u remodeliranju kostiju utječe na njihovu čvrstoću, kada resorpcija premašuje formiranje, dolazi do smanjenja BMD-a, mijenja se arhitektura i povećava poroznost (56, 58).

1.6.1. Biljezi pregradnje kosti

Analiza serumskih i urinarnih biljega, koji su rezultat djelovanja osteoblasta i osteoklasta, predstavlja važan alat u kliničkoj praksi za ocjenu koštane pregradnje i razumijevanje patogeneze bolesti koštanog sustava, kao što je osteoporoza. Biljezi omogućuju neinvazivno praćenje i procjenu kvalitete koštanog tkiva (57-60). Biljezi pregradnje kostiju mogu biti proteini i razgradni produkti organskog koštanog matriksa, enzimi, te markeri anorganskog koštanog matriksa kalcij i fosfor (58, 61).

U procjeni metabolizma kostiju preporuča se kombinacije biljega formiranja i resorpcije, jer pojedinačni biljezi obično imaju slabu osjetljivost i prediktivnu vrijednost (62). Često korišteni serumski biljezi formiranja kostiju su osteokalcin i koštana ALP, koji se oslobađaju u različitim fazama proliferacije i diferencijacije osteoblasta. Jedan od često korištenih biljega za resorpciju kostiju je C karboksi terminalni telopeptid kolagena tipa I (CTX), koji mjeri fragmente peptida proizašle iz degradacije kolagena tipa I. Katepsin K je enzim koji pripada obitelji proteaza i ključan je u razgradnji kolagena tipa I, što dovodi do stvaranja CTX-a (61, 62).

Serumska ALP sastoji se od nekoliko izoenzima koje dolaze iz različitih tkiva, kao što su jetra, kosti, crijeva, slezena i bubreg. Od ukupne aktivnosti ALP, oko 40-50 %, kod odraslih osoba s normalnom funkcijom jetre, potječe iz kostiju. Izoenzimi se uglavnom razlikuju po svom ugljikohidratnom sadržaju. Koštana ALP je koštano specifični izoenzim ALP, rezultat je aktivnosti osteoblasta i ima ulogu u mineralizaciji osteoida. Koštana ALP izravno mjeri aktivnost osteoblasta i ima manju biološku varijabilnost u usporedbi s drugim biljezima izgradnje kostiju (57, 58, 62).

Osteokalcin (OC), također nazivan koštani Gla protein, je nekolageni protein kojeg sintetiziraju osteoblasti i ima ulogu u mineralizaciji matriksa. OC se veže za hidroksiapatit i s obzirom da se nalazi u mineralizirajućim tkivima, pokazatelj je sinteze kosti. OC je ovisan o vitaminu K i D i najzastupljeniji je nekolagenski protein u koštanom matriksu. Fiziološka uloga OC povezana je s njegovim visokim afinitetom prema kalciju što potiče vezanje za hidroksiapatit i nakupljanje u koštanom matriksu. Prednosti OC je njegova specifičnost za tkivo i relativno niska varijabilnost unutar iste osobe (57, 58, 60-62).

1.6.2. Istraživanja CTX-I, osteokalcina i koštane ALP u hemofiličnoj artropatiji

U usporedbi sa zdravim ispitanicima, dječaci s teškom HA pokazuju znatno niže vrijednosti serumskog 25(OH)vitamina D ($9,1 \pm 4,9$ vs. $42,2 \pm 6,8$ ng/mL, $p=0,034$) i OC ($2,76 \pm 2,08$ vs. $7,22 \pm 1,66$ ng/mL, $p=0,024$). Istraživanje je pokazalo negativnu korelaciju između 25(OH)vitamina D i OC i kliničkog skora zglobova CHPJES (engl. Colorado Haemophilia Paediatric Joint Physical Examination Scale), ($r= -0,323$, $p=0,021$) i ($r= -0,313$, $p=0,014$) (63).

Studija Anagnostisa i sur. (64) obuhvatila je 70 bolesnika s hemofilijom starijih od 18 godina. Artropatija koljena i gležnjeva je ocijenjena s radiološkim skorom. Utvrđeno je da bolesnici s niskim BMD-om imaju značajno više koncentracije koštane ALP u usporedbi s bolesnicima s normalnim BMD ($12,8 \pm 1,60$ vs. $9,72 \pm 0,58$ $\mu\text{g/L}$, $p = 0,009$). Koncentracije CTX-I bile su negativno povezane s BMD-om kuka i pozitivno s HIV infekcijom, brojem zahvaćenih zglobova i radiološkim skorom. Koncentracije koštane ALP i OC bile su negativno povezane s BMD-om kuka, težinom hemofilije, te pozitivno s brojem zahvaćenih zglobova.

Studija Giordana i sur. (65) koja je obuhvatila dječake s teškom hemofilijom A ($n=44$) i kontrolnu skupinu, nije pokazala značajne razlike u srednjim vrijednostima CTX-I ($1,17 \times 10^{-3}$ vs. $1,28 \times 10^{-3}$ ng/l) i ALP (206,55 vs. 238 u/l) između BSH i kontrolne skupine. Međutim, zabilježen je značajno viši OC kod BSH u odnosu na kontrolnu skupinu (10,09 vs. 6,54 nmol/l, $p < 0,01$). S druge strane, 25(OH)-vitamin D bio je niži kod BSH (69,15 vs. 96,60 nmol/l, $p < 0,01$). U istraživanju je također utvrđena značajna negativna korelacija između razina 25(OH)-vitamina D i kliničkog skora HJHS kod BSH ($r = -0,296$, $p = 0,0001$). Nije pokazana korelacija između OC i kliničkog skora.

U studiji Christoforidisa i sur. (66) koja je obuhvatila 26 dječaka s hemofilijom (9 s umjerenom i 17 s teškom) i kontrolnu skupinu, rezultati su pokazali da su razine serumskog OC značajno više u BSH (srednje vrijednosti: $5,35 \pm 2,29$ vs. $3,09 \pm 0,61$ ng mL⁻¹ u kontroli, $p=0,002$). Međutim, nije bilo značajne razlike u razinama ALP između BSH i kontrole. Također, nije utvrđena

značajna povezanost između OC i ALP s kliničkim HJHS skorom ($r=0,047$, $p=0,840$ i $r= -0,306$, $p=0,202$).

Studija s 35 odraslih osoba s teškom hemofilijom A i B (dob 30 ± 8) i kontrolnom skupinom pokazala je značajno niže vrijednosti 25(OH)vitamina D u BSH ($12 \mu\text{g/L}$ vs. $26 \mu\text{g/L}$, $p<0,001$). Međutim, nije bilo značajne razlike u razinama ALP između BSH i kontrole (89 vs. 79 U/L , $p=0,076$) (67).

Rezultati studije s 89 bolesnika s hemofilijom (61 % blaga, 21 % umjerena, 18 % teška hemofilija, u dobi 46 ± 15 godina) pokazali su deficit 25(OH)vitamina D s prosječnim vrijednostima od $21,31 \pm 10,9 \text{ ng/mL}$ (68). U studiji s 30 bolesnika (dob 16-49) s teškom hemofilijom, 25(OH) vitamin D nije pokazao korelaciju s IPGS MR skorom, a razine su bile ispod normalnih vrijednosti u 70 %, a tek neznatno iznad normale u 27 % ispitanika (69).

Možemo zaključiti da rezultati svih navedenih studija pokazuju konzistentno niže razine vitamina D u BSH u usporedbi s kontrolnim skupinama (63, 65, 67, 68) što sugerira deficit vitamina D u ovoj populaciji. Dodatno, negativna korelacija između vitamina D i kliničkog skora zglobova zabilježena je u dvije studije (63, 65).

Rezultati za OC su heterogeni. Dok je jedna studija (63) pokazala niže vrijednosti OC u BSH, druge studije (65, 66) su pokazale više vrijednosti. Što se tiče korelacije s kliničkim skorom zglobova, samo jedna studija (63) je pokazala negativnu korelaciju, dok druge dvije (65, 66) nisu pronašle značajnu povezanost.

Nije utvrđena značajna razlika u razinama ALP između BSH i kontrolnih skupina, kako pokazuju prijašnje studije (65-67). Također, nije pronađena značajna povezanost između ALP i kliničkog skora (66).

Dok je studija s odraslima s hemofilijom (64) pokazala povezanost CTX-I s brojem zahvaćenih zglobova, studija s dječacima s hemofilijom (65) nije našla značajnu razliku u razinama CTX-I između BSH i kontrolne skupine.

Nadalje, Jansen i sur. (38) nisu pronašli povezanost između serumskog/urinarnog CTX-I sa ukupnim Pettersonovim skorom i sa značajkama koji se odnose na koštane promjene u odraslih bolesnika sa HA. Slično tome, Oldenburg (39) i Plut (69) izvijestili su da su vrijednosti CTX-I kod odraslih

bolesnika s HA bile unutar normalnih raspona i nisu pokazivale korelacije s MR skorom. Međutim, Hua (70) je u svojoj studiji utvrdio da je CTX-I bio povišen za 30 % ($p < 0.001$) u odraslih bolesnika s HA u odnosu na kontrolnu skupinu.

Istraživanje provedeno 2011. godine u Centru za hemofiliju KBC Zagreb obuhvatilo je 39 bolesnika s teškom hemofilijom, 19 bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom (prosječne dobi $41,15 \pm 13,76$ godina) i kontrolnu skupinu. Nije pronađena značajna razlika u vrijednostima OC između bolesnika s teškom hemofilijom i onih s umjerenom i blagom hemofilijom. Isto tako nije pronađena razlika između BSH i kontrolne skupine. Vrijednosti koštane ALP su pokazale statistički značajnu razliku između BSH i kontrolne skupine (37,30 vs. 9,30 IU/l, $p = 0,000$), dok razlika između bolesnika s teškom i onih s umjerenom i blagom hemofilijom nije bila statistički značajna (40,00 vs. 34,50 IU/l, $p = \text{NS}$). Za vrijednosti β -crosslapsa nije pronađena statistički značajna razlika između BSH i kontrola (0,22 vs. 0,23 $\mu\text{g/l}$, $p = \text{NS}$), kao ni između grupa bolesnika s teškom i onih s blagom i umjerenom hemofilijom (0,22 vs. 0,25 $\mu\text{g/l}$, $p = \text{NS}$). Vrijednosti OC, koštane ALP i β -crosslapsa nisu bile povezane s prisutnošću protutijela na faktor VIII ili infekcijom virusom hepatitisa C (71).

Povezanost CTX-I, ALP i OC s kliničkim i radiološkim skorovima HA pokazuje varijabilne rezultate u različitim studijama. Dok neka istraživanja ukazuju na postojanje korelacije između ovih biljega i težine artropatije, druga nisu uspjela pronaći značajne veze. Ovaj raspon rezultata može biti dijelom objašnjen različitim starosnim skupinama koje su obuhvaćene u studijama. Razlike u metaboličkim procesima, razvoju kosti i progresiji artropatije između djece i odraslih mogu značajno utjecati na razinu i ulogu biljega.

1.7. Slikovne metode u hemofiličnoj artropatiji

Konvencionalna radiografija je ograničena u detekciji ranih osteohondralnih promjena u početnim fazama artropatije. Iako su rendgenske snimke efikasne u otkrivanju kasnijih promjena, poput suženja zglobnog prostora i subhondralnih cisti, one nisu optimalne za dijagnosticiranje ranih promjena zgloba (33, 34, 72, 73).

MR predstavlja zlatni standard u slikovnoj dijagnostici mišićno-koštanog sustava. MR efikasno vizualizira rane promjene mekog tkiva, taloženje hemosiderina, hipertrofiju sinovijalnog tkiva i identifikaciju subkliničkih hemartroza, te omogućava detaljnu procjenu hrskavice i subhondralne kosti. Iako je MR izuzetno koristan za rano otkrivanje promjena u zglobovima, njegova upotreba u kliničkoj praksi je ograničena zbog visokih troškova, dugotrajnih procedura i relativne nedostupnosti, te u kontekstu pedijatrijskih bolesnika koji često zahtijevaju sedaciju (33, 34, 72, 73).

UZV, u usporedbi s MR-om, ima prednosti uključujući niže troškove i bolju dostupnost, te ne zahtijeva sedaciju. UZV omogućuje detaljnu i dinamičku evaluaciju sinovijalnih zglobova i periartikularnih struktura koristeći sonde visoke rezolucije i frekvencije i Power Doppler (PD) signal (74). UZV se koristi za prikaz izljeva u zglob, hipertrofiju sinovije i nepravilnosti osteohondralnih površina (33, 34, 72, 73).

Nedostatak UZV leži u nemogućnosti pristupa središnjim površinama zbog ograničenja prenošenja zvuka kroz kosti. To ograničava otkrivanje osteohondralnih poremećaja u središnjim područjima koja nose opterećenje. Nedostatak UZV uključuje i ovisnost o vještini ultrasoničara (33, 34, 72, 73, 75, 76).

Power Doppler-om se analizira aktivnost sinovitisisa ocjenom hipervaskularnosti. Ovo je značajno s obzirom da vaskularno remodeliranje i angiogeneza igraju ulogu u razvoju HA. Postoje dokazi da pojačani PD signali koreliraju s akutnom boli i većim brojem krvarenja, te da se signali povećavaju tijekom akutnih krvarenja (74).

Prospektivna studija pratila je skupinu odraslih bolesnika s HA (n=26) kroz dvije godine. Krvarenje u zglobovima i sinovitis s promjenama sinovijalne vaskularnosti dijagnosticirani su pomoću UZV i PD-a. Tijekom bolnih epizoda UZV i PD skor ostali su relativno nepromijenjeni u odsustvu krvarenja, dok su značajno porasli tijekom krvarenja u zglob (77).

Međutim, intraartikularna hiperemija rijetko se opaža kod hemofiličara, a u rijetkim pozitivnim slučajevima, vizualizira se samo nekoliko signala protoka krvi, što sugerira blagu hipervaskularnost (33). Razvijeni su razni UZV protokoli za

procjenu zglobova u HA, međutim potrebna je sistematizacija i konsenzus oko protokola kako bi se omogućila usporedba rezultata. Iako je UZV manje osjetljiv na rane promjene zglobova u odnosu na MR, njegova pristupačnost čine ga vrijednim alatom u kliničkoj praksi. Dodatno, UZV omogućava procjenu više zglobova istovremeno, što je značajna prednost u odnosu na MR (33, 34, 72, 73).

Sistematski pregledni članak zaključio je da postoji zadovoljavajući dokaz (razred B) za preporuku UZV-a kao točne metode za rano dijagnosticiranje HA, posebno u vezi s promjenama u mekom tkivu. Rezultati UZV-a koreliraju s kliničkim parametrima i funkcionalnim statusom zgloba (74, 78).

1.7.1. Hemophila Early Arthropathy Detection with Ultrasound (HEAD – US)

POC-UZV (engl. „point of care“) predstavlja fokusiranu evaluaciju zgloba, koja koristi ograničene ravnine skeniranja ili skraćeni protokol skeniranja, a obično ga provode obučeni kliničari kako bi odgovorili na specifična pitanja. HEAD-US protokol koji su razvili Martinoli i sur. (76) ima za svrhu pojednostaviti tehniku skeniranja lakta, gležnja i koljena, omogućujući kliničarima da ga primjenjuju neposredno u praksi, bez potrebe za pomoći radiologa. HEAD-US protokol je široko korišten za ranu detekciju HA (74).

HEAD-US protokol za pregled i bodovanja zglobova predstavlja aditivni skor koji uključuje pokazatelje aktivnosti bolesti (hipertrofija sinovije) i nepravilnosti hrskavice i subhondralne kosti. Ukupni rezultat za pojedini zglob kreće se od 0 do maksimalnih 8. Promjene u sinoviji i destrukcija osteohondralnih površina su najuočljiviji aspekti HA, te čine dvije odvojene domene analize. Iako je detekcija izljeva u zglobu klinički relevantna, on nije uključen u ovu skalu jer autori smatraju izljev prolaznim fenomenom koji može dovesti do varijacija u rezultatima, a koje nisu nužno povezane s progresijom artropatije. Izljev je klinički važan kao mogući pokazatelj akutnog krvarenja. Autori ističu da su, na osnovu opažanja kako se sinovija u većini slučajeva manifestirala kao hipovaskularna na Dopplerovim slikama u seriji od 60 pregledanih zglobova, isključili ovaj parametar iz mjerne ljestvice. Dopplerovi signali rijetko se prikazuju u hemofilčnoj sinoviji. Kada se i

pojave, obično su ograničeni na nekoliko izoliranih točkastih ili pojedinačnih linearnih prikaza. Dopplerovo snimanje je općenito poznato kao važno sredstvo za otkrivanje aktivnih stadija upalnih artropatija. U HA vaskularni odgovor u sinoviji nije tako izražen kao u aktivnoj fazi RA, te postoji mogućnost da većina protoka krvi u hemofilčnoj sinoviji ostaje ispod razine detekcije Dopplerovim snimanjem. S obzirom da nisu uočene razlike u ehoteksturi između sinovijalnog tkiva s visokom i niskom koncentracijom hemosiderina prilikom usporedbe UZV i MR slika, element hemosiderina nije uvršten u HEAD-US protokol. U HA osteohondralna oštećenja su opsežna i obuhvaćaju područja koja su obično pošteđena u degenerativnim stanjima. Postoji teorija da ovaj difuzni obrazac zahvaćenosti može biti povezan s izravnim štetnim učinkom željeza na površine zglobova, što rezultira inhibicijom mehanizma za stvaranje matriksa hrskavice. Stoga UZV može pružiti korisne informacije u slučajevima difuznih patologija, kao što su upalne artropatije, što ga čini korisnim i u kontekstu HA (76).

Iako HEAD-US protokol ima svoja ograničenja, prednosti uključuju brze i jednostavne preglede, što je pogodno za kliničku praksu. Autori sugeriraju da je moguće provesti pregled laktova, koljena i gležnjeva u roku od 30 minuta. Ovaj protokol je pokazao visoku pouzdanost nakon kraće edukacije kliničara i stručnjaka izvan radiologije (74). Detekcija rane artropatije pomoću HEAD-US protokola posebno je razvijena za upotrebu od strane ne-radiologa. Interopservacijska pouzdanost kod pet hematologa bila je visoka, s intraklasnom korelacijom od 0.72 (95 % CI 0.62–0.82) (75).

HEAD-US protokol se preporučuje od strane Svjetske federacije za hemofiliju (1).

1.7.2. Istraživanja HEAD-US u hemofilčnoj artropatiji

U studiji s 30 bolesnika s teškom hemofilijom, ukupni HEAD-US skor pokazao je jaku korelaciju ($r = 0.92$) s ukupnim IPSSG MR skorom. Analiza pojedinačnih skorova otkrila je vrlo visoku korelaciju za laktove i koljena ($r \approx 0.95$), dok je korelacija za gležnjeve bila nešto niža ($r \approx 0.85$). Korelacija s MR skorom

bila je najviša s HEAD-US skorom ($r = .92$), što je bilo znatno više u usporedbi s kliničkom ($r = .62$) i subjektivnom procjenom zglobova ($r = .66$) (69, 79).

U studiji koja je obuhvatila 28 odraslih bolesnika s umjerenom ($n = 14$) i blagom ($n = 14$) hemofilijom, zglobni status je evaluiran s HEAD-US protokolom. Analiza je otkrila prisutnost sinovitisa, poremećaja subhondralne kosti ili potpunog uništenja hrskavice u obje skupine, ukazujući na to da se artropatske promjene i sinovitis mogu javiti i u blažim i umjerenim oblicima hemofilije (80).

U studiji De la Corte-Rodríguez i sur. 14 % bolesnika je pokazivalo HEAD-US znakove rane HA u zglobovima bez prijavljenih krvarenja i sa kliničkim skorom 0. Autori su zaključili da je HEAD-US bolji od prijavljenih krvarenja i kliničkog skora u ranom otkrivanju HA. Desni gležanj je bio najviše zahvaćen zglob u ovoj studiji (74, 81).

U studiji je istraženo je li HEAD-US efikasna alternativa MR-u za detekciju ranih promjena u zglobovima. HEAD-US je bio točan za hipertrofiju sinovije u 97 % slučajeva (CI: 91-99), s pozitivnom prediktivnom vrijednošću od 94 % (CI: 73-100) i negativnom prediktivnom vrijednošću od 97 % (CI: 91-100). Za nepravilnosti hrskavice točnost je bila 91 % (CI: 83-96), a za nepravilnosti površine kosti 97 % (CI: 91-99) (82).

Procijenjena je učinkovitost kliničkog pregleda i HEAD-US protokola za otkrivanje hipertrofije sinovije u bolesnika s hemofilijom starijih od 16 godina. U 78 % zglobova s oticanjem, boli i anamnezom hemartroza, hipertrofija sinovije je bila potvrđena UZV-om. Međutim, u zglobovima bez vidljivih simptoma, 40 % ih je na UZV-u pokazalo subkliničku hipertrofiju sinovije, pri čemu je ovaj postotak bio veći u laktovima nego u koljenima i gležnjevima. Zaključak istraživanja je da, iako klinički pregled i UZV pružaju komplementarne informacije o stanju zglobova, sposobnost otkrivanja subkliničkog sinovitisa bez UZV-a je znatno smanjena (83).

U studiji koja je uključila 30 odraslih bolesnika s hemofilijom, analizirani su gležnjevi pomoću IPSPG MR i HEAD-US. MR je otkrio nepravilnosti u 76 % talokruralnih i 55 % subtalarnih zglobova, dok su s HEAD-US protokolom uočene nepravilnosti u 93 % gležnjeva. Zabilježena je visoka korelacija između MR i

HEAD-US-a u evaluaciji strukture gležnja ($\rho = .726$, $p < .001$). Umjerene korelacije uočene su između rezultata MR i HEAD US-a i kliničkog skora (HJHS 2.1) ($\rho = .645$, $p < .001$ i $\rho = .686$, $p < .001$). Međutim, nije bilo značajnih korelacija (vrlo slaba do slaba) između rezultata MR-a i HEAD-US-a i boli u gležnju (84).

1.8. Proteomika i masena spektrometrija

1.8.1. Proteomika

Proteomika je grana bioloških znanosti koja proučava proteome, odnosno proteine prisutne u određenom biološkom uzorku. Proteomski pristup omogućuje sveobuhvatno proučavanje proteoma, što obuhvaća ukupni skup proteina izraženih u stanici, tjelesnoj tekućini ili tkivu. Ovaj pristup otkriva sastav, strukturu i funkciju proteina, te može pratiti kako se proteom mijenja tijekom života, pod utjecajem starenja i raznih fizioloških, razvojnih i okolišnih uvjeta (85). Ovaj holistički pristup analizi bioloških sustava može otvoriti put ka otkrivanju biljega koji su jedinstveni za HA (34). Proteomske tehnike temelje se na procesu izolacije i frakcioniranja proteina iz biološkog materijala, nakon toga slijedi kvantifikacija (mjerenje razine u uzorku) te karakterizacija, što uključuje identifikaciju proteina te određivanje njihovih svojstava kao što su masa i struktura (86).

1.8.2. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija (MS) predstavlja naprednu proteomsku tehniku za analizu kompleksnih proteinskih mješavina s visokom osjetljivošću. MS omogućuje detekciju, identifikaciju i kvantitativnu analizu proteina. Za razliku od drugih tehnika poput ELISA-e koja je ograničena na analizu pojedinačnih već poznatih proteina, MS pruža nepristranu analizu proteina u uzorku i identifikaciju novih proteina. Tehnike poput tekućinske kromatografije masene spektrometrije (engl. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) su ključne u proteomici jer uz bioinformatičku obradu daju maksimalan broj identificiranih i kvantificiranih proteina. Tekućinska kromatografija frakcionira i razdvaja peptide, dok masena spektrometrija detektira i identificira peptide. Elektrosprej ionizacija i vaporizacija

peptida u LC-MS sustavu omogućuju njihov unos u maseni spektrometar u plinovitom stanju, što minimizira degradaciju i omogućuje precizniju analizu. Unutar MS uređaja, ionizirani proteini se razdvajaju pomoću elektroda prema masi, a zatim prolaze kroz analizator koji mjeri omjer mase i naboja (m/z), rezultirajući spektrom koji otkriva sastav i strukturu peptida (87, 88).

1.8.3. Bioinformatička obrada podataka

Eksperimentalni sirovi spektar uspoređuje se s teoretskim spektrima iz baze podataka poznatih humanih proteina Uniprot (89). Za ovu analizu koristimo softver MaxLFQ za kvantitativnu analizu proteoma. Daljnja analiza provodi se u softverskom okruženju verzije 4.6.3a. MaxLFQ je alat za procjenu relativne količine proteina iz uzoraka spektrometrije masa koji omogućuje kvantifikaciju proteina iz različitih uzoraka te usporedbu njihovih ekspresija. Radi na principu izračunavanja relativnih količina proteina na temelju intenziteta signala dobivenih iz spektrometrije masa te omogućava čitanje veličine poznate kao iBAQ (engl. intensity-based absolute quantification). iBAQ je numerička vrijednost koja predstavlja procijenjenu apsolutnu količinu proteina u biološkom uzorku na temelju intenziteta signala dobivenih iz spektrometrije masa. Kao relativna vrijednost, iBAQ ne ukazuje na apsolutnu koncentraciju proteina u uzorku, već se koristi za procjenu relativnih omjera ekspresije pojedinog proteina unutar istog uzorka. Za interpretaciju podataka koristi se baza podataka UniProt, (89) koja sadrži opsežne informacije o sekvencama i funkcijama proteina. Interakcije između detektiranih proteina evaluiraju se korištenjem softvera String 11.5. Za vizualizaciju ovih veza koristi se softverski alat SR dijagrami. Volcano plotovi koriste za prikaz statistički značajnih razlika u ekspresiji između dviju skupina proteina. Završna faza bioinformatičke analize uključuje statističku analizu diferencijalne ekspresije (87, 88, 90).

1.8.4. Proces validacije biljega u metodi „shotgun“ proteomike

Proces validacije "shotgun" proteomike, koji se koristi za otkrivanje biljega, počinje odabirom bolesnika i kontrolnih skupina. Nakon prikupljanja uzoraka,

proteini se frakcioniraju tekućinskom kromatografijom, a zatim se provodi analiza u masenom spektrometru. U sljedećem koraku, rezultati dobiveni masenom spektrometrijom potvrđuju se i kvantificiraju pomoću drugih metoda, kao što je ELISA. Identificirani potencijalni biljezi zatim prolaze kroz fazu validacije na većem broju ispitanika, obično između 100 i 1000, kako bi se potvrdila njihova relevantnost i pouzdanost. Ovaj korak je ključan za potvrđivanje njihove primjenjivosti u kliničkoj praksi, ali je istovremeno dugotrajan i resursno zahtjevan. Zahtijeva detaljnu analizu i verifikaciju kako bi se osigurala valjanost biljega (85, 87).

Većina prethodnih istraživanja u HA oslanjala se na biljege koji su već identificirani za druge bolesti poput OA i RA (34). Kroz analizu proteoma u HA, otvaramo mogućnost detaljnijeg razumijevanja mehanizama koji leže u osnovi oštećenja zglobova uzrokovanog krvarenjem (91). Do sada su Kriegsman i sur. primijenili proteomiku u istraživanju HA. Proveli su proteomsku analizu sinovijalnog tkiva šest bolesnika s HA. Otkrili su prediktivne vrijednosti lakih i teških lanaca feritina, alfa i beta podjedinica hemoglobina, fragmentiranog peptida koagulacijskog faktora VIII, beta i gama peptide fibrinogena, aneksin A2, katepsin B i katepsin D (92).

1.9. Svrha rada

Klinički pregled i slikovne dijagnostičke tehnike predstavljaju temeljne metode u evaluaciji HA, no postoji rastući interes za uključivanje biljega degeneracije zglobova za procjenu oštećenja zglobova. Pronalazak lako dostupnog biljega za prepoznavanje patološkog procesa, u fazi prije nego što su promjene uočljive klinički ili slikovnim tehnikama, otvorilo bi mogućnost za rano otkrivanje i praćenje HA. Biljezi CS846 i uCTX-II su zanimljivi zbog njihove potencijalne sposobnosti da detektiraju subklinička oštećenja i rane promjene u zglobovima. Prethodna istraživanja su dala različite rezultate u vezi s njihovom povezanošću s težinom bolesti, a metodologije su varirale, posebice u odnosu na težinu hemofilije ispitanika i korištene metode za ocjenu težine artropatije. Naše istraživanje teži premostiti ove nedostatke obuhvaćajući bolesnike s teškom i

blagom hemofilijom, kontrolnu skupinu zdravih ispitanika, te ocjenu težine bolesti klinički i slikovno, pomoću ultrazvuka.

Analiza koštanih biljega CTX-I, osteokalcina i koštane ALP omogućit će nam da obuhvatimo biokemijske procese u cijelom zglobu. Ovaj pristup pruža širi uvid u interakcije koje doprinose razvoju HA. Istraživanje uključuje i analizu agrekanaze ADAMTS-4, čija uloga u HA dosad nije proučavana. Cilj nam je istražiti ulogu ADAMTS-4 u razvoju HA kako bismo doprinijeli identifikaciji potencijalnih biljega za procjenu težine i praćenje ove bolesti.

Naše istraživanje po prvi put provodi proteomsku analizu plazme kod bolesnika s hemofilijom. Očekujemo da kroz analizu proteomskog profila steknemo uvid u molekularnu dinamiku koja može doprinijeti razumijevanju patofizioloških promjena. Naš cilj je upotrijebiti proteomske podatke za identifikaciju i kvantifikaciju proteina kao mogućih biljega za HA.

2. HIPOTEZA

Bolesnici s teškom hemofilijom imat će veće vrijednosti biljega hrskavice serumskog CS846 i urinarnog CTX-II u odnosu na bolesnike s blagom hemofilijom te će pozitivno korelirati s ultrazvučnim skorom oštećenja zglobova.

3. CILJEVI RADA

OPĆI CILJ:

1. Odrediti povezanost kliničkog i ultrazvučnog nalaza zglobova s vrijednostima biljega hrskavice serumskog CS846 i urinarnog CTX-II u bolesnika s hemofilijom.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Usporediti vrijednosti biljega CS846 i uCTX-II u bolesnika s hemofilijom i zdravim ispitanicima.
2. Odrediti povezanost biljega CS846 i uCTX-II s obzirom na težinu hemofilične artropatije ocijenjenu klinički i ultrazvučno.
3. Usporediti vrijednosti biljega CS846 i uCTX-II s vrijednostima biljega koštane pregradnje: osteokalcinom, koštanom alkalnom fosfatazom i CTX-I u bolesnika s hemofilijom.
4. Proteomskom analizom seruma/plazme bolesnika s hemofilijom i zdravih ispitanika korištenjem uređaja za masenu spektrometriju identificirati i kvantificirati razlikovne biljege koji su moguće povezani s oštećenjem hrskavice te potvrditi poveznicu i ulogu ADAMTS-4 molekule u navedenoj indikaciji.
5. Odrediti povezanost identificiranih razlikovnih biljega s težinom hemofilične artropatije.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Ispitanici

U ovo istraživanje uključeni su muškarci u dobi od 25 godina i stariji s postavljenom dijagnozom hemofilije A ili B, koji se kontroliraju i/ili liječe u Centru za hemofiliju (CHM) Zavoda za hematologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Zagreb. Istraživanje je provedeno u Klinici za reumatske bolesti i rehabilitaciju i CHM KBC Zagreb u razdoblju od svibnja 2020. do lipnja 2021. godine, kao opservacijska, presječna i neintervencijska studija. Laboratorijska analiza je učinjena u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb, u Odjelu za proteomiku, Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta u Zagrebu i u Central European Institute of Technology Masaryk University u Republici Češkoj. U istraživanje su bili uključeni bolesnici odabrani prigodnim uzorkovanjem, što znači da su uvršteni oni koji su dolazili na kontrolne preglede u CHM. Sukladno Preporukama pododbora za FVIII:C i FIX:C Međunarodnog društva za trombozu i hemostazu (ISTH), klasifikacija težine hemofilije temelji se na razini faktora zgrušavanja koji nedostaje (93). Prema provedenoj analizi snage testa uz pomoć programa G-Power 3.1.9.4. uključen je odgovarajući broj ispitanika. Ukupno je u istraživanje uključeno 53 ispitanika s hemofilijom, od kojih 27 s teškom i 26 s blagom hemofilijom. U istraživanje je uključena i kontrolna skupina od 52 ispitanika bez hemofilije koji po dobi odgovaraju ispitanicima s hemofilijom. Uključni kriteriji bili su muški spol i dob od 25 godina i stariji, pri čemu je donja dobna granica odabrana s obzirom na smanjenje promjena kolagena povezano s rastom, koje usporeva nakon zatvaranja ploče rasta, otprilike u dobi od 25 godina (70, 94). Isključni kriteriji bili su krvarenje u zglob unazad mjesec dana, prijelom unazad tri mjeseca, upalne reumatske bolesti, Pagetova bolest, hiperparatireoidizam, hiper ili hipotireoidizam i aktualno liječenje glukokortikoidima. Etička povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC Zagreb odobrila su provedbu istraživanja. Prije uključivanja u istraživanje svi ispitanici bili su upoznati s ciljevima istraživanja, te

je svaki od njih potpisao informirani pristanak kojim je dobrovoljno pristao na sudjelovanje.

4.2. Metode

4.2.1. Anamneza i status

Svim ispitanicima uzeta je anamneza, podaci o bolesti i liječenju s posebnim naglaskom na zglobne bolesti, te su uzeti antropometrijski podaci (visina i težina). Uzorci krvi i urina za laboratorijske analize uzeti su od svih ispitanika u periodu od 8 do 12 sati kako bi se izbjegle diurnalne varijacije (95).

Laboratorijske analize biljega CS846, uCTX-II, osteokalcina, ADAMTS-4, proteomske analize, IGF-1 i CTSG provedene su koristeći preostale dijelove uzoraka seruma, plazme i urina, pohranjene na temperaturi od -80 °C. Za ispitanike s hemofilijom napravljena je klinička evaluacija zglobova korištenjem „Physical examination score” Svjetske federacije za hemofiliju (engl. World Federation of Hemophilia Physical Examination Score), (96) zajedno s ocjenom razine boli i broja godišnjih hemartroza. Svim ispitanicima s hemofilijom je učinjen ultrazvučni pregled laktova, koljena i gležnjeva prema HEAD-US protokolu i bodovnom sistemu. Klinički i ultrazvučni pregled, te uzimanje uzoraka krvi i urina napravljeni su isti dan.

4.2.2. Laboratorijske pretrage

Ispitanicima s hemofilijom napravljena je laboratorijska analiza u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb. Kompletna krvna slika (broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokrit, leukociti, trombociti i MPV) određeni su na hematološkoj liniji Sysmex XN series (XN-3000/XN-3100) (Sasmex Europe GmbH, Njemačka). Koagulogram s određivanjem koncentracije protrombinskog vremena (PV), aktiviranog parcijalnog trombotoplastinskog vremena (aPTV) i fibrinogena odrađen je na koagulacijskom analizatoru Sysmex CS-5100 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka), dok su koncentracije odnosno aktivnosti faktora VIII ili IX (ovisno o tipu hemofilije) odrađene na koagulacijskom

analizatoru Atellica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). Prisutnost alopolutijela na FVIII određivana je standardnim Bethesda testom. Biokemijski parametri u serumu ukupni bilirubin, kreatinin, aspartat-aminotransferaza (AST), alanin-aminotransferaza (ALT), gama-glutamiltransferaza (GGT), alfa-fetoprotein (AFP), ukupna alkalna fosfataza (ALP) odrađeni su na analizatoru Alinity c (Abbott Laboratories, SAD). Izoenzimi alkalne fosfateze (koštani, intestinalni i jetreni) određeni su na agaroznom gelu na poluautomatskom Hydrasys2Scan instrumentu (Sebia, Francuska). C-reaktivni protein određen je metodom imunoturbidimetrije na analizatoru Alinity c (Abbott Laboratories, SAD). Koncentracija vitamina D u serumu (25-hidroksikolekalciferol) odrađena je CMIA metodom (engl. chemiluminescent microparticle immunoassay) na analizatoru Alinity i (Abbott Laboratories, SAD). Koncentracija C-terminalnog telopeptida kolagena tipa I (β -CrossLaps) CTX-I određene su testom ECLIA (engl. Electrochemiluminescence immunoassay) na uređaju Cobas Pro e801 (Roche Diagnostics, Mannheim Njemačka).

4.2.3. Analiza biljega

1. CS846

Koncentracija CS846 mjerena je enzimskom imunometodom (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) u uzorcima seruma koristeći kit Aggrecan Chondroitin Sulfate 846 Epitope (IBEX Pharmaceuticals Inc., Montreal, Quebec, Kanada). ELISA metoda korištena za mjerenje ovog analita bila je kompetitivna enzimski imunometoda u kojoj je 96 jažica ELISA pločice obloženo kozjim anti-mišjim antitijelima. U jažice su redom dodani CS846 standardi i uzorci seruma koji su prethodno razrijeđeni puferom. Nakon toga, u sve jažice dodan je biotinom označeni CS846 i monoklonsko mišje CS846 protutijelo. ELISA pločica je potom inkubirana na tresilici za mikrotitarske pločice na temperaturi 20-25 °C tijekom 2h pri brzini 700 ± 10 rpm. Nakon inkubacije slijedilo je ručno ispiranje pločice i dodavanje streptavidina konjugiranog s peroksidazom iz hrena te ponovna inkubacija u trajanju od 30 min na tresilici pri temperaturi 20-25 °C i brzini 700 ± 10 rpm. Po završetku inkubacije, jažice su isprane i dodan je

tetrametilbenzidin supstrat (TMB). Potom je slijedila inkubacija s dodanim supstratom trajanju od 30 min na tresilici pri temperaturi 20-25 °C i brzini 700 ± 10 rpm. Zadnji korak bio je dodavanje stop otopine u svaku jažicu, a u ovom testu kao stop otopina korištena je 0.2 M sumporna kiselina. Apsorbancija je očitana unutar 10 minuta od dodavanja stop otopine na valnoj duljini od 450 nm i pri tom referentnoj valnoj duljini postavljenoj na 630 nm. Za očitavanje apsorbancija korišten je ELISA čitač mikrotitarskih pločica Sunrise (Tecan Trading AG, Švicarska).

2. uCTX-II

Koncentracija uCTX-II mjerena je u uzorcima mokraće kompetitivnom ELISA metodom koristeći kit Urine CartiLaps (CTX-II) EIA (IDS, Ujedinjeno Kraljevstvo). Jažice ELISA pločice (96 jažica) komercijalno su obložene streptavidinom te se u prvom koraku u svaku jažicu dodaje biotinizirani urinski CartiLaps antigen nakon čega se pločica inkubira na temperaturi 18-22 °C tijekom 30±5 minuta. Potom se jažice ispiru 5 puta otopinom za ispiranje. Nakon završetka ispiranja u jažice se redom dodaju standardi, komercijalni kontrolni uzorci i uzorci mokraće ispitanika. Zatim se u svaku jažicu dodaje primarno protutijelo te se pločica inkubira na temperaturi 2-8 °C tijekom 21±3 sata. Idući dan jažice se prvo isperu 5 puta otopinom za ispiranje te se nakon ispiranja u svaku jažicu dodaje otopina kromogenog supstrata. Pločica se inkubira na temperaturi 18-22 °C tijekom 15±2 minuta nakon čega se zaustavlja reakcija dodatkom stop otopine (0.18 M sumporna kiselina). Apsorbancija je očitana odmah nakon dodavanja stop otopine na valnoj duljini od 450 nm. Za očitavanje apsorbancija korišten je ELISA čitač mikrotitarskih pločica Sunrise (Tecan Trading AG, Švicarska). U svrhu izračuna vrijednosti CTX-II prema kreatininu, svim ispitanicima izmjerena je koncentracija kreatinina u mokraći na analizatoru Alinity c (Abbott Laboratories, SAD) enzimskom metodom (fotometrija s kreatininazom).

3. ADAMTS-4

Za određivanje koncentracije ADAMTS-4 proteina u plazmi ispitanika korištena je indirektna imunoenzimaska metoda ELISA, kitom Human ADAMTS-4

DuoSet ELISA DY4307-05 R&D (Minneapolis, MN). Postupak je proveden prema uputama proizvođača, a rezultati su očitani spektrofotometrijom na uređaju SpectraMax i3x (Molecular Devices LLC. 3860 N First Street, San Jose, CA 95134, USA) pri valnoj duljini od 450 nm. ELISA analiza provedena je tako da su smrznuti uzorci plazme u mikroepruvetama odloženi u hladnjak na +4 °C tijekom noći kako bi se postupno odmrznuli. Vezno protutijelo razrijeđeno je te je u svaku od 96 jažica stavljeno po 100 uL otopine. Potom je pločica pokrivena i inkubirana tijekom noći na + 4 °C. Svaka jažica isprana je dva puta s po 400 µL pufera za ispiranje. Kemijska reakcija je zaustavljena dodavanjem 300 µL stop pufera svaku jažicu. Potom je inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom sat vremena te isprana. Slijedi dodavanje kontrolnih i uzoraka ispitanika u količini od 100 µL po jažici. Uzorci ispitanika dodavali su se nerazrijeđeni u duplikatu po 100 µL u svaku jažicu. Pločice su prekrivene i inkubirane tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi. Pločica je ispirana te je zatim dodano po 100 µL sekundarnog antitijela u svaku jažicu. Pločica je ponovo prekrivena i inkubirana 2 sata na sobnoj temperaturi, potom je isprana. U svaku je jažicu potom dodano 100 µL razrijeđene otopine streptavidina. Pločica je ponovo pokrivena i inkubirana 20 minuta na sobnoj temperaturi, bez izlaganja direktnom svjetlu te je potom isprana. Dodano je 100 µL otopine supstrata u svaku jažicu. Pločica je inkubirana 20 minuta na sobnoj temperaturi bez izlaganja svjetlu. U svaku jažicu dodano je 50 µL otopine za zaustavljanje te je očitavanje apsorbancija provedeno čitačem namještenim na valnu duljinu od 450 nm.

4. Osteokalcin

Koncentracija osteokalcina mjerena je u uzorcima seruma pomoću automatizirane elektrokemiluminiscentne imunokemijske metode (ECLIA) na analizatoru Cobas Pro e801 (Roche Diagnostics, Mannheim Njemačka). Tijekom analize uzoraka, za prvu inkubaciju analizator automatski uzima 20 µL uzorka te dodaje biotinizirano monoklonski N-MID osteokalcin specifično protutijelo, te N-MID osteokalcin specifično protutijelo obilježeno kompleksom rutenija. Tijekom druge inkubacije, analizator automatski dodaje streptavidinom obilježene mikročestice te se kompleks veže za čvrstu fazu reakcijom između streptavidina i biotina.

Reakcijska smjesa zatim se automatski prebacuje u stanicu za mjerenje gdje se mikročestice magnetski vežu za površinu elektrode. Nevezane mikročestice uklanjaju se dodatkom otopine ProCell/ProCell M. Primjenom napona na elektrodu inducira se kemiluminiscentna emisija čiji intenzitet se mjeri fotomultiplikatorom te analizator automatski očitava koncentraciju osteokalcina u uzorku na temelju kalibracijske krivulje.

5. Katepsin G (CTSG)

Koncentracija katepsina G (CTSG) mjerena je u uzorcima seruma pomoću sendvič ELISA metode (MyBiosource, Sjedinjene Američke Države). Jažice ELISA pločice (96 jažica) komercijalno su obložene specifičnim protutijelom, a biotinom obilježeno protutijelo korišteno je kao detekcijsko protutijelo. Standardi, uzorci ispitanika i biotinom obilježeno detekcijsko protutijelo dodani su u jažice postupno, te je pločica isprana puferom za ispiranje. Dodan je HRP-Streptavidin i nevezani kompleksi potom su isprani puferom za ispiranje. Kao supstrat enzimske HRP reakcije korišten je TMB supstrat. TMB je kataliziran od strane HRP-a pri čemu se razvije produkt plave boje čija se boja promijeni u žuto nakon dodavanja kisele stop otopine. Intenzitet žute boje proporcionalan je koncentraciji katepsina G u jažici. Ovaj test nema referentni raspon jer se ne koristi kao rutinska pretraga. Namijenjen je isključivo za istraživačke svrhe.

6. Inzulinu sličan faktor rasta (IGF-1)

Koncentracija IGF-1 u uzorcima seruma mjerena je pomoću automatizirane imunokemiluminescentne metode (CLIA) na analizatoru IDS (Immunodiagnostic Systems, Ujedinjeno Kraljevstvo). Metoda se temelji na tehnologiji kemiluminiscencije. Uzorci se inkubiraju s kiselim otopinom kako bi se IGF-1 disocioirao od veznih proteina. Dio ove smjese, zajedno s puferom za neutralizaciju, biotiniziranim monoklonskim antitijelom na IGF-1 i akridinijem označenim monoklonskim antitijelom na IGF-1, inkubira se dodatno određeno vrijeme. Zatim se dodaju magnetne čestice obilježene streptavidinom i nakon još jednog koraka inkubacije, magnetne čestice "hvataju" se pomoću magneta.

Nakon pranja i dodavanja trigger reagensa, svjetlost koju emitira akridinij izravno je proporcionalna koncentraciji IGF-1 u izvornom uzorku. Referentni raspon za IGF-1 ovisi o dobi ispitanika.

Svakom ispitaniku oduzeta su tri spremnika krvi. Jedan spremnik je prikupljan u svrhu dobivanja seruma te je zbog toga krv uzorkovana u spremnik bez aditiva. Drugi spremnik prikupljan je u svrhu dobivanja plazme te je krv prikupljana u epruvete koje sadrže puferiranu otopinu trinatrij citrata (0,105 – 0,109 mol/L). Treći spremnik prikupljan je u svrhu određivanja kompletne krvne slike (KKS) u epruvetu sa suhim K3/K2-EDTA kao antikoagulansom. Za prikupljanje uzoraka mokraće (20 ml) koristile su se čiste epruvete. Centrifugiranje uzoraka krvi bez antikoagulansa provodi se najmanje 30 minuta nakon uzorkovanja, 10 minuta na 3500 okretaja/minuti. Centrifugiranje krvi za koagulacijske pretrage provodi se 15 minuta na 4000 o/min. Nakon centrifugiranja uzorci plazme i seruma su razdijeljeni u Eppendorf epruvete u volumenu od 300 µl i zatim su pohranjeni na temperaturi od -80 °C u hladnjaku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb. Uzorci mokraće su razdijeljeni i pohranjeni na isti način. Analiza CS846, uCTX-II, osteokalcina, IGF-1 i CTSG napravljena je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb. Prije analize, uzorci plazme su transportirani na ledu do Odjela za proteomiku, Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta u Zagrebu, gdje su čuvani na temperaturi od -80 °C do analize ADAMTS-4. Od tamo su uzorci poslani na ledu u Central European Institute of Technology Masaryk University u Republici Češkoj radi proteomske analize.

4.2.4. Klinička ocjena hemofilične artropatije

Za procjenu težine hemofilične artropatije koristio se klinički skor specifičan za hemofiliju, Svjetske federacije za hemofiliju (engl. World Federation of Hemophilia Physical Examination Score), (96) također poznat kao Gilbertov skor. Ovaj sustav bodovanja namijenjen je evaluaciji laktova, koljena i gležnjeva, koji su najčešće pogođeni zglobovi u hemofiliji. Skor je primarno razvijen za upotrebu kod odraslih i djece s već razvijenom artropatijom i omogućava razlikovanje među

različitim stupnjevima težine bolesti (blaga, umjerena, teška). Osim toga, pokazao je zadovoljavajuću korelaciju s učestalošću krvarenja ($rs=0.43$) i s globalnom procjenom zdravlja zglobova od strane liječnika ($rs=0.47$). Radi se o aditivnom skoru koji se kreće od 0 do 12 za koljena i gležnjeve te od 0 do 10 za laktove, pri čemu 0 označava nezahvaćeni zglob, a 10 ili 12 najviše zahvaćen. Skor uključuje evaluaciju oticanja zgloba, atrofije mišića, aksijalne deformacije koljena i gležnja, prisutnosti krepitacija pri pokretu, opsega pokreta, fleksijske kontrakture i nestabilnosti. Bol se ocjenjuje od 0 do 3 (0 = bez boli, 1 = blaga, 2 = umjerena, 3 = teška). Učestalost krvarenja klasificira se prema godišnjem broju manjih i većih hemartroza (0 = bez krvarenja, 1 = bez velikih, 1-3 manja, 2 = 1-2 veća ili 4-6 manjih, 3 = 3 ili više većih ili 7 ili više manjih). Ocjenjuje se prisutnost oticanja (0 = nema, 2 = prisutno), atrofija mišića (0 = nema ili minimalna <1 cm, 1 = prisutna), aksijalni deformitet koljena (0 = normalno = 0-7° valgus, 1 = 8-15° valgus ili 0-5° varus, 2 = >15° valgus ili >5° varus) i gležnja (0 = bez deformiteta, 1 = do 10° valgus ili do 5° varus, 2 = >10° valgus ili >5° varus), te prisutnost krepitacija pri pokretu (0 = nema, 1 = prisutna), opseg pokreta (0 = gubitak 10 % od ukupnog opsega pokreta, 1 = gubitak 10-33 1/3 % od ukupnog opsega pokreta, 2 = gubitak > 33 1/3 % od ukupnog opsega pokreta), fleksijska kontraktura (0 = fiksna kontraktura manja od 15°, 2 = fiksna kontraktura 15° ili više) te nestabilnost (0 = nema, 1 = primijećena pri pregledu, ali ne ometa funkciju niti zahtijeva ortoza, 2 = nestabilnost koja stvara funkcionalni deficit ili zahtijeva ortoza) (96-98).

4.2.5. Ultrazvučna ocjena hemofilicne artropatije

Učinjena je UZV evaluacija laktova, koljena i gležnjeva kod ispitanika s hemofilijom, primjenom HEAD-US protokola (76). UZV evaluaciju provela su dva specijalista fizijatra-reumatologa s međunarodnim certifikatom za UZV mišićno-koštanog sustava. Ocjenjuje se aktivnost bolesti i oštećenje zglobne površine. Ukupni rezultat je od 0 (najmanje oštećenje) do 8 (najveće oštećenje). Za ocjenu aktivnosti bolesti (hipertrofija sinovije) analiziraju se svi recesusi zgloba. Ocjenjivanje oštećenja zglobnih površina (hrskavice i subhondralne kosti) obuhvaća analizu sljedećih regija: prednji aspekt distalne humeralne epifize u

laktu, trohleu femura u koljenu i prednji aspekt svoda talusa u gležnju. Hipertrofija sinovije boduje se od 0-2 (0 = odsutna/minimalna, 1 = blaga/umjerena, 2 = teška). Promjene na kosti boduju se od 0-2 (0 = normalna, 1 = blage iregularnosti subhondralne kosti sa/bez početnih osteofita oko zgloba, 2 = poremećena subhondralna kost sa/bez erozija i prisutnost prominentnih osteofita oko zgloba).

Promjene na hrskavici boduju se od 0-4 (0 = normalna, 1 = abnormalnost ehostrukture, žarišni gubitak djelomične/pune debljine zglobne hrskavice koji uključuje <25 % ciljne površine, 2 = gubitak djelomične/pune debljine zglobne hrskavice koji uključuje najmanje \leq 50 % ciljne površine, 3 = gubitak djelomične/pune debljine zglobne hrskavice koji uključuje >50 % ciljne površine, 4 = kompletna destrukcija hrskavice ili odsutna vizualizacija zglobne hrskavice na ciljnoj koštanoj površini). Svaki zglob može se ocijeniti sa maksimalno 8 bodova, stoga ukupni maksimalni broj bodova za svih šest zglobova iznosi 48.

Dodatno, radi prikaza povećanog protoka krvi u sinoviji, ispitan je Power Doppler signal, ocijenjen kao pozitivan ili negativan. Za UZV evaluaciju korišten je uređaj Philips Affinity 2017 s linearnom sondom od 5 do 18 MHz.

4.2.6. Proteomska analiza

U ovom istraživanju primijenili smo proteomsku analizu s dvostrukim ciljem: prvo, identificirati i kvantificirati razlike u proteomskom profilu između bolesnika s hemofilijom i zdravih ispitanika; i drugo, istražiti razlike u proteomskim profilima unutar skupine bolesnika s hemofilijom, s obzirom na težinu bolesti. Analiza je bila usmjerena na identifikaciju i kvantifikaciju specifičnih proteina koji bi mogli poslužiti kao razlikovni biljezi za hemofiličnu artropatiju. Za određivanje profila proteina u plazmi korištena je metoda tekućinske kromatografije u kombinaciji sa spektrometrijom masa na uređajima UltiMate 3000 RSLCnano i Orbitrap Exploris 480 spectrometer (Thermo Scientific). Proteomska analiza uzoraka plazme provedena je u Central European Institute of Technology, Masaryk University, Republika Češka.

1. Obrada i priprema uzoraka

1.1. Združivanje uzoraka

Prije analize, uzorci plazme su transportirani na ledu do Odjela za proteomiku, Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Nakon toga su, do daljnjeg transporta na ledu prema Central European Institute of Technology na Masaryk University u Republici Češkoj, čuvani na temperaturi od -80 °C. Smrznuti uzorci plazme su otopljeni, nakon čega su uzorci iz svake od tri skupine (bolesnici s teškom hemofilijom, bolesnici s blagom hemofilijom i kontrolna skupina zdravih ispitanika) združeni (engl. pooling) (99). Zatim je za daljnju analizu pripremljeno tri poola u svakom po 15 ispitanika, ukupni volumen 15 ml.

1.2. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima

Nužno je kvantificirati koncentraciju proteina kako bi se osigurala homogenost koncentracije proteina prije postupka digestije. U tu svrhu, koncentracija proteina u uzorcima određena je primjenom komercijalnog kompleta kemikalija, BioRad RC DC Protein Assay Kit II. Postupak je uključivao razrijeđivanje alikvota uzorka destiliranom vodom u omjeru 1:5, nakon čega je koncentracija proteina određena prema specifikacijama proizvođača BioRad RC DC Protein Assay Kit II. Apsorbancija proteina izmjerena je pri valnoj duljini od 690 nm koristeći spektrofotometar SpectraMax i3x (Molecular Devices LLC).

1.3. Razgradnja proteina peptidazom tripsinom

Proteini se podvrgavaju procesu razgradnje peptidazom tripsinom kako bi se dobili peptidi koji će kasnije biti analizirani tekućinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom. Kako bi se povećala učinkovitost razgradnje, proteini su prethodno denaturirani urejom, a zatim izloženi djelovanju jodoacetamida, koji je alkilirajući agens. Jodoacetamid kovalentno reagira s bočnim lancima cisteina, sprječavajući tako ponovno formiranje disulfidnih mostova i renaturaciju proteina.

Razgradnja proteina provedena je prema sljedećem postupku:

- 1) Uzorak od 40 µg proteina izdvojen je i pomiješan s 200 µl 8 M otopine ureje u filteru za centrifugiranje koji propušta proteine manje od 10 kDa. Filter je stavljen u epruvetu od 1,5 ml i centrifugiran na 14000 g tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi.
- 2) Na filter za centrifugiranje dodano je dodatnih 200 µl 8 M otopine ureje, a zatim je uzorak centrifugiran na 14000 g tijekom 20 minuta pri sobnoj temperaturi.
- 3) Iz Eppendorf epruvete od 1,5 ml uklonjeno je 8 M ureje koja je prikupljena tijekom prethodna dva koraka.
- 4) Na filter za centrifugiranje dodano je 100 µl 55 mM jodoacetamida otopljenog u 8 M ureji. Uzorak je vorteksiran kratko i inkubiran tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi, u potpunoj tami.
- 5) Uzorak je centrifugiran na 14000 g tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi.
- 6) Na filter za centrifugiranje dodano je 100 µl 8 M ureje, a zatim je uzorak centrifugiran na 14000 g tijekom 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Ovaj korak je ponovljen dva puta.
- 7) Uzorku je dodano 100 µl 50 mM otopine amonijevog bikarbonata, a zatim je uzorak centrifugiran na 14000 g tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Ovaj korak je ponovljen dva puta.
- 8) Uzorku je dodano 75 µl 50 mM otopine amonijevog bikarbonata i tripsina u omjeru 50:1, nakon čega je uzorak kratko vorteksiran.
- 9) Da bi se spriječilo isparavanje uzorka, vrh epruvete je prekriven parafilmom, a uzorak je inkubiran preko noći na 37 °C.
- 10) Filter za centrifugiranje je prenesen u novu Eppendorf epruvetu od 1,5 ml i centrifugiran na 14000 g tijekom 15 minuta pri sobnoj temperaturi.
- 11) Uzorku je dodano 50 µl 50 mM otopine amonijevog bikarbonata, nakon čega je centrifugiran na 14000 g tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi.
- 12) Uzorku je dodano 50 µl 0,5 M otopine natrijevog klorida, a zatim je centrifugiran na 14000 g tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi.

- 13) Filtrat u epruveti sadrži otopinu triptičkih peptida koja je zakiseljena do pH 2,5-3 dodavanjem 30 µl 20 % octene kiseline, čime je kompletiran cjelokupni postupak razgradnje.

1.4. Pročišćavanje i ugušćivanje peptida

U ovom koraku, triptički peptidi se koncentriraju i uklanja se višak soli (amonijev bikarbonat i natrijev klorid) koji negativno utječe na ionizaciju peptida u masenom spektrometru.

Pročišćavanje i koncentriranje peptida provedeno je prema sljedećem postupku:

- 1) U nastavak pipete od 100 µl umetnut je materijal C18 (poznat kao Stage Tips – Stop And Go Extraction), (100) prethodno navlažen dodavanjem 100 µl metanola. Stage Tips je zatim centrifugiran na sobnoj temperaturi tijekom 2 minute pri brzini od 1300 g, ispran s 200 µl 0,5 % octene kiseline (otopina A), te ponovno centrifugiran na 1300 g tijekom 3 minute pri sobnoj temperaturi.
- 2) U Stage Tips dodan je uzorak peptida, nakon čega je ponovno centrifugiran na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta pri brzini od 1300 g.
- 3) Stage Tips je ispran s 200 µl 0,5 % octene kiseline (otopina A) i ponovno centrifugiran na sobnoj temperaturi tijekom 3 minute pri brzini od 1300 g.

Peptidi su eluirani iz materijala C18 (Stage Tips) u mikrotitarsku pločicu s 96 jažica na sljedeći način: Stage Tips je pričvršćen na plastičnu štrcaljku, a peptidi su isprani pomoću 40 µl otopine koja sadrži 80 % acetonitrila (ACN) i 20 % otopine A (otopina B).

Korištenjem vakuum-centrifuge (Eppendorf Concentrator 5301) tijekom 10 minuta na 30 °C, uparen je preostali ACN. U ovom koraku, triptički peptidi su pročišćeni od zaostalih soli (amonijev bikarbonat i natrijev klorid) koje ometaju ionizaciju peptida u masenom spektrometru. Istovremeno se peptidi i koncentriraju kako bi se mogli bolje nanijeti na tekućinski kromatograf.

1.5. Tekućinska kromatografija i spektrometrija masa

Pročišćeni peptidi su razdvojeni prema polaritetu i analizirani korištenjem HPLC sustava UltiMate 3000 RSLCnano, povezanog s Orbitrap Exploris 480 spectrometer masenim spektrometrom (Thermo Scientific) putem nano-elektrosprej LC-MS sučelja. Peptidi su otopljeni u otapalu "A" (0,1 % FA, engl. formic acid, mravlje kiseline u vodi) i nanijeti na nanokolonu duljine 25 cm napunjenu C18 materijalom (PepMap, ThermoFisher). Razdvajanje je provedeno kroz 90-minutni gradijent 3-37 % otapala "B" (80 % ACN, 0,1 % FA u vodi) s protokom od 300 nL/min. Automatizirani ciklusi mjerenja spektrometra masa uključivali su puna skeniranja MS i skeniranja MS/MS do deset najintenzivnijih iona, uz dinamičko isključivanje kako bi se spriječilo prekomjerno fragmentiranje peptida najveće koncentracije. Puna skeniranja MS (m/z od 350 do 1400) izvršena su u Orbitrap analizatoru s rezolucijom od 60,000, uz unutarnju kalibraciju pomoću tzv. "lock" mase. Analize su provedene u pet tehničkih ponavljanja svakog uzorka.

4.2.7. Statistička analiza

Podaci su prikazani tablično i grafički. Napravljena je analiza normalnosti raspodjele numeričkih podataka (Smirnov-Kolmogorovljev test) te su se shodno dobivenim rezultatima primijenili odgovarajući neparametrijski statistički testovi. Kvantitativni podaci su prikazani kroz medijane i interkvartilne raspone. Kategorijski podaci su prikazani kroz apsolutne frekvencije i pripadajuće udjele. Razlike u kvantitativnim vrijednostima su analizirane Mann-Whitney U testom kod razlika koje su se odnosile na usporedbu kontinuiranih vrijednosti između dviju skupina, odnosno Kruskal-Wallisovim testom kod usporedbi vrijednosti između tri skupine (zdravi ispitanici, blaga i teška hemofilija). Dodatno se za značajne razlike dobivene Kruskal-Wallisovim testom načinio post-hoc test prema Dunnu. Razlike u kategorijskim varijablama su analizirane Fisher-Freeman-Haltonovim egzaktnim testom.

Povezanost kliničkog i ultrazvučnog nalaza zglobova s vrijednostima biljega hrskavice serumskog CS846 i uCTX-II, kao i ostalih promatranih biljega analizirana je Spearmanovim korelacijskom analizom. Sve P vrijednosti manje od

0,05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila licencirana programska podrška IBM SPSS Statistics for Windows, verzija 29.0.1.

Koristeći bioinformatičke metode, analizirali smo eksperimentalno dobivene spektre fragmentiranih peptida s ciljem identifikacije i kvantifikacije proteina u uzorku. Sirovi eksperimentalni podaci pohranjeni su putem ProteomeXchange Consortium u PRIDE repozitoriju, te su dostupni s identifikatorom PXD045469. MS podatci evaluirani su korištenjem tzv. MaxLFQ (engl. maximum label free quantification). Analiza je nadalje napravljena upotrebom softverskog okruženja (engl. software container environment), verzije 4.6.3a, dostupne na <https://github.com/OmicsWorkflows>.

Protokol analize proteoma uključivao je sljedeće korake:

- a) Uklanjanje prekursora niske kvalitete i proteina koji se smatraju uobičajenim laboratorijskim kontaminantima.
- b) Logaritamsku (Log2) transformaciju intenziteta MaxLFQ proteinskih grupa.
- c) Odbacivanje proteinskih grupa koje nisu kvantificirane u više od polovice replikata za barem jedan tip uzorka, osiguravajući pouzdanost podataka.
- d) Imputaciju nedostajućih vrijednosti iz slučajne distribucije oko globalne minimalne vrijednosti.
- e) Analizu diferencijalne ekspresije koristeći LIMMA statistički test, gdje su proteini s prilagođenom p-vrijednošću <0.05 i promjenom u ekspresiji većom ili manjom od 1 smatrani značajno promijenjenima.

5. REZULTATI

5.1. Antropometrijski i demografski podaci ispitanika

U istraživanje su uključena 53 bolesnika s hemofilijom, od kojih 27 ima tešku hemofiliju, a 26 blagu hemofiliju. Kontrolna skupina se sastoji od 52 ispitanika bez hemofilije. Ispitanici s hemofilijom i kontrolna skupina zdravih ispitanika su približno iste dobi, bez značajne razlike ($p=0,366$). Medijan dobi ispitanika s blagom hemofilijom iznosi 43 godine (IKR: 30,75-50), s teškom hemofilijom 47 godina (IKR: 40-56), a zdravih 46 godina (IKR: 33,25-55,75). Indeks tjelesne mase u ispitanika s blagom hemofilijom, teškom hemofilijom i zdravih ispitanika je sličan (medijani: 26,70, 26,20 i 26,42 kg/m²), bez značajne razlike ($p=0,756$) (tablica 1.).

Od svih ispitanika s teškom hemofilijom, 23 imaju hemofiliju A, dok 4 imaju hemofiliju B. Šest ispitanika s teškom hemofilijom ima inhibitore. Što se tiče ispitanika s blagom hemofilijom, 23 imaju hemofiliju A, dok njih 3 imaju hemofiliju B. Samo jedan ispitanik s blagom hemofilijom ima inhibitore (tablica 2.).

Tablica 1. Opisna statistika i usporedbe vrijednosti dobi i indeksa tjelesne mase (BMI) između ispitivanih skupina: Kruskal-Wallisov test

Skupina	N	Min	Max	Centile			
				25.	Medijan	75.	
Dob (godine)	Zdravi	52	25,00	68,00	33,25	46,00	55,75
	Blaga HF	26	25,00	66,00	30,75	43,00	50,00
	Teška HF	27	25,00	62,00	40,00	47,00	56,00
BMI (kg/m ²)	Zdravi	52	20,02	35,75	24,44	26,42	29,40
	Blaga HF	26	20,16	33,77	24,93	26,70	28,32
	Teška HF	27	18,94	39,10	22,69	26,20	29,45

	Kruskal-Wallis H	df	P
Dob (godine)	2,011	2	0,366
BMI (kg/m ²)	0,560	2	0,756

Tablica 2. Opisna statistika i usporedba tipa hemofilije i inhibitora

		Skupina				P
		Blaga HF		Teška HF		
		N	%	N	%	
Tip hemofilije (A/B)	A	23	88,5 %	23	85,2 %	0,999
	B	3	11,5 %	4	14,8 %	
Inhibitori	Ne	25	96,2 %	21	77,8 %	0,100

5.1.1. Klinička obilježja ispitanika i liječenje

Svi bolesnici s teškom hemofilijom primaju profilaktičku terapiju, dok bolesnici s blagom hemofilijom terapiju primaju po potrebi. U našem uzorku, 25,9 % bolesnika s teškom hemofilijom je prethodno preboljelo hepatitis B, dok je taj postotak kod blage hemofilije 3,8 %. Što se tiče hepatitisa C, 63 % bolesnika s teškom hemofilijom je prethodno preboljelo ovu infekciju, dok je taj postotak kod blage hemofilije 38,5 %. Nadalje, 7,4 % bolesnika s teškom hemofilijom se trenutno liječi zbog hepatitisa C i HIV-a, dok bolesnici s blagom hemofilijom nemaju HIV. Analiza Power Doppler signala zglobova otkrila je prisutnost pozitivnog signala u 7,7 % ispitanika s blagom hemofilijom i u 25,9 % ispitanika s teškom hemofilijom (tablica 3.).

Tablica 3. Opisna statistika i usporedbe vrste terapije, infekcije HBV, HCV i HIV i nalaza Power Dopplera između skupina blage i teške hemofilije: Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

		Skupina				P
		Blaga HF		Teška HF		
		N	%	N	%	
Oblik lijeka/faktora	plazmatski faktori	0	0,00 %	2	7,40 %	<0,001
	rekombinantni	0	0,00 %	16	59,30 %	
	lijekovi koji zaobilaze FVIII	0	0,00 %	1	3,70 %	
	bez terapije	26	100,00 %	0	0,00 %	
	nefaktorska terapija	0	0,00 %	8	29,60 %	
infekcija/status HBV	cijepljeni	25	96,20 %	20	74,10 %	0,025
	prebolio	1	3,80 %	7	25,90 %	
	na liječenju	0	0,00 %	0	0,00 %	
infekcija/status HCV	negativan	16	61,50 %	8	29,60 %	0,039
	prebolio	10	38,50 %	17	63,00 %	
	na liječenju	0	0,00 %	2	7,40 %	
infekcija/status HIV	negativan	26	100,00 %	25	92,60 %	0,157
	na liječenju	0	0,00 %	2	7,40 %	
UZV Power Doppler signal oba lakta, koljena i gležnjeva	Negativan	24	92,3 %	20	74,1 %	0,080
	Pozitivan	2	7,7 %	7	25,9 %	

5.2. Klinički i HEAD-US skorovi i usporedba između skupina

Ispitanici s teškom hemofilijom pokazuju blage bolove, pri čemu je medijan boli 1 (IKR: 1-1). Za blagu hemofiliju, medijan boli iznosi 0 (IKR: 0-1), ($p=0,002$). U kategoriji broja krvarenja unazad godinu dana, ispitanici s teškom hemofilijom imaju medijan vrijednosti 1 (IKR 0-1). S druge strane, u ispitanika s blagom hemofilijom nije zabilježeno krvarenje u prethodnih godinu dana (medijan 0, IKR 0-0), ($p<0,001$) (tablica 4.).

Tablica 4. Opisna statistika i razlike kliničkih obilježja između skupina blage i teške hemofilije: Mann-Whitney U test

Skupina		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Bol	Blaga HF	26	0,00	2,00	0,00	0,00	1,00
	Teška HF	27	0,00	2,00	1,00	1,00	1,00
Krvarenje - broj manjih ili većih hemartroza godišnje	Blaga HF	26	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
	Teška HF	27	0,00	3,00	0,00	1,00	1,00
Fizikalni pregled desnog lakta	Blaga HF	26	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
	Teška HF	27	0,00	9,00	0,00	5,00	7,00
Fizikalni pregled lijevog lakta	Blaga HF	26	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00
	Teška HF	27	0,00	9,00	1,00	6,00	7,00
Fizikalni pregled desnog koljena	Blaga HF	25	0,00	12,00	0,00	1,00	1,00
	Teška HF	22	0,00	12,00	0,00	1,50	10,25
Fizikalni pregled lijevog koljena	Blaga HF	26	0,00	7,00	0,00	1,00	1,25
	Teška HF	23	0,00	11,00	0,00	6,00	9,00
Fizikalni pregled desnog gležnja	Blaga HF	26	0,00	12,00	0,00	0,00	1,25
	Teška HF	27	0,00	12,00	4,00	10,00	11,00
Fizikalni pregled lijevog gležnja	Blaga HF	26	0,00	12,00	0,00	0,00	1,00
	Teška HF	27	0,00	12,00	4,00	10,00	12,00
Klinički skor zglobova: ukupno	Blaga HF	25	0,00	26,00	0,50	2,00	7,00
	Teška HF	20	2,00	57,00	15,25	34,50	46,75

	Mann-Whitney U	Z	P
Bol	193,500	-3,047	0,002
Krvarenje – broj manjih ili većih hemartroza godišnje	128,000	-4,684	<0,001
Desni lakat	108,000	-4,970	<0,001
Lijevi lakat	70,500	-5,528	<0,001
Desno koljeno	170,000	-2,344	0,019
Lijevo koljeno	187,000	-2,326	0,020
Desni gležanj	95,000	-4,658	<0,001
Lijevi gležanj	97,000	-4,704	<0,001
Klinički skor zglobova: ukupno	375,000	-4,570	<0,001

Primijećene su značajne razlike u vrijednostima kliničkog skora zglobova između teške i blage hemofilije za sve zglobove i ukupni skor (sve p-vrijednosti < 0,05), pri čemu teška hemofilija pokazuje značajno veća oštećenja zglobova. Medijan ukupnog kliničkog skora zglobova u teškoj hemofiliji iznosi 34,50 (IKR: 15,25-46,75) dok u blagoj hemofiliji iznosi 2,00 (IKR: 0,50-7,00)

U teškoj hemofiliji medijani kliničkog skora za sve zglobove kreću se od 1,5 do 10. Najveće medijalne vrijednosti kliničkog skora imaju gležnjevi (10), potom lijevi lakat i lijevo koljeno (6), desni lakat (5), a najmanje vrijednosti ima desno koljeno (1,5).

U blagoj hemofiliji medijani kliničkog skora za sve zglobove kreću se od 0 do 1. Koljena imaju najveći medijan kliničkog skora (1), a gležnjevi i laktovi 0 (tablica 4.).

Primijećene su statistički značajne razlike u HEAD-US skoru između teške i blage hemofilije za sve zglobove i ukupni skor (sve p-vrijednosti < 0,05), pri čemu teška hemofilija pokazuje značajno veće medijalne vrijednosti za sve zglobove i ukupni skor (30,50 vs. 7,00).

U teškoj hemofiliji medijani HEAD-US skora za sve zglobove kreću se u rasponu od 3 do 7. Najviši medijan ima lijevi gležanj (7), slijede desni gležanj i lijevo koljeno (6), zatim oba lakta (5), dok najniži medijan ima desno koljeno (3).

U blagoj hemofiliji medijani HEAD-US skora za sve zglobove kreću se u rasponu od 0 do 2. Najviši medijan ima desni gležanj (2), dok za lijevi gležanj iznosi 1,5. Manje medijane ultrazvučnog skora imaju oba koljena (1) i desni lakat (0,5), dok je medijan za lijevi lakat 0 (tablica 5.).

Tablica 5. Opisna statistika i razlike između ultrazvučnih skorova zglobova između skupina blage i teške hemofilije: Mann-Whitney U test

Skupina		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
HEAD-US desni lakat	Blaga HF	26	0,00	4,00	0,00	0,50	2,00
	Teška HF	27	0,00	8,00	2,00	5,00	7,00
HEAD-US lijevi lakat	Blaga HF	26	0,00	3,00	0,00	0,00	2,00
	Teška HF	27	0,00	8,00	2,00	5,00	7,00
HEAD-US desno koljeno	Blaga HF	25	0,00	8,00	0,00	1,00	2,00
	Teška HF	22	0,00	8,00	0,75	3,00	7,00
HEAD-US lijevo koljeno	Blaga HF	26	0,00	5,00	0,00	1,00	2,00
	Teška HF	23	0,00	8,00	0,00	6,00	6,00
HEAD-US desni gležanj	Blaga HF	26	0,00	7,00	1,00	2,00	3,00
	Teška HF	27	2,00	8,00	4,00	6,00	7,00
HEAD-US lijevi gležanj	Blaga HF	26	0,00	6,00	0,00	1,50	3,00
	Teška HF	27	0,00	8,00	4,00	7,00	7,00
HEAD-US ukupno	Blaga HF	25	0,00	18,00	3,00	7,00	14,50
	Teška HF	20	7,00	40,00	15,50	30,50	35,50

	Mann-Whitney U	Z	P
HEAD-US score desni lakat	103,500	-4,505	<0,001
HEAD-US score lijevi lakat	93,500	-4,692	<0,001
HEAD-US score desno koljeno	162,500	-2,465	0,014
HEAD-US score lijevo koljeno	165,000	-2,748	0,006
HEAD-US score desni gležanj	89,000	-4,719	<0,001
HEAD-US score lijevi gležanj	101,500	-4,502	<0,001
HEAD-US score ukupno	51,500	-4,540	<0,001

Prisutnost endoproteza (EP) koljena među ispitanicima značajno je utjecala na rezultate ultrazvučnog i kliničkog skora, s obzirom da zglobovi s EP-om nisu bili uključeni u bodovanje. U skupini s teškom hemofilijom, dvojica ispitanika imaju EP-u oba koljena, dok ih petorica imaju na jednom koljenu, rezultirajući ukupno s devet EP-a (pet na desnim i četiri na lijevim koljenima). U skupini s blagom hemofilijom, jedan ispitanik ima EP-u desnog koljena.

5.3. Laboratorijski nalazi i usporedba između skupina

Analiza kompletne krvne slike ukazuje na odsutnost značajnih razlika između skupina (svi $p > 0,05$), pri čemu su medijalne vrijednosti unutar referentnih granica (tablica 6.). Analiza koštane ALP i CTX-I pokazuje da su medijalne vrijednosti bez značajnih razlika između skupina ($p > 0,05$), a interkvartilni rasponi su također unutar referentnih vrijednosti. Analiza vitamina D pokazala je da su vrijednosti za ispitanike s blagom (65 nmol/L) i teškom hemofilijom (69 nmol/L) ispod preporučene donje granice (>75 nmol/L), bez značajne razlike između dviju skupina ($p=0.375$). Interkvartilni rasponi za blagu (38,5-93,5) i tešku hemofiliju (44-104,25) pokazuju široku varijabilnost unutar skupina, ali zajednički pokazuju da većina ispitanika ne dostiže preporučene razine vitamina D. U teškoj hemofiliji pokazane su značajno veće vrijednosti ukupne ALP, jetrene 1 izoforme ALP, kao i fibrinogena. Međutim, medijalne vrijednosti ostaju unutar referentnog raspona (tablica 7.).

Tablica 6. Opisna statistika i razlike između laboratorijskih nalaza krvi između skupina blage i teške hemofilije: Mann-Whitney U test

Skupina	N	Min	Max	Centile			
				25.	Medijan	75.	
Eritrociti x10 ¹² /L (4,34-5,72)	Blaga HF	23	4,19	5,75	5,01	5,19	5,35
	Teška HF	26	4,11	6,02	4,78	5,09	5,47
Hemoglobin g/L (138-175)	Blaga HF	23	129,00	179,00	150,00	157,00	163,00
	Teška HF	26	122,00	172,00	145,50	155,50	160,00
Hematokrit L/L (0,415-0,530)	Blaga HF	23	0,38	0,50	0,44	0,46	0,47
	Teška HF	26	0,38	0,50	0,42	0,44	0,47
MCV fL (83,0-97,2)	Blaga HF	23	80,90	94,90	84,80	87,90	90,20
	Teška HF	26	76,90	91,50	83,48	87,55	89,38
MCH pg (27,4-33,9)	Blaga HF	23	28,20	32,70	29,70	30,40	30,90
	Teška HF	26	25,30	32,40	28,68	29,95	31,18
MCHC g/L (320-345)	Blaga HF	23	333,00	365,00	341,00	344,00	356,00
	Teška HF	26	323,00	364,00	334,75	343,00	351,00
RDW % (9,0-15,0)	Blaga HF	23	11,90	14,30	12,30	12,90	13,10
	Teška HF	26	12,10	19,40	12,50	13,15	14,20
Eritroblasti x10 ⁹ /L <0,6	Blaga HF	23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Teška HF	26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Eritroblasti /100 Lkc <3	Blaga HF	23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Teška HF	26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Leukociti x10 ⁹ /L (3,4-9,7)	Blaga HF	23	3,50	11,40	5,30	6,00	8,00
	Teška HF	26	3,40	12,60	5,40	6,50	7,55
Eozinofilni granulociti % (0-7)	Blaga HF	23	0,40	4,10	1,40	2,30	2,90
	Teška HF	26	0,00	5,70	1,38	2,20	3,75
Bazofilni granulociti % (0-1)	Blaga HF	23	0,30	1,40	0,50	0,60	0,90
	Teška HF	26	0,10	2,00	0,50	0,65	0,95
Neutrofilni granulociti % (44-72)	Blaga HF	23	47,60	71,30	52,70	59,70	66,30
	Teška HF	26	42,30	83,30	54,20	62,10	65,98
Limfociti % (20-46)	Blaga HF	23	19,70	42,40	23,10	27,80	31,50
	Teška HF	26	8,80	43,70	21,98	25,65	33,63
Monociti % (2-12)	Blaga HF	23	6,20	12,80	7,60	7,90	9,40
	Teška HF	26	5,70	12,80	7,70	8,50	10,13
Eozinofilni granulociti x10 ⁹ /L (0,00-0,43)	Blaga HF	23	0,03	0,33	0,07	0,12	0,22
	Teška HF	26	0,00	0,34	0,09	0,17	0,24
Bazofilni granulociti x10 ⁹ /L (0,00-0,06)	Blaga HF	23	0,02	0,14	0,03	0,04	0,05
	Teška HF	26	0,01	0,16	0,03	0,04	0,07
Neutrofilni granulociti (ANC) x10 ⁹ /L (2,06-6,49)	Blaga HF	23	1,90	7,67	2,86	3,42	5,05
	Teška HF	26	1,90	8,34	3,14	3,85	4,58
Limfociti x10 ⁹ /L (1,19-3,35)	Blaga HF	23	1,04	2,76	1,62	1,73	2,10
	Teška HF	26	0,77	3,35	1,30	1,64	2,32
Monociti x10 ⁹ /L (0,12-0,84)	Blaga HF	23	0,30	1,29	0,41	0,50	0,62
	Teška HF	26	0,30	1,22	0,45	0,53	0,67
Trombociti x10 ⁹ /L (158-424)	Blaga HF	23	121,00	293,00	180,00	219,00	239,00
	Teška HF	26	111,00	369,00	181,50	227,50	287,00
MPV fL (9,0-13,0)	Blaga HF	23	9,40	12,50	10,00	10,50	11,10
	Teška HF	26	9,40	11,80	10,15	10,70	11,33

	Mann-Whitney U	Z	P
Eritrociti x10 ¹² /L (4,34-5,72)	268,000	-0,621	0,534
Hemoglobin g/L (138-175)	244,500	-1,093	0,274
Hematokrit L/L (0,415-0,530)	233,000	-1,323	0,186
MCV fL (83,0-97,2)	262,000	-0,741	0,458
MCH pg (27,4-33,9)	240,000	-1,183	0,237
MCHC g/L (320-345)	252,500	-0,934	0,350
RDW % (9,0-15,0)	203,500	-1,918	0,055
Eritroblasti x10 ⁹ /L <0,6	299,000	0,000	1,000
Eritroblasti /100 Lkc <3	299,000	0,000	1,000
Leukociti x10 ⁹ /L (3,4-9,7)	262,000	-0,742	0,458
Eozinofilni granulociti % (0-7)	271,000	-0,561	0,575
Bazofilni granulociti % (0-1)	260,500	-0,778	0,437
Neutrofilni granulociti % (44-72)	279,500	-0,391	0,696
Limfociti % (20-46)	266,000	-0,661	0,508
Monociti % (2-12)	255,000	-0,882	0,378
Eozinofilni granulociti x10 ⁹ /L (0,00-0,43)	259,500	-0,792	0,428
Bazofilni granulociti x10 ⁹ /L (0,00-0,06)	260,000	-0,797	0,426
Neutrofilni granulociti (ANC) x10 ⁹ /L (2,06-6,49)	265,000	-0,681	0,496
Limfociti x10 ⁹ /L (1,19-3,35)	269,500	-0,591	0,554
Monociti x10 ⁹ /L (0,12-0,84)	263,500	-0,712	0,477
Trombociti x10 ⁹ /L (158-424)	239,500	-1,192	0,233
MPV fL (9,0-13,0)	276,500	-0,451	0,652

Tablica 7. Opisna statistika i razlike između laboratorijskih nalaza između skupina blage i teške hemofilije: Mann-Whitney U test

Skupina		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
CRP mg/L (<5)	Blaga HF	24	0,30	7,20	1,00	1,40	2,53
	Teška HF	26	0,30	11,10	0,55	1,95	6,58
PV (>0,70)	Blaga HF	24	0,79	1,29	0,94	1,02	1,19
	Teška HF	26	0,84	1,30	0,94	1,03	1,10
APTV s (20,0-30,0)	Blaga HF	24	30,90	62,90	35,10	39,85	43,18
	Teška HF	26	18,80	94,10	30,83	39,70	59,15
razina faktora VIII kIU/L (0,50-1,49)	Blaga HF	21	0,03	0,40	0,08	0,15	0,28
	Teška HF	22	0,01	0,95	0,03	0,14	0,43
razina faktora IX kIU/L (0,55-1,63)	Blaga HF	3	0,03	0,31	0,03	0,05	0,31
	Teška HF	4	0,01	0,50	0,02	0,07	0,40
fibrinogen g/L (1,8 – 4,1)	Blaga HF	24	1,80	4,40	2,53	2,85	3,38
	Teška HF	26	2,40	4,50	2,88	3,20	3,70
bilirubin - ukupni, umol/L (3-20)	Blaga HF	24	5,00	38,00	7,00	9,50	14,75
	Teška HF	26	5,00	20,00	6,00	8,50	11,00
kreatinin umol/L (60-104)	Blaga HF	24	59,00	109,00	70,25	79,00	89,75
	Teška HF	26	56,00	443,00	64,00	73,00	78,25
AST U/L (11-38)	Blaga HF	24	16,00	57,00	21,00	24,50	34,00
	Teška HF	25	10,00	59,00	18,50	21,00	28,50
ALT U/L (12-48)	Blaga HF	24	14,00	102,00	24,00	33,00	44,75
	Teška HF	26	9,00	89,00	15,75	25,50	35,75
GGT U/L (11-55)	Blaga HF	24	14,00	161,00	24,00	31,50	40,50
	Teška HF	26	10,00	86,00	16,75	30,00	42,25
Procjena GF (>60) ml/min/1,73 m ²	Blaga HF	24	61,00	126,00	89,25	101,50	113,00
	Teška HF	26	15,00	123,00	97,00	101,50	114,25
AFP ug/L (<7,0)	Blaga HF	23	1,10	9,60	2,00	2,60	4,60
	Teška HF	26	0,90	11,20	1,68	2,45	3,88
ukupna alkalna fosfataza U/L (60-142)	Blaga HF	26	36,00	130,00	56,75	69,00	78,25
	Teška HF	26	50,00	192,00	67,75	79,00	99,50
koštani IZO- ALP U/L (12,1-42,7)	Blaga HF	26	9,40	59,30	24,20	29,40	34,88
	Teška HF	26	8,30	92,70	23,20	31,80	40,00
intestinalni IZO-ALP U/L (0,0-11,0)	Blaga HF	26	0,10	28,70	0,40	0,80	3,63
	Teška HF	26	0,10	29,60	0,18	0,30	1,40
jetreni 1 IZO-ALP U/L (16,2-70,2)	Blaga HF	26	7,30	89,60	18,35	32,55	43,58
	Teška HF	26	7,20	93,50	34,10	41,55	58,53
jetreni 2 IZO-ALP U/L (0,0-5,8)	Blaga HF	26	0,60	9,40	1,38	1,75	2,43
	Teška HF	26	0,80	6,40	1,28	2,35	3,53
CTX-I Crosslaps (telopeptid) ug/L (< 0,584)	Blaga HF	26	0,16	0,56	0,19	0,31	0,38
	Teška HF	26	0,12	1,37	0,25	0,33	0,44
25-hidroksi vitamin D nmol/L (>75)	Blaga HF	26	20,00	129,00	38,50	65,00	93,50
	Teška HF	26	23,00	402,00	44,00	69,00	104,25

	Mann-Whitney U	Z	P
CRP mg/L (<5)	270,500	-0,808	0,419
PV (>0,70)	284,000	-0,545	0,586
APTV s (20,0-30,0)	296,500	-0,301	0,763
razina faktora VIII kIU/L (0,50-1,49)	227,000	-0,097	0,922
razina faktora IX kIU/L (0,55-1,63)	5,500	-0,178	0,858
fibrinogen g/L (1,8 – 4,1)	204,000	-2,102	0,036
bilirubin - ukupni, umol/L (3-20)	244,500	-1,319	0,187
kreatinin umol/L (60-104)	227,000	-1,652	0,099
AST U/L (11-38)	225,500	-1,494	0,135
ALT U/L (12-48)	217,500	-1,836	0,066
GGT U/L (11-55)	275,000	-0,719	0,472
Procjena GF (>60) ml/min/1,73 m ²	280,500	-0,612	0,540
AFP ug/L (<7,0)	256,500	-0,852	0,394
ukupna alkalna fosfataza U/L (60-142)	203,000	-2,472	0,013
koštani IZO- ALP U/L (12,1-42,7)	293,500	-0,814	0,415
intestinalni IZO-ALP U/L (0,0-11,0)	231,500	-1,958	0,050
jetreni 1 IZO-ALP U/L (16,2-70,2)	210,500	-2,333	0,020
jetreni 2 IZO-ALP U/L (0,0-5,8)	288,000	-0,916	0,360
CTX-I Crosslaps (telopeptid) ug/L (<0,584)	248,000	-1,647	0,099
25-hidroksi vitamin D nmol/L (>75)	289,500	-0,888	0,375

5.4. Vrijednosti OC, CS846, uCTX-II, IGF-1, CTSG i ADAMTS-4 i usporedba između skupina

Analiza vrijednosti biljega OC, CS846, IGF-1, CTSG i ADAMTS-4 nije pokazala statistički značajne razlike između zdravih ispitanika, onih s blagom i onih s teškom hemofilijom (p -vrijednosti $> 0,05$) (tablica 8.). Medijani za OC i IGF-1 su unutar referentnih vrijednosti (OC: 14-70 ng/mL, IGF-1: 6-37 nmol/L), dok za CS846, CTSG i ADAMTS-4 nema dostupnih referentnih raspona. Jedina statistički značajna razlika zabilježena je kod biljega uCTX-II, gdje su medijani značajno viši u ispitanika s blagom (243,34 ng/mmol) i teškom hemofilijom (422,88 ng/mmol) u usporedbi sa zdravim ispitanicima (192,99 ng/mmol) ($p < 0,001$) (tablica 8.). Očekivane vrijednosti uCTX-II prema proizvođaču iznose 87-895 ng/mmol (95 % CI). Medijalne vrijednosti i interkvartilni rasponi su unutar ovog intervala. Međutim, maksimalne vrijednosti prelaze očekivane u ispitanika s teškom hemofilijom. Rezultati Dunnovog post-hoc testa pokazuju da postoje statistički značajne razlike u prosječnim uCTX-II vrijednostima između svake od ispitivanih skupina (tablica 9., slika 3.).

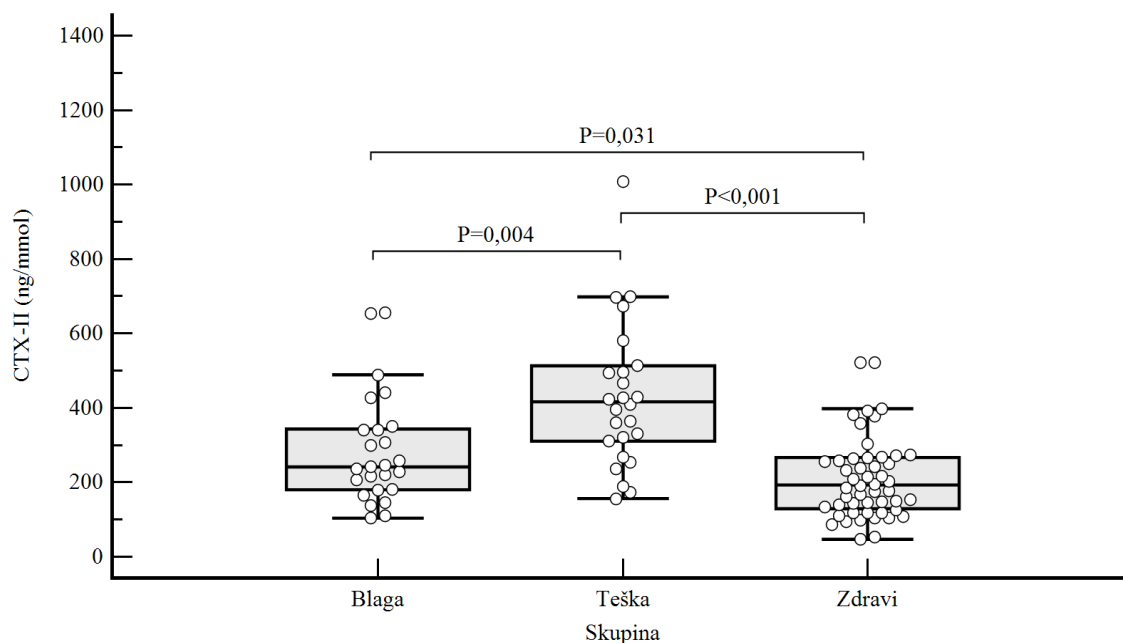
Tablica 8. Opisna statistika i usporedbe vrijednosti osteokalcina, CS846, uCTX-II, IGF-1, CTSG i ADAMTS-4 između ispitivanih skupina: Kruskal-Wallisov test

Skupina	N	Min	Max	Centile			
				25.	Medijan	75.	
Osteokalcin (ng/mL)	Zdravi	23	10,1	36,3	12,5	19,7	22,8
	Blaga HF	26	14,2	34,2	17,83	20,1	22,15
	Teška HF	27	11,6	48,4	17,8	21,5	26
CS846 (ng/mmol)	Zdravi	42	30,29	89,65	37,87	45,03	57,05
	Blaga HF	24	35,02	106,22	42,73	47,63	58,24
	Teška HF	27	30,33	687,06	39,79	43,48	51,94
uCTX-II (ng/mmol)	Zdravi	52	46,96	838,96	127,45	192,99	267,64
	Blaga HF	26	103,81	496,2	180,2	243,34	369,08
	Teška HF	27	156,54	2733,26	310,55	422,88	581,16
IGF-1 (nmol/L)	Zdravi	52	8,9	29,1	11,55	15,8	21,08
	Blaga HF	26	8,8	27,4	11,35	16,65	21,88
	Teška HF	27	9,3	26,7	14,9	16,1	19,2
CTSG (ng/ml)	Zdravi	52	0,09	0,25	0,09	0,12	0,17
	Blaga HF	26	0,09	0,25	0,09	0,12	0,18
	Teška HF	27	0,09	0,25	0,09	0,11	0,17
ADAMTS-4 (pg/mL)	Zdravi	40	0,97	915,62	25,06	82,2	193,2
	Blaga HF	23	14,14	1031,43	38,06	61,49	126,73
	Teška HF	23	0,48	2205,91	34,9	75,61	170,06

	Kruskal-Wallis H	df	P
Osteokalcin (ng/mL)	3,494	2	0,174
CS846 (ng/mmol)	1,566	2	0,457
uCTX-II (ng/mmol)	25,883	2	<0,001
IGF-1 (nmol/L)	0,414	2	0,813
CTSG (ng/ml)	0,408	2	0,816
ADAMTS-4 (pg/mL)	0,087	2	0,958

Tablica 9. Dunnov post-hoc test usporedbe vrijednosti uCTX-II između ispitivanih skupina

Dunn test	P vrijednost		
	Zdravi vs. Blaga	Zdravi vs. Teška	Blaga vs. Teška
uCTX-II (ng/mmol) AVG	0,031	<0,001	0,004



Slika 3. Usporedbe vrijednosti uCTX-II između blage i teške hemofilije i zdravih

5.4.1. Korelacije CS846, uCTX-II i ADAMTS-4 s drugim ispitivanim biljezima, te sa ultrazvučnim i kliničkim skorom

U tablici 10. prikazane su korelacije CS846, uCTX-II i ADAMTS-4 s ostalim biljezima. Primijećena je značajna pozitivna korelacija CS846 s ADAMTS-4 u skupini bolesnika s teškom hemofilijom ($\rho=0,502$, $p=0,015$). Također, utvrđena je negativna korelacija uCTX-II s CTSG u svih ispitanika s hemofilijom ($\rho=-0,341$, $p=0,012$), kao i s koštanom ALP kod ispitanika s blagom hemofilijom ($\rho=-0,422$, $p=0,032$).

Tablica 10. Korelacije CS846, uCTX-II i ADAMTS-4 međusobno te s ostalim promatranim biljezima u bolesnika s hemofilijom: Spearmanov korelacijski koeficijent rho

		Svi bolesnici			Blaga HF			Teška HF		
		CS846	uCTX-II	ADAMTS-4	CS846	uCTX-II	ADAMTS-4	CS846	uCTX-II	ADAMTS-4
CS846 (ng/mmol)	Rho	1,000	0,126	0,318	1,000	0,133	0,103	1,000	0,303	0,502
	P		0,380	0,035		0,535	0,658		0,124	0,015
	N	51	51	44	24	24	21	27	27	23
uCTX-II (ng/mmol)	Rho	0,126	1,000	-0,106	0,133	1,000	-0,136	0,303	1,000	-0,029
	P	0,380		0,484	0,535		0,535	0,124		0,897
	N	51	53	46	24	26	23	27	27	23
ADAMTS-4 (pg/mL)	Rho	0,318	-0,106	1,000	0,103	-0,136	1,000	0,502	-0,029	1,000
	P	0,035	0,484		0,658	0,535		0,015	0,897	
	N	44	46	46	21	23	23	23	23	23
IGF-1 (nmol/L)	Rho	0,030	-0,070	-0,144	0,188	-0,115	-0,209	-0,177	-0,042	-0,066
	P	0,834	0,617	0,341	0,379	0,577	0,339	0,377	0,833	0,764
	N	51	53	46	24	26	23	27	27	23
CTSG (ng/ml)	Rho	-0,018	-0,341	0,202	-0,087	-0,312	0,252	0,026	-0,319	0,151
	P	0,902	0,012	0,178	0,687	0,121	0,247	0,898	0,105	0,492
	N	51	53	46	24	26	23	27	27	23
Osteokalcin (ng/mL)	Rho	0,056	0,213	-0,044	0,301	0,045	0,035	-0,115	0,269	-0,137
	P	0,696	0,125	0,770	0,153	0,825	0,875	0,569	0,174	0,532
	N	51	53	46	24	26	23	27	27	23
CTX-I (ug/L)	Rho	0,003	0,260	-0,101	0,311	-0,010	-0,024	-0,164	0,388	-0,252
	P	0,984	0,063	0,502	0,139	0,962	0,914	0,422	0,049	0,246
	N	50	52	46	24	26	23	26	26	23
ALP - koštani (U/L)	Rho	0,073	-0,189	-0,133	0,338	-0,422	-0,136	-0,076	-0,095	-0,178
	P	0,613	0,180	0,377	0,106	0,032	0,535	0,711	0,645	0,415
	N	50	52	46	24	26	23	26	26	23

U tablici 11. prikazane su korelacije biljega s ultrazvučnim skorom. U ispitanika s blagom hemofilijom CS846 pokazuje statistički značajne negativne korelacije s HEAD-US skorom za lijevi lakat ($\rho = -0,468$, $p = 0,021$), desno koljeno ($\rho = -0,465$, $p = 0,025$) i lijevo koljeno ($\rho = -0,519$, $p = 0,009$) te s ukupnim skorom ($\rho = -0,609$, $p = 0,002$). Nasuprot tome, u ispitanika s teškom hemofilijom nismo uočili statistički značajne korelacije između CS846 i HEAD-US skora za nijedan pojedinačni zglob ili ukupan skor. Kada se analizira korelacija između uCTX-II i HEAD-US skorova, rezultati ne pokazuju statistički značajne korelacije ni za blagu ni za tešku hemofiliju. Međutim, korelacija uCTX-II s HEAD-US skorom za sve ispitanike s hemofilijom, pokazuje značajne pozitivne korelacije s ukupnim skorom ($\rho = 0,308$, $p = 0,040$), kao i sa pojedinačnim zglobovima (desni lakat: $\rho = 0,309$, $p = 0,024$, lijevi lakat: $\rho = 0,294$, $p = 0,033$, lijevo koljeno: $\rho = 0,356$, $p = 0,012$, lijevi gležanj: $\rho = 0,282$, $p = 0,041$). Nije uočena korelacija ADAMTS-4 s HEAD-US skorom u blagoj i teškoj hemofiliji.

Tablica 11. Korelacije CS846, uCTX-II i ADAMTS-4 s ultrazvučnim skorom u bolesnika s hemofilijom: Spearmanov korelacijski koeficijent rho

		Svi bolesnici			Blaga HF			Teška HF		
		CS846	uCTX-II	ADAMTS-4	CS846	uCTX-II	ADAMTS-4	CS846	uCTX-II	ADAMTS-4
HEAD-US: desni lakat	Rho	-0,117	0,309	0,052	-0,347	0,029	-0,167	0,122	0,044	0,285
	P	0,414	0,024	0,732	0,097	0,887	0,445	0,544	0,827	0,188
	N	51	53	46	24	26	23	27	27	23
HEAD-US: lijevi lakat	Rho	-0,077	0,294	0,142	-0,468	0,062	0,019	0,355	0,005	0,391
	P	0,591	0,033	0,346	0,021	0,763	0,932	0,069	0,980	0,065
	N	51	53	46	24	26	23	27	27	23
HEAD-US: desno koljeno	Rho	-0,349	0,151	-0,244	-0,465	-0,081	-0,103	-0,063	-0,066	-0,346
	P	0,019	0,312	0,119	0,025	0,701	0,648	0,781	0,769	0,135
	N	45	47	42	23	25	22	22	22	20
HEAD-US: lijevo koljeno	Rho	-0,260	0,356	0,056	-0,519	0,204	0,184	0,124	0,270	0,099
	P	0,078	0,012	0,716	0,009	0,318	0,401	0,572	0,212	0,670
	N	47	49	44	24	26	23	23	23	21
HEAD-US: desni gležanj	Rho	-0,133	0,233	0,072	-0,315	-0,168	-0,002	0,052	0,051	0,233
	P	0,352	0,094	0,633	0,134	0,412	0,994	0,797	0,800	0,285
	N	51	53	46	24	26	23	27	27	23
HEAD-US: lijevi gležanj	Rho	-0,191	0,282	-0,023	-0,304	0,009	-0,138	0,003	0,092	0,105
	P	0,179	0,041	0,879	0,149	0,965	0,529	0,988	0,647	0,634
	N	51	53	46	24	26	23	27	27	23
HEAD-US: ukupno	Rho	-0,504	0,308	-0,187	-0,609	0,074	-0,178	-0,166	0,082	-0,201
	P	0,001	0,040	0,247	0,002	0,725	0,429	0,483	0,731	0,425
	N	43	45	40	23	25	22	20	20	18

U tablici 12. prikazane su korelacije biljega s kliničkim skorom zglobova. Za ispitanike s blagom hemofilijom, analiza ukazuje na značajnu negativnu korelaciju CS846 s kliničkim skorom za desno koljeno i ukupnim skorom zglobova ($\rho = -0,458$, $p = 0,028$; $\rho = -0,514$, $p = 0,012$). Korelacije za ostale zglobove nisu statistički značajne ($p > 0,05$). Za ispitanike s teškom hemofilijom, koeficijenti korelacije između CS846 i kliničkih skorova zglobova nisu statistički značajni.

U skupinama s blagom i s teškom hemofilijom, analiza korelacija između uCTX-II i kliničkog skora zglobova nije pokazala statistički značajne veze ($p > 0,05$). Međutim, rezultati korelacije uCTX-II sa kliničkim skorom u svih ispitanika s hemofilijom pokazuju značajnu povezanost kod svih zglobova osim s desnim koljenom (desni lakat: $\rho = 0,311$, $p = 0,023$, lijevi lakat: $\rho = 0,307$, $p = 0,025$, lijevo koljeno: $\rho = 0,326$, $p = 0,022$, desni gležanj: $\rho = 0,289$, $p = 0,036$, lijevi gležanj: $\rho = 0,349$, $p = 0,011$), te sa ukupnim skorom zglobova ($\rho = 0,327$, $p = 0,028$).

U ispitanika s blagom hemofilijom uočena je korelacija ADAMTS4 s kliničkim skorom lijevog koljena ($\rho = 0,420$, $p = 0,046$) i desnog gležnja ($\rho = 0,434$, $p = 0,039$).

Tablica 12. Korelacije CS846, uCTX-II i ADAMTS-4 s kliničkim nalazima u bolesnika s hemofilijom: Spearmanov korelacijski koeficijent rho

		Svi bolesnici			Blaga HF			Teška HF		
		CS846	uCTX-II	ADAMTS-4	CS846	uCTX-II	ADAMTS-4	CS846	uCTX-II	ADAMTS-4
Bol	Rho	0,077	0,479	0,182	-0,082	0,384	0,207	0,489	0,292	0,358
	P	0,591	<0,001	0,226	0,704	0,053	0,344	0,010	0,140	0,093
	N	51	53	46	24	26	23	27	27	23
Broj hemartroza godišnje	Rho	-0,049	0,262	0,054	0,136	0,227	-0,032	0,027	-0,001	0,065
	P	0,734	0,058	0,723	0,528	0,265	0,884	0,893	0,995	0,769
	N	51	53	46	24	26	23	27	27	23
Fizikalni pregled: desni lakat	Rho	-0,036	0,311	-0,036	-0,196	-0,253	-0,257	0,133	0,161	-0,040
	P	0,803	0,023	0,810	0,359	0,212	0,236	0,508	0,421	0,856
	N	51	53	46	24	26	23	27	27	23
Fizikalni pregled: lijevi lakat	Rho	-0,050	0,307	0,107	-0,346	0,013	0,161	0,327	0,011	0,188
	P	0,728	0,025	0,477	0,097	0,948	0,464	0,096	0,956	0,391
	N	51	53	46	24	26	23	27	27	23
Fizikalni pregled: desno koljeno	Rho	-0,288	0,159	-0,077	-0,458	0,004	0,145	0,025	0,035	-0,294
	P	0,055	0,286	0,628	0,028	0,984	0,519	0,911	0,877	0,208
	N	45	47	42	23	25	22	22	22	20
Fizikalni pregled: lijevo koljeno	Rho	-0,221	0,326	0,065	-0,402	0,140	0,420	0,005	0,376	-0,217
	P	0,135	0,022	0,676	0,052	0,495	0,046	0,984	0,077	0,344
	N	47	49	44	24	26	23	23	23	21
Fizikalni pregled: desni gležanj	Rho	-0,059	0,289	0,137	-0,122	-0,192	0,434	0,134	0,215	0,234
	P	0,678	0,036	0,363	0,572	0,347	0,039	0,506	0,282	0,283
	N	51	53	46	24	26	23	27	27	23
Fizikalni pregled: lijevi gležanj	Rho	-0,073	0,349	0,045	-0,167	0,313	0,166	0,175	-0,070	0,069
	P	0,613	0,011	0,765	0,436	0,120	0,450	0,382	0,729	0,754
	N	51	53	46	24	26	23	27	27	23
Klinički skor zglobova: ukupno	Rho	-0,425	0,327	-0,091	-0,514	0,050	0,186	-0,020	0,260	-0,247
	P	0,005	0,028	0,578	0,012	0,814	0,407	0,935	0,267	0,323
	N	43	45	40	23	25	22	20	20	18

5.5. Korelacije IGF-1 i CTSG s drugim ispitivanim biljezima, te sa ultrazvučnim i kliničkim skorom

Uočena je značajna negativna korelacija CTSG sa CTX-I u teškoj hemofiliji (rho= -0,438, p=0,025) (tablica 13.).

Tablica 13. Korelacije IGF-1 i CTSG međusobno te s ostalim promatranim biljezima u bolesnika s hemofilijom: Spearmanov korelacijski koeficijent rho

		Svi bolesnici		Blaga HF		Teška HF	
		IGF-1	CTSG	IGF-1	CTSG	IGF-1	CTSG
CS846 (ng/mmol)	Rho	0,030	-0,018	0,188	-0,087	-0,177	0,026
	P	0,834	0,902	0,379	0,687	0,377	0,898
	N	51	51	24	24	27	27
uCTX-II (ng/mmol)	Rho	-0,070	-0,341	-0,115	-0,312	-0,042	-0,319
	P	0,617	0,012	0,577	0,121	0,833	0,105
	N	53	53	26	26	27	27
ADAMTS-4 (pg/mL)	Rho	-0,144	0,202	-0,209	0,252	-0,066	0,151
	P	0,341	0,178	0,339	0,247	0,764	0,492
	N	46	46	23	23	23	23
IGF-1 (nmol/L)	Rho	1,000	0,017	1,000	0,009	1,000	-0,007
	P		0,906		0,966		0,972
	N	53	53	26	26	27	27
CTSG (ng/ml)	Rho	0,017	1,000	0,009	1,000	-0,007	1,000
	P	0,906		0,966		0,972	
	N	53	53	26	26	27	27
Osteokalcin (ng/mL)	Rho	0,294	-0,226	0,371	-0,064	0,173	-0,338
	P	0,033	0,104	0,062	0,757	0,389	0,085
	N	53	53	26	26	27	27
CTX-I (ug/L)	Rho	0,203	-0,331	0,245	-0,208	0,130	-0,438
	P	0,149	0,017	0,228	0,308	0,528	0,025
	N	52	52	26	26	26	26
ALP - koštani (U/L)	Rho	0,257	0,099	0,183	0,027	0,255	0,164
	P	0,065	0,487	0,371	0,897	0,209	0,423
	N	52	52	26	26	26	26

U ispitanika s blagom hemofilijom, IGF-1 pokazuje značajnu negativnu korelaciju s HEAD-US skorom za lijevi lakat ($\rho = -0,432$, $p = 0,028$). U teškoj hemofiliji utvrdili smo značajne negativne korelacije za oba koljena (desni: $\rho = -0,569$, $p = 0,006$; lijevi: $\rho = -0,572$, $p = 0,004$) i gležnja (desni: $\rho = -0,612$, $p = 0,001$; lijevi: $\rho = -0,552$, $p = 0,003$) kao i za ukupni skor ($\rho = -0,646$, $p = 0,002$). U ispitanika s hemofilijom nismo pronašli značajnu povezanost CTSG s HEAD-US skorom, osim za lijevi lakat ($\rho = 0,463$, $p = 0,015$) u teškoj hemofiliji (tablica 14.).

Tablica 14. Korelacije IGF-1 i CTSG s ultrazvučnim skorom u bolesnika s hemofilijom: Spearmanov korelacijski koeficijent rho

		Svi bolesnici		Blaga HF		Teška HF	
		IGF-1	CTSG	IGF-1	CTSG	IGF-1	CTSG
HEAD-US: desni lakat	Rho	-0,150	-0,201	-0,168	-0,262	-0,367	0,074
	P	0,285	0,149	0,411	0,196	0,060	0,714
	N	53	53	26	26	27	27
HEAD-US: lijevi lakat	Rho	-0,244	0,067	-0,432	-0,144	-0,215	0,463
	P	0,078	0,633	0,028	0,483	0,281	0,015
	N	53	53	26	26	27	27
HEAD-US: desno koljeno	Rho	-0,414	0,016	-0,363	0,104	-0,569	0,002
	P	0,004	0,918	0,074	0,619	0,006	0,994
	N	47	47	25	25	22	22
HEAD-US: lijevo koljeno	Rho	-0,368	-0,063	-0,365	-0,012	-0,572	-0,177
	P	0,009	0,666	0,067	0,952	0,004	0,420
	N	49	49	26	26	23	23
HEAD-US: desni gležanj	Rho	-0,050	-0,043	0,257	-0,091	-0,612	0,033
	P	0,724	0,758	0,205	0,658	0,001	0,870
	N	53	53	26	26	27	27
HEAD-US: lijevi gležanj	Rho	-0,224	-0,096	-0,039	-0,150	-0,552	-0,002
	P	0,107	0,495	0,850	0,464	0,003	0,994
	N	53	53	26	26	27	27
HEAD-US: ukupno	Rho	-0,212	-0,118	-0,201	-0,235	-0,646	0,066
	P	0,162	0,440	0,336	0,257	0,002	0,781
	N	45	45	25	25	20	20

Nismo pronašli značajnu korelaciju IGF-1 s kliničkim skorom zglobova u blagoj hemofiliji. S druge strane, u teškoj hemofiliji, pokazana je značajna negativna korelacija s kliničkim skorom desnog lakta ($\rho = -0,389$, $p = 0,045$), oba koljena (desni: $\rho = -0,646$, $p = 0,001$; lijevi: $\rho = -0,496$, $p = 0,016$) i oba gležnja (desni: $\rho = -0,646$, $p = 0,000$; lijevi: $\rho = -0,611$, $p = 0,001$) kao i sa ukupnim skorom zglobova ($\rho = -0,621$, $p = 0,003$).

Nismo pronašli korelaciju CTSG sa kliničkim skorovima zglobova u blagoj i teškoj hemofiliji (tablica 15.).

Tablica 15. Korelacije IGF-1 i CTSG s kliničkim nalazima u bolesnika s hemofilijom: Spearmanov korelacijski koeficijent ρ

		Svi bolesnici		Blaga HF		Teška HF	
		IGF-1	CTSG	IGF-1	CTSG	IGF-1	CTSG
Bol	Rho	-0,003	-0,167	0,093	-0,194	-0,152	-0,096
	P	0,981	0,233	0,651	0,343	0,450	0,635
	N	53	53	26	26	27	27
Broj hemartroza godišnje	Rho	0,151	-0,041	0,307	0,069	0,101	-0,108
	P	0,280	0,769	0,127	0,739	0,618	0,593
	N	53	53	26	26	27	27
Fizikalni pregled: desni lakat	Rho	-0,088	-0,129	-0,013	-0,220	-0,389	-0,045
	P	0,530	0,359	0,948	0,281	0,045	0,823
	N	53	53	26	26	27	27
Fizikalni pregled: lijevi lakat	Rho	-0,088	-0,014	-0,227	-0,220	-0,264	0,161
	P	0,529	0,923	0,265	0,281	0,183	0,422
	N	53	53	26	26	27	27
Fizikalni pregled: desno koljeno	Rho	-0,415	-0,123	-0,292	-0,277	-0,646	0,051
	P	0,004	0,409	0,157	0,181	0,001	0,821
	N	47	47	25	25	22	22
Fizikalni pregled: lijevo koljeno	Rho	-0,230	-0,074	-0,144	-0,122	-0,496	-0,051
	P	0,112	0,612	0,482	0,554	0,016	0,817
	N	49	49	26	26	23	23
Fizikalni pregled: desni gležanj	Rho	-0,018	-0,053	0,384	0,148	-0,646	-0,130
	P	0,898	0,707	0,053	0,471	0,000	0,517
	N	53	53	26	26	27	27
Fizikalni pregled: lijevi gležanj	Rho	-0,180	-0,139	-0,006	-0,229	-0,611	-0,083
	P	0,197	0,322	0,976	0,260	0,001	0,681
	N	53	53	26	26	27	27
Klinički skor zglobova: ukupno	Rho	-0,100	-0,144	0,016	-0,208	-0,621	-0,103
	P	0,515	0,347	0,939	0,318	0,003	0,664
	N	45	45	25	25	20	20

5.6. Korelacije OC, CTX-I i koštane ALP s drugim ispitivanim biljezima, te sa ultrazvučnim i kliničkim skorom

Rezultati pokazuju pozitivnu korelaciju OC s CTX-I ($\rho=0,520$, $p=0,006$) i s koštanom ALP ($\rho=0,416$, $p=0,035$) u teškoj hemofiliji (tablica 16.).

Tablica 16. Korelacije osteokalcina, CTX-I i koštane ALP međusobno te s ostalim promatranim biljezima u bolesnika s hemofilijom: Spearmanov korelacijski koeficijent rho

		Svi bolesnici			Blaga HF			Teška HF		
		Osteo- kalcin	CTX-I	ALP – košt.	Osteo- kalcin	CTX-I	ALP – košt.	Osteo- kalcin	CTX-I	ALP – košt.
CS846 (ng/mmol)	Rho	0,056	0,003	0,073	0,301	0,311	0,338	-0,115	-0,164	-0,076
	P	0,696	0,984	0,613	0,153	0,139	0,106	0,569	0,422	0,711
	N	51	50	50	24	24	24	27	26	26
uCTX-II (ng/mmol)	Rho	0,213	0,260	-0,189	0,045	-0,010	-0,422	0,269	0,388	-0,095
	P	0,125	0,063	0,180	0,825	0,962	0,032	0,174	0,049	0,645
	N	53	52	52	26	26	26	27	26	26
ADAMTS-4 (pg/mL)	Rho	-0,044	-0,101	-0,133	0,035	-0,024	-0,136	-0,137	-0,252	-0,178
	P	0,770	0,502	0,377	0,875	0,914	0,535	0,532	0,246	0,415
	N	46	46	46	23	23	23	23	23	23
IGF-1 (nmol/L)	Rho	0,294	0,203	0,257	0,371	0,245	0,183	0,173	0,130	0,255
	P	0,033	0,149	0,065	0,062	0,228	0,371	0,389	0,528	0,209
	N	53	52	52	26	26	26	27	26	26
CTSG (ng/ml)	Rho	-0,226	-0,331	0,099	-0,064	-0,208	0,027	-0,338	-0,438	0,164
	P	0,104	0,017	0,487	0,757	0,308	0,897	0,085	0,025	0,423
	N	53	52	52	26	26	26	27	26	26
Osteokalcin (ng/mL)	Rho	1,000	0,380	0,280	1,000	0,244	0,127	1,000	0,520	0,416
	P		0,005	0,044		0,229	0,538		0,006	0,035
	N	53	52	52	26	26	26	27	26	26
CTX-I (ug/L)	Rho	0,380	1,000	0,184	0,244	1,000	0,279	0,520	1,000	0,145
	P	0,005		0,191	0,229		0,168	0,006		0,480
	N	52	52	52	26	26	26	26	26	26
ALP - koštani (U/L)	Rho	0,280	0,184	1,000	0,127	0,279	1,000	0,416	0,145	1,000
	P	0,044	0,191		0,538	0,168		0,035	0,480	
	N	52	52	52	26	26	26	26	26	26

U skupini s blagom hemofilijom, korelacija OC s HEAD-US skorom nije pokazala značajnost, osim kod desnog koljena, gdje je zabilježena negativna korelacija ($\rho = -0,486$, $p = 0,014$). U skupini s teškom hemofilijom, korelacijska analiza između OC i HEAD-US skora nije pokazala značajne povezanosti ni za jedan od pojedinačnih zglobova niti za ukupni skor. Nije uočena korelacija OC s kliničkim skorom (tablice 17. i 18.).

Tablica 17. Korelacije osteokalcina, CTX-I i koštane ALP s ultrazvučnim skorom u bolesnika s hemofilijom: Spearmanov korelacijski koeficijent rho

		Svi bolesnici			Blaga HF			Teška HF		
		Osteo-kalcin	CTX-I	ALP – košt.	Osteo-kalcin	CTX-I	ALP – košt.	Osteo-kalcin	CTX-I	ALP – košt.
HEAD-US: desni lakat	Rho	0,119	0,043	0,018	-0,277	-0,241	-0,247	0,204	-0,148	0,091
	P	0,395	0,761	0,897	0,170	0,236	0,223	0,307	0,471	0,660
	N	53	52	52	26	26	26	27	26	26
HEAD-US: lijevi lakat	Rho	-0,102	0,015	0,065	-0,347	-0,198	-0,330	-0,134	-0,347	0,121
	P	0,469	0,915	0,646	0,082	0,333	0,100	0,506	0,083	0,555
	N	53	52	52	26	26	26	27	26	26
HEAD-US: desno koljeno	Rho	-0,087	0,099	-0,085	-0,486	-0,111	-0,222	0,130	0,175	0,089
	P	0,561	0,513	0,573	0,014	0,599	0,286	0,566	0,449	0,700
	N	47	46	46	25	25	25	22	21	21
HEAD-US: lijevo koljeno	Rho	-0,036	-0,033	-0,373	-0,362	-0,309	-0,472	0,077	0,009	-0,476
	P	0,806	0,826	0,009	0,069	0,124	0,015	0,727	0,969	0,025
	N	49	48	48	26	26	26	23	22	22
HEAD-US: desni gležanj	Rho	-0,007	0,050	0,025	-0,110	-0,186	0,042	-0,124	-0,087	-0,168
	P	0,963	0,725	0,860	0,592	0,362	0,840	0,537	0,671	0,413
	N	53	52	52	26	26	26	27	26	26
HEAD-US: lijevi gležanj	Rho	-0,011	-0,010	-0,026	-0,220	-0,365	-0,067	-0,102	-0,011	-0,201
	P	0,936	0,942	0,857	0,279	0,067	0,747	0,614	0,956	0,324
	N	53	52	52	26	26	26	27	26	26
HEAD-US: ukupno	Rho	-0,085	0,037	-0,145	-0,375	-0,308	-0,311	0,055	0,070	-0,151
	P	0,580	0,810	0,347	0,065	0,135	0,131	0,818	0,775	0,537
	N	45	44	44	25	25	25	20	19	19

Naši rezultati nisu pokazali značajne korelacije između koštane ALP i HEAD-US skora osim što je zabilježena negativna korelacija za lijevo koljeno u obje skupine ($\rho = -0,472$, $p = 0,015$ za blagu i $\rho = -0,476$, $p = 0,025$ za tešku

hemofiliju). Nisu pronađene korelacije koštane ALP s kliničkim skorom zglobova, izuzev negativne s desnim gležnjem u teškoj hemofiliji ($\rho = -0,421$, $p = 0,032$).

U našoj analizi nije uočena korelacija CTX-I sa kliničkim i HEAD-US skorom u blagoj i teškoj hemofiliji (tablice 17. i 18.).

Tablica 18. Korelacije osteokalcina, CTX-I i koštane ALP s kliničkim nalazima u bolesnika s hemofilijom: Spearmanov korelacijski koeficijent ρ

		Svi bolesnici			Blaga HF			Teška HF		
		Osteo-kalcin	CTX-I	ALP – košt.	Osteo-kalcin	CTX-I	ALP – košt.	Osteo-kalcin	CTX-I	ALP – košt.
Bol	Rho	0,016	0,036	-0,171	-0,099	-0,135	-0,496	0,054	0,061	0,018
	P	0,908	0,801	0,226	0,632	0,512	0,010	0,789	0,768	0,929
	N	53	52	52	26	26	26	27	26	26
Broj hemartroza godišnje	Rho	0,330	0,319	0,277	0,307	-0,147	0,067	0,341	0,466	0,281
	P	0,016	0,021	0,047	0,127	0,474	0,746	0,082	0,016	0,165
	N	53	52	52	26	26	26	27	26	26
Fizikalni pregled: desni lakat	Rho	0,238	0,175	0,127	-0,067	0,027	0,333	0,290	0,075	0,062
	P	0,086	0,213	0,370	0,746	0,897	0,096	0,142	0,717	0,763
	N	53	52	52	26	26	26	27	26	26
Fizikalni pregled: lijevi lakat	Rho	0,069	0,128	0,113	-0,027	-0,294	-0,040	-0,017	-0,059	-0,051
	P	0,626	0,365	0,424	0,897	0,145	0,846	0,933	0,774	0,803
	N	53	52	52	26	26	26	27	26	26
Fizikalni pregled: desno koljeno	Rho	0,070	0,193	-0,118	-0,037	0,273	-0,275	0,046	-0,060	-0,017
	P	0,640	0,198	0,435	0,862	0,187	0,183	0,839	0,798	0,941
	N	47	46	46	25	25	25	22	21	21
Fizikalni pregled: lijevo koljeno	Rho	0,099	0,074	-0,223	0,175	0,087	-0,211	0,032	-0,003	-0,334
	P	0,497	0,618	0,127	0,392	0,673	0,301	0,886	0,988	0,129
	N	49	48	48	26	26	26	23	22	22
Fizikalni pregled: desni gležanj	Rho	0,118	0,139	-0,019	0,251	-0,041	0,210	-0,094	0,031	-0,421
	P	0,401	0,326	0,893	0,217	0,842	0,304	0,642	0,881	0,032
	N	53	52	52	26	26	26	27	26	26
Fizikalni pregled: lijevi gležanj	Rho	0,043	-0,009	-0,041	0,041	-0,241	-0,177	-0,246	-0,244	-0,297
	P	0,760	0,948	0,773	0,844	0,235	0,388	0,217	0,229	0,140
	N	53	52	52	26	26	26	27	26	26
Klinički skor zglobova: ukupno	Rho	0,066	0,182	-0,111	0,003	0,029	-0,197	0,103	0,083	-0,255
	P	0,669	0,237	0,475	0,990	0,892	0,344	0,665	0,737	0,293
	N	45	44	44	25	25	25	20	19	19

5.7. Proteomika

Ukupno je identificirano 788 proteina, pri čemu je 97 % identificiranih proteina izraženo u svim analiziranim skupinama. Za svaki protein posebno analizirali smo trendove ekspresije uspoređujući ih između skupina ispitanika: onih s teškom hemofilijom, onih s blagom hemofilijom i zdravih kontrola. Time smo istražili kako se ekspresija proteina razlikuje ne samo između ispitanika s hemofilijom i zdravih kontrola, već i unutar skupina oboljelih od hemofilije, prema težini bolesti. Za značajno pojačano/smanjeno izražene proteine, provedeno je sveobuhvatno pretraživanje literature koristeći baze podataka PubMed, Web of Science i UniProt (89).

5.7.1. Proteini pojačano izraženi u teškoj hemofiliji u odnosu na zdrave

Tablica 19. Proteini značajno pojačano izraženi u teškoj hemofiliji u odnosu na zdrave

Pristupni kod	Ime gena	Opis	logFC
P69891	HBG1	Hemoglobin subunit gamma-1 (Gamma-1-globin) (Hb F Agamma) (Hemoglobin gamma-1 chain) (Hemoglobin gamma-A chain)	2,78
P05019	IGF1	Insulin-like growth factor I (IGF-I) (Mechano growth factor) (MGF) (Somatomedin-C)	2,44
Q6P179	ERAP2	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 (EC 3.4.11.-) (Leukocyte-derived arginine aminopeptidase) (L-RAP)	2,1
A0A075B7D0	IGHV1OR15-1	Immunoglobulin heavy variable 1/OR15-1 (non-functional)	2,1
P01880	IGHD	Immunoglobulin heavy constant delta (Ig delta chain C region) (Ig delta chain C region NIG-65) (Ig delta chain C region WAH)	1,71
P08311	CTSG	Cathepsin G (CG) (EC 3.4.21.20) [Cleaved into: Cathepsin G, C-terminal truncated form]	1,66

P13727	PRG2	Bone marrow proteoglycan (BMPG) (Proteoglycan 2) [Cleaved into: Eosinophil granule major basic protein (EMBP) (MBP) (Pregnancy-associated major basic protein)]	1,53
P00568	AK1	Adenylate kinase isoenzyme 1 (AK 1) (EC 2.7.4.10) (EC 2.7.4.3) (EC 2.7.4.6) (ATP-AMP transphosphorylase 1) (ATP:AMP phosphotransferase) (Adenylate monophosphate kinase) (Myokinase)	1,49
Q9UKU6	TRHDE	Thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme (TRH-DE) (TRH-degrading ectoenzyme) (EC 3.4.19.6) (Pyroglutamyl-peptidase II) (PAP-II) (TRH-specific aminopeptidase) (Thyroliberinase)	1,42
P0DP23	CALM1	Calmodulin-1	1,33
P08519	LPA	Apolipoprotein (a) (Apo(a)) (Lp(a)) (EC 3.4.21.-)	1,29
Q96KN2	CNDP1	Beta-Ala-His dipeptidase (EC 3.4.13.20) (CNDP dipeptidase 1) (Carnosine dipeptidase 1) (Glutamate carboxypeptidase-like protein 2) (Serum carnosinase)	1,23
Q4KWH8	PLCH1	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1 (EC 3.1.4.11) (Phosphoinositide phospholipase C-eta-1) (Phospholipase C-eta-1) (PLC-eta-1) (Phospholipase C-like protein 3) (PLC-L3)	1,16
P35579	MYH9	Myosin-9 (Cellular myosin heavy chain, type A) (Myosin heavy chain 9) (Myosin heavy chain, non-muscle IIa) (Non-muscle myosin heavy chain A) (NMMHC-A) (Non-muscle myosin heavy chain IIa) (NMMHC II-a) (NMMHC-IIA)	1,11
P05062	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B (EC 4.1.2.13) (Liver-type aldolase)	1,04
P06702	S100A9	Protein S100-A9 (Calgranulin-B) (Calprotectin L1H subunit) (Leukocyte L1 complex heavy chain) (Migration inhibitory factor-related protein 14) (MRP-14) (p14) (S100 calcium-binding protein A9)	1,03

Identificirali smo 16 proteina koji su pojačano izraženi u ispitanika s teškom hemofilijom u usporedbi s kontrolnom skupinom zdravih ispitanika. Tablica 19. prikazuje detaljne rezultate ekspresije ovih proteina koji su povezani s različitim biološkim procesima:

- upalni i imunološki procesi: IGF-1 (101), ERAP2 (102), CTSG (103), PRG2 (104) , TRHDE (105), LPA (106), S100A9 (89), imunoglobulini (89)
- prijenos signala: CALM1 (89)
- citokineza i adhezija stanica: MYH9 (89)
- metabolizam energije (AK1) i ugljikohidrata (ALDOB) (89)
- metabolizam proteina, proteaze: ERAP2, CTSG, TRHDE, CNDP 1 (89)
- regulacija razine tireotropin-oslobađajućeg hormona (TRH): TRHDE (89)
- modulacija rasta i stanica: IGF-1 (107)
- osteoartritis: CTSG (108)
- transport i hemostaza: HBG1 (89)
- metabolizam lipida, hidrolaza: PLCH1 (89)

5.7.2. Proteini smanjeno izraženi u teškoj hemofiliji u odnosu na zdrave

Tablica 20. Proteini značajno smanjeno izraženi u teškoj hemofiliji u odnosu na zdrave

Pristupni kod	Ime gena	Opis	logFC
Q6GTS8	PM20D1	N-fatty-acyl-amino acid synthase/hydrolase PM20D1 (EC 3.5.1.114) (EC 3.5.1.14) (Peptidase M20 domain-containing protein 1)	-2,89
Q9NP78	ABCB9	ABC-type oligopeptide transporter ABCB9 (EC 7.4.2.6) (ATP-binding cassette sub-family B member 9) (ATP-binding cassette transporter 9) (ABC transporter 9 protein) (hABCB9) (TAP-like protein) (TAPL)	-2,89
P05976	MYL1	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform (MLC1/MLC3) (MLC1F/MLC3F) (Myosin light chain alkali 1/2) (Myosin light chain A1/A2)	-2,72
P58166	INHBE	Inhibin beta E chain (Activin beta-E chain)	-2,70
A0A0B4J2H0	IGHV1-69D	Immunoglobulin heavy variable 1-69D	-2,49
P02741	CRP	C-reactive protein [Cleaved into: C-reactive protein (1-205)]	-2,13
A0A0B4J2D9	IGKV1D-13	Immunoglobulin kappa variable 1D-13	-2,07
P0DJI8	SAA1	Serum amyloid A-1 protein (SAA) [Cleaved into: Amyloid protein A (Amyloid fibril protein AA)]	-1,92
P10321	HLA-C	HLA class I histocompatibility antigen, C alpha chain (HLA-C) (HLA-Cw) (Human leukocyte antigen C)	-1,85
A0A075B6S9	IGKV1-37	Probable non-functional immunoglobulin kappa variable 1-37	-1,71
A0A075B6K2	IGLV3-12	Immunoglobulin lambda variable 3-12	-1,68
P62701	RPS4X	40S ribosomal protein S4, X isoform (SCR10) (Single copy abundant mRNA protein) (Small ribosomal subunit protein eS4)	-1,66
P10451	SPP1	Osteopontin (Bone sialoprotein 1) (Nephropontin) (Secreted phosphoprotein 1) (SPP-1) (Urinary stone protein) (Uropontin)	-1,59
Q9Y279	VSIG4	V-set and immunoglobulin domain-containing protein 4 (Protein Z39Ig)	-1,45
P35590	TIE1	Tyrosine-protein kinase receptor Tie-1 (EC 2.7.10.1)	-1,39

P01718	IGLV3-27	Immunoglobulin lambda variable 3-27 (Ig lambda chain V-IV region Kern)	-1,38
P20742	PZP	Pregnancy zone protein (C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 6)	-1,31
P04746	AMY2A	Pancreatic alpha-amylase (PA) (EC 3.2.1.1) (1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase)	-1,28
P35443	THBS4	Thrombospondin-4	-1,18
P01861	IGHG4	Immunoglobulin heavy constant gamma 4 (Ig gamma-4 chain C region)	-1,18
A0A0C4DH43	IGHV2-70D	Immunoglobulin heavy variable 2-70D	-1,18
Q13201	MMRN1	Multimerin-1 (EMILIN-4) (Elastin microfibril interface located protein 4) (Elastin microfibril interfacier 4) (Endothelial cell multimerin) [Cleaved into: Platelet glycoprotein Ia*]	-1,09
Q0VF96	CGNL1	Cingulin-like protein 1 (Junction-associated coiled-coil protein) (Paracingulin)	-1,09
Q14766	LTBP1	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1 (LTBP-1) (Transforming growth factor beta-1-binding protein 1) (TGF-beta1-BP-1)	-1,08
P49747	COMP	Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) (Thrombospondin-5) (TSP5)	-1,07
P15814	IGLL1	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (CD179 antigen-like family member B) (Ig lambda-5) (Immunoglobulin omega polypeptide) (Immunoglobulin-related protein 14.1) (CD antigen CD179b)	-1,06

Identificirali smo 26 proteina koji su smanjeno izraženi u ispitanika s teškom hemofilijom u usporedbi s kontrolnom skupinom zdravih ispitanika. Tablica 20. prikazuje detaljne rezultate ekspresije ovih proteina koji su uključeni u:

- upalne procese: SAA-1 (109), SPP1 (110), VSIG4 (111), TIE1 (112), PZP (113, 114) , THSB4 (115)
- imunološke procese: imunoglobulini, HLA-C, SPP1, VSIG4 (89), CRP (116)
- transport peptida i metabolizam proteina: ABCB9 (89)
- metabolizam proteina RPS4X (89); metabolizam proteina i energije PM20D1 (117)
- metabolizam ugljikohidrata: AMY2A (89)
- citokinezu, migraciju i adheziju stanica: MYL1 (118), THSB4 (89)
- koagulaciju krvi: MYL1 (119), MMRN1 (89, 120)
- modulaciju sekrecije hormona hipotalamusa i hipofize: INHBE (89)
- stanične signalne puteve: CGNL1 (121)
- mineralizaciju kosti: SPP1 (89)
- angiogenezu: TIE1 (89)
- remodeliranje ekstracelularnog matriksa: THSB4 (122)
- osteoartritis: SPP1 (123), THSB4 (124)
- regulaciju aktivnosti TGF-beta 1: LTBP-1 (89)
- inhibiciju proteaza: PZP (89)
- strukturu ekstracelularnog matriksa, moguće u patogenezu osteoartritisa: COMP (89)
- rak: MMRN1 (125)

5.7.3. Proteini pojačano izraženi u teškoj hemofiliji u odnosu na blagu hemofiliju

Tablica 21. Proteini značajno pojačano izraženi u teškoj hemofiliji u odnosu na blagu hemofiliju

Pristupni kod	Ime gena	Opis	logFC
P16070	CD44	CD44 antigen (CDw44) (Epican) (Extracellular matrix receptor III) (ECMR-III) (GP90 lymphocyte homing/adhesion receptor) (HUTCH-I) (Heparan sulfate proteoglycan) (Hermes antigen) (Hyaluronate receptor) (Phagocytic glycoprotein 1) (PGP-1) (Phagocytic glycoprotein I) (PGP-I) (CD antigen CD44)	2,64
P05019	IGF1	Insulin-like growth factor I (IGF-I) (Mechano growth factor) (MGF) (Somatomedin-C)	2,56
P01880	IGHD	Immunoglobulin heavy constant delta (Ig delta chain C region) (Ig delta chain C region NIG-65) (Ig delta chain C region WAH)	2,24
Q14766	LTBP1	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1 (LTBP-1) (Transforming growth factor beta-1-binding protein 1) (TGF-beta1-BP-1)	2,23
P13727	PRG2	Bone marrow proteoglycan (BMPG) (Proteoglycan 2) [Cleaved into: Eosinophil granule major basic protein (EMBP) (MBP) (Pregnancy-associated major basic protein)]	2,19
P02753	RBP4	Retinol-binding protein 4 (Plasma retinol-binding protein) (PRBP) (RBP) [Cleaved into: Plasma retinol-binding protein (1-182)]	1,94
P02775	PPBP	Platelet basic protein (PBP) (C-X-C motif chemokine 7) (Leukocyte-derived growth factor) (LDGF) (Macrophage-derived growth factor) (MDGF) (Small-inducible cytokine B7) [Cleaved into: Connective tissue-activating peptide III (CTAP-III) (LA-PF4) (Low-affinity platelet factor IV)]	1,77
Q8IWW2	CNTN4	Contactin-4 (Brain-derived immunoglobulin superfamily protein 2) (BIG-2)	1,76

P01854	IGHE	Immunoglobulin heavy constant epsilon (Ig epsilon chain C region) (Ig epsilon chain C region ND)	1,69
Q8WZ75	ROBO4	Roundabout homolog 4 (Magic roundabout)	1,67
P02776	PF4	Platelet factor 4 (PF-4) (C-X-C motif chemokine 4) (Iroplact) (Oncostatin-A) [Cleaved into: Platelet factor 4, short form (Endothelial cell growth inhibitor)]	1,58
P04439	HLA-A	HLA class I histocompatibility antigen, A alpha chain (Human leukocyte antigen A) (HLA-A)	1,37
P15814	IGLL1	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (CD179 antigen-like family member B) (Ig lambda-5) (Immunoglobulin omega polypeptide) (Immunoglobulin-related protein 14.1) (CD antigen CD179b)	1,36
A0A0C4DH67	IGKV1-8	Immunoglobulin kappa variable 1-8	1,2
P09486	SPARC	SPARC (Basement-membrane protein 40) (BM-40) (Osteonectin) (ON) (Secreted protein acidic and rich in cysteine)	1,14
Q13201	MMRN1	Multimerin-1 (EMILIN-4) (Elastin microfibril interface located protein 4) (Elastin microfibril interfacier 4) (Endothelial cell multimerin) [Cleaved into: Platelet glycoprotein Ia*]	1,14
P01706	IGLV2-11	Immunoglobulin lambda variable 2-11 (Ig gamma lambda chain V-II region DOT) (Ig lambda chain V-II region BOH) (Ig lambda chain V-II region BUR) (Ig lambda chain V-II region NIG-58) (Ig lambda chain V-II region TRO) (Ig lambda chain V-II region WIN)	1,12
P07996	THBS1	Thrombospondin-1 (Glycoprotein G)	1,08

Identificirali smo 18 proteina čija je ekspresija povećana u teškoj hemofiliji u usporedbi s blagom hemofilijom. Ovi proteini, (tablica 21.) uključeni su u:

- upalne procese: RBP4 (126), PPBP (89), CNTN4 (127), PF4 (128), SPARC (129), THBS1 (89, 130)
- imunološke procese: IGF-1, HLA-A, PRG2, THBS1 (131), imunoglobulini
- adheziju stanica i vezanje komponenti ECM-a kao što su hijaluronska kiselina i kolagen: CD44 (132)
- adheziju stanica: CNTN4 (89)
- angiogenezu: CD44 (133), ROBO4 (89), THBS1 (89), PPBP (128)
- rak: CD44 (134), ROBO4 (135), MMRN1
- osteoartritis: RBP4 (136), SPARC (137), THBS1 (138)
- signalizaciju reaktivnih kisikovih spojeva i stres ECM-a: THBS1 (89)
- regulaciju aktivnosti TGF-beta 1: LTBP-1
- citokini i kemotaksija: PPBP (139), PF4 (89)
- stanični rast: SPARC (89)
- koagulaciju krvi: MMRN1
- modulaciju rasta i diferencijaciju stanica: IGF-1
- transport retinola u plazmi: RBP4 (89)

5.7.4. Proteini smanjeno izraženi u teškoj hemofiliji u odnosu na blagu hemofiliju

Tablica 22. Proteini značajno smanjeno izraženi u teškoj hemofiliji u odnosu na blagu hemofiliju

Pristupni kod	Ime gena	Opis	logFC
Q13822	ENPP2	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2 (E-NPP 2) (EC 3.1.4.39) (Autotaxin) (Extracellular lysophospholipase D) (LysoPLD)	-1,05
P04746	AMY2A	Pancreatic alpha-amylase (PA) (EC 3.2.1.1) (1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase)	-1,28
Q9UKY3	CES1P1	Putative inactive carboxylesterase 4 (Inactive carboxylesterase 1 pseudogene 1) (Placental carboxylesterase 3) (PCE-3)	-1,36
P0DJ18	SAA1	Serum amyloid A-1 protein (SAA) [Cleaved into: Amyloid protein A (Amyloid fibril protein AA)]	-1,44
P02741	CRP	C-reactive protein [Cleaved into: C-reactive protein (1-205)]	-1,65
P0DJ19	SAA2	Serum amyloid A-2 protein (SAA2) [Cleaved into: Amyloid A2 protein (AA2)]	-1,72
P06732	CKM	Creatine kinase M-type (EC 2.7.3.2) (Creatine kinase M chain) (Creatine phosphokinase M-type) (CPK-M) (M-CK)	-1,81
A0A075B6K2	IGLV3-12	Immunoglobulin lambda variable 3-12	-2,63
P07237	P4HB	Protein disulfide-isomerase (PDI) (EC 5.3.4.1) (Cellular thyroid hormone-binding protein) (Prolyl 4-hydroxylase subunit beta) (p55)	-2,65
P10321	HLA-C	HLA class I histocompatibility antigen, C alpha chain (HLA-C) (HLA-Cw) (Human leukocyte antigen C)	-2,69
Q9BYE9	CDHR2	Cadherin-related family member 2 (Protocadherin LKC) (PC-LKC) (Protocadherin-24)	-3,42

Identificirali smo 11 proteina koji su smanjeno izraženi u ispitanika s teškom hemofilijom u usporedbi s blagom hemofilijom. Tablica 22. prikazuje detaljne rezultate ekspresije ovih proteina koji su uključeni u:

- upalne procese: ENPP2 (140), SAA-1, SAA-2 (89), CRP
- imunološke procese: imunoglobulin, HLA-C
- adheziju stanica, funkciju i integritet endotelnih barijera: CDHR2 (89, 141)
- metabolizam lipida, produkciju signalne molekule LPA (engl. lysophosphatidic acid) (89) proliferaciju i migraciju stanica (142), produkciju citokina (143), rak (144): ENPP2
- metabolizam ugljikohidrata: AMY2A
- metabolizam energije (89), osteoartritis (145): CKM
- metabolizam proteina (89), oksidoreduktaza u ekstracelularnom matriksu: P4HB (146)
- metabolizam lipida: CES1P1 (89)

5.7.5. Proteini pojačano izraženi u blagoj hemofiliji u odnosu na zdrave

Tablica 23. Proteini značajno pojačano izraženi u blagoj hemofiliji u odnosu na zdrave

Pristupni kod	Ime gena	Opis	logFC
Q9BYE9	CDHR2	Cadherin-related family member 2 (Protocadherin LKC) (PC-LKC) (Protocadherin-24)	2,96
P69891	HBG1	Hemoglobin subunit gamma-1 (Gamma-1-globin) (Hb F Agamma) (Hemoglobin gamma-1 chain) (Hemoglobin gamma-A chain)	2,65
A0A075B6I7	IGLV5-48	Probable non-functional immunoglobulin lambda variable 5-48	2,41
Q9UKY3	CES1P1	Putative inactive carboxylesterase 4 (Inactive carboxylesterase 1 pseudogene 1) (Placental carboxylesterase 3) (PCE-3)	2,34
P07237	P4HB	Protein disulfide-isomerase (PDI) (EC 5.3.4.1) (Cellular thyroid hormone-binding protein) (Prolyl 4-hydroxylase subunit beta) (p55)	2,12
Q6P179	ERAP2	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 (EC 3.4.11.-) (Leukocyte-derived arginine aminopeptidase) (L-RAP)	2,11
A0A075B7D0	IGHV1OR15-1	Immunoglobulin heavy variable 1/OR15-1 (non-functional)	2,09
P05062	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B (EC 4.1.2.13) (Liver-type aldolase)	1,76
Q4KWH8	PLCH1	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1 (EC 3.1.4.11) (Phosphoinositide phospholipase C-eta-1) (Phospholipase C-eta-1) (PLC-eta-1) (Phospholipase C-like protein 3) (PLC-L3)	1,36
Q9UKU6	TRHDE	Thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme (TRH-DE) (TRH-degrading ectoenzyme) (EC 3.4.19.6) (Pyroglutamyl-peptidase II) (PAP-II) (TRH-specific aminopeptidase) (Thyroliberinase)	1,22
P08519	LPA	Apolipoprotein (a) (Apo(a)) (Lp(a)) (EC 3.4.21.-)	1,14
P06732	CKM	Creatine kinase M-type (EC 2.7.3.2) (Creatine kinase M chain) (Creatine phosphokinase M-type) (CPK-M) (M-CK)	1,14

P09960	LTA4H	Leukotriene A-4 hydrolase (LTA-4 hydrolase) (EC 3.3.2.6) (Leukotriene A(4) hydrolase) (Tripeptide aminopeptidase LTA4H) (EC 3.4.11.4)	1,13
P0DJI9	SAA2	Serum amyloid A-2 protein (SAA2) [Cleaved into: Amyloid A2 protein (AA2)]	1,06
P08311	CTSG	Cathepsin G (CG) (EC 3.4.21.20) [Cleaved into: Cathepsin G, C-terminal truncated form]	1,05
P16930	FAH	Fumarylacetoacetase (FAA) (EC 3.7.1.2) (Beta-diketonase) (Fumarylacetoacetate hydrolase)	1,03
P17174	GOT1	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic (cAspAT) (EC 2.6.1.1) (EC 2.6.1.3) (Cysteine aminotransferase, cytoplasmic) (Cysteine transaminase, cytoplasmic) (cCAT) (Glutamate oxaloacetate transaminase 1) (Transaminase A)	1,01

Identificirali smo 17 proteina čija je ekspresija povećana u blagoj hemofiliji u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Ovi proteini, navedeni u tablici 23., uključeni su u:

- upalne i imunološke procese: ERAP2, LPA, LTA4H (147), CTSG, TRHDE, SAA2, imunoglobulin, FAH (148)
- adheziju stanica, funkciju i integritet endotelnih barijera: CDHR2
- metabolizam lipida (CES1P1), ugljikohidrata (ALDOB) i energije (CKM)
- sintezu L-glutamata, neuroprotekciju, glukoneogenezu: GOT1 (89)
- katabolizam aminokiselina fenilalanina i tirozina: FAH (89)
- metabolizam lipida i lipoproteina, sinteza proupalnih leukotriena: LTA4H (89)
- metabolizam proteina, oksidoreduktaza u ekstracelularnom matriksu: P4HB
- metabolizam lipida, hidrolaza: PLCH1
- transport i hemostazu: HBG1
- osteoartritis: CTSG i FAH (149)

5.7.6. Proteini smanjeno izraženi u blagoj hemofiliji u odnosu na zdrave

Tablica 24. Proteini značajno smanjeno izraženi u blagoj hemofiliji u odnosu na zdrave

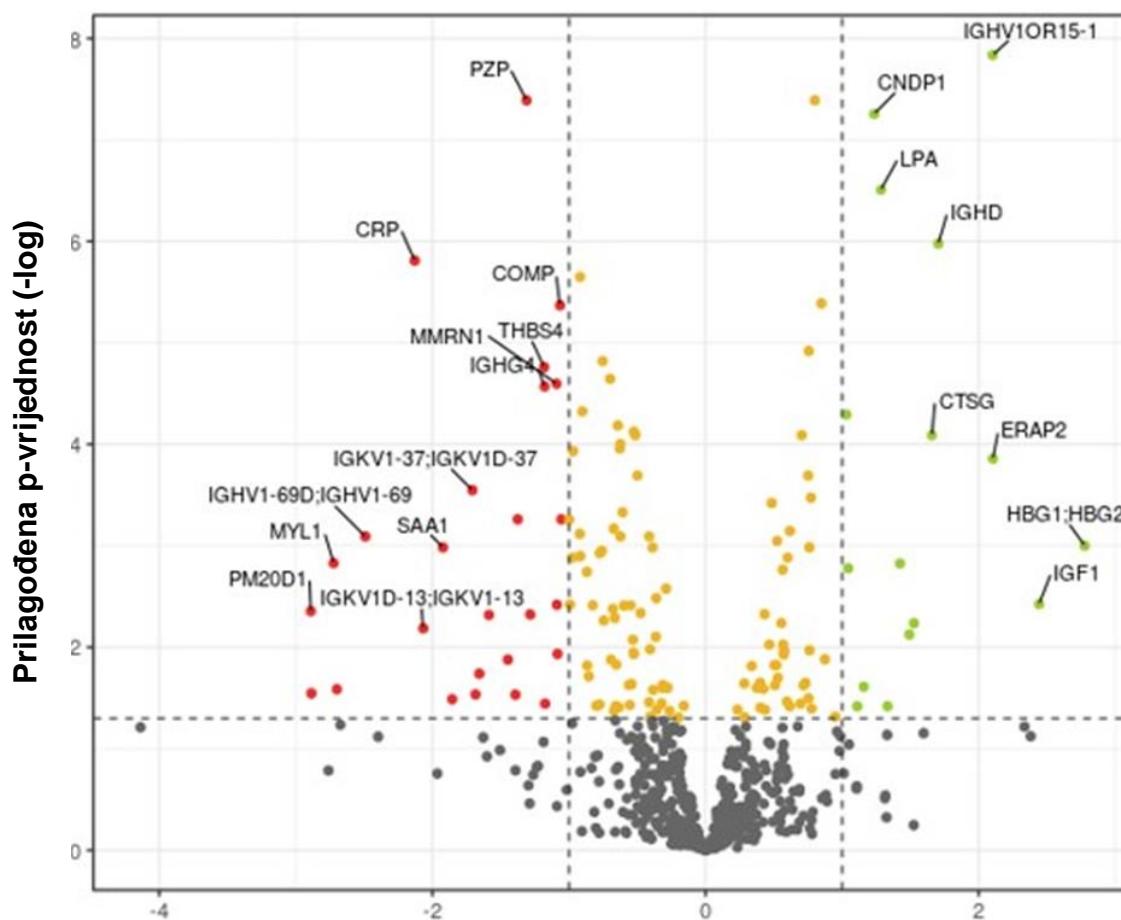
Pristupni kod	Ime gena	Opis	logFC
P14314	PRKCSH	Glucosidase 2 subunit beta (80K-H protein) (Glucosidase II subunit beta) (Protein kinase C substrate 60.1 kDa protein heavy chain) (PKCSH)	-3,41
Q14766	LTBP1	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1 (LTBP-1) (Transforming growth factor beta-1-binding protein 1) (TGF-beta1-BP-1)	-3,31
A0A075B6K4	IGLV3-10	Immunoglobulin lambda variable 3-10	-2,97
P05976	MYL1	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform (MLC1/MLC3) (MLC1F/MLC3F) (Myosin light chain alkali 1/2) (Myosin light chain A1/A2)	-2,53
P10451	SPP1	Osteopontin (Bone sialoprotein 1) (Nephropontin) (Secreted phosphoprotein 1) (SPP-1) (Urinary stone protein) (Uropontin)	-2,48
P15814	IGLL1	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (CD179 antigen-like family member B) (Ig lambda-5) (Immunoglobulin omega polypeptide) (Immunoglobulin-related protein 14.1) (CD antigen CD179b)	-2,41
A0A075B6S9	IGKV1-37	Probable non-functional immunoglobulin kappa variable 1-37	-2,41
Q13201	MMRN1	Multimerin-1 (EMILIN-4) (Elastin microfibril interface located protein 4) (Elastin microfibril interfacier 4) (Endothelial cell multimerin) [Cleaved into: Platelet glycoprotein Ia*]	-2,23
P02775	PPBP	Platelet basic protein (PBP) (C-X-C motif chemokine 7) (Leukocyte-derived growth factor) (LDGF) (Macrophage-derived growth factor) (MDGF) (Small-inducible cytokine B7) [Cleaved into: Connective tissue-activating peptide III (CTAP-III) (LA-PF4) (Low-affinity platelet factor IV)]	-2,14
P09486	SPARC	SPARC (Basement-membrane protein 40) (BM-40) (Osteonectin) (ON) (Secreted protein acidic and rich in cysteine)	-2,14
Q9Y279	VSIG4	V-set and immunoglobulin domain-containing protein 4 (Protein Z39Ig)	-2,12

Q8WZ75	ROBO4	Roundabout homolog 4 (Magic roundabout)	-2,03
P01854	IGHE	Immunoglobulin heavy constant epsilon (Ig epsilon chain C region) (Ig epsilon chain C region ND)	-1,92
P01718	IGLV3-27	Immunoglobulin lambda variable 3-27 (Ig lambda chain V-IV region Kern)	-1,86
P02776	PF4	Platelet factor 4 (PF-4) (C-X-C motif chemokine 4) (Iroplact) (Oncostatin-A) [Cleaved into: Platelet factor 4, short form (Endothelial cell growth inhibitor)]	-1,74
P07996	THBS1	Thrombospondin-1 (Glycoprotein G)	-1,58
A0A0B4J2H0	IGHV1-69D	Immunoglobulin heavy variable 1-69D	-1,55
A0A075B6K0	IGLV3-16	Immunoglobulin lambda variable 3-16	-1,39
P01861	IGHG4	Immunoglobulin heavy constant gamma 4 (Ig gamma-4 chain C region)	-1,31
A0A0C4DH34	IGHV4-28	Immunoglobulin heavy variable 4-28	-1,27
A0A075B6K5	IGLV3-9	Immunoglobulin lambda variable 3-9	-1,26
P20742	PZP	Pregnancy zone protein (C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 6)	-1,23
P61769	B2M	Beta-2-microglobulin [Cleaved into: Beta-2-microglobulin form pl 5.3]	-1,20
A0A0A0MRZ9	IGLV5-52	Immunoglobulin lambda variable 5-52	-1,18
Q0VF96	CGNL1	Cingulin-like protein 1 (Junction-associated coiled-coil protein) (Paracingulin)	-1,09
P02760	AMBP	Protein AMBP (Protein HC) [Cleaved into: Alpha-1-microglobulin] (EC 1.6.2.-) (Alpha-1 microglycoprotein) (Complex-forming glycoprotein heterogeneous in charge)	-1,08
P40197	GP5	Platelet glycoprotein V (GPV) (Glycoprotein 5) (CD antigen CD42d)	-1,06
P04439	HLA-A	HLA class I histocompatibility antigen, A alpha chain (Human leukocyte antigen A) (HLA-A)	-1,05
A0A075B6R2	IGHV4-4	Immunoglobulin heavy variable 4-4	-1,00

Identificirali smo 29 proteina koji su smanjeno izraženi u blagoj hemofiliji u odnosu na zdrave ispitanike. Tablica 24. prikazuje detaljne rezultate ekspresije ovih proteina koji su uključeni u:

- upalne procese: SPP1, SPARC, THBS1, PZP, VSIG4
- imunološke procese: SPP1, imunoglobulini, VSIG4, THSB1, BM2 (89), HLA-A
- citokinezu, migraciju i adheziju stanica: MYL1
- regulaciju aktivnosti TGF-beta: LTBP1
- citokini i kemotaksija: PPBP, PF4
- stanične signalne puteve: CGNL1
- stanični rast: SPARC
- osteoartritis: SPP1, THSB1, SPARC, B2M (150)
- angiogenezu: ROBO4
- inhibiciju proteza: PZP
- metabolizam ugljikohidrata, razgradnju oligosaharida i sazrijevanje glikoproteina: PRKCSH (89)
- rak: MMRN1, ROBO4
- koagulaciju krvi: MYL1, MMRN1
- mineralizaciju kosti: SPP1
- antioksidans: AMBP (89)
- hemostazu, adheziju trombocita preko von Willebrandova faktora, dio GPIb-V-IX kompleksa: GP5 (89)

Proteini koji su imali značajno različite razine izražavanja u ispitanika s teškom hemofilijom u usporedbi s zdravim ispitanicima prikazani su na vulkanskom grafikonu (slika 4.). Unaprijed određeni pragovi postavljeni su sa statističkom značajnošću p-vrijednosti $< 0,05$ i minimalno dva puta razlikom u smanjenom/prekomjernom izražavanju između dvije grupe, određeno prema njihovim omjerima \log_2 transformiranih LFQ intenziteta. Ukupno 16 proteina bilo je značajno pojačano izraženo, a 26 proteina značajno smanjeno izraženo u teškoj hemofiliji u usporedbi sa zdravim pojedincima.



Logaritamske promjene razine proteina – hemofilija u odnosu na zdrave ispitanike

Slika 4. Grafički prikaz pojačano i smanjeno izraženih proteina u bolesnika s teškom hemofilijom u odnosu na zdrave ispitanike

Vulkanski grafikon uspoređuje razine izraženosti proteina u plazmi bolesnika s teškom hemofilijom i zdravim ispitanicima. Isprekidane linije na grafikonu označavaju pragove: prvo, p-vrijednost $\leq 0,05$ (prilagodba vrijednosti na višestruko testiranje hipoteza koristeći metodu Benjamini & Hochberg, $-\log_{10}$ transformirano) i drugo, \log_2 -transformirani omjer teške hemofilije naspram kontrolnih ispitanika veći od 1, ili manji od -1. Pojačano i smanjeno izraženi proteini koji zadovoljavaju oba praga prikazani su zelenim i crvenim točkama. Žute točke predstavljaju proteine koji nisu zadovoljili drugi prag.

U tablici 25. naveli smo proteine koje smatramo klinički/patofiziološki relevantnima za razvoj HA na temelju njihovih bioloških funkcija i rezultata

prethodnih studija u RA, OA i HA. Njihov potencijalni značaj povezan je s ulogama u upalnim procesima i strukturalnom integritetu zglobova, kao i s podacima iz literature koji ukazuju na njihovu uključenost u patofiziologiju ovih bolesti. Referirali smo se na studije o RA i OA za proteine za koje nismo našli odgovarajuće studije specifične za HA. Ovi proteini mogu imati slične uloge u HA, što ih čini potencijalno važnima za daljnja istraživanja u kontekstu ove bolesti.

Tablica 25. Različito izraženi proteini, njihove biološke funkcije prema UniProt (89) bazi podataka i potencijalni klinički/patofiziološki značaj za hemofilichnu artropatiju

Naziv proteina	Biološka funkcija	Potencijalni značaj za HA
Cathepsin G (CTSG)	<ul style="list-style-type: none"> – serinska proteaza, degradacija ECM-a, kontrolira aktivnost i migraciju imunoloških stanica – stimulacija citokina – aktivacija MMP-a 	<ul style="list-style-type: none"> – uključen u kronične upalne bolesti – degradacija lubrikina u osteoartritisu – mogući kemotaktički učinak u sinovitisu reumatoidnog artritisa (103, 108)
Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 (ERAP2)	<ul style="list-style-type: none"> – obrada peptida za prezentaciju imunološkom sustavu putem kompleksa glavne histokompatibilnosti klase I 	<ul style="list-style-type: none"> – polimorfizmi nukleotida gena ERAP2 povezani su s razvojem ankilozantnog spondilitisa u HLA B27 pozitivnih (102, 151) – povezanost HLA B27 antigena s kroničnim sinovitisom u teškoj hemofiliji (152)
S100-A9	<ul style="list-style-type: none"> – indukcija kemotaksije, degranulacije i adhezije neutrofila – regrutacija leukocita, stimulacija citokina – stimulacija prirodnih imunoloških stanica 	<ul style="list-style-type: none"> – moguće razlikovanje reumatoidnog artritisa od zdravih – indukcija upale (153)
Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)	<ul style="list-style-type: none"> – poticanje diferencijacije hondrocita i osteoblasta in vitro 	<ul style="list-style-type: none"> – moguća uloga u regulaciji apoptoze T stanica u reumatoidnom artritisu (154, 155)
Apolipoprotein (a) (Apo(a))	<ul style="list-style-type: none"> – ima aktivnost serinske proteinaze – inhibicija aktivnosti tkivnog aktivatora plazminogena 1 	<ul style="list-style-type: none"> – lokalna sinovijalna supresija proupalnih citokina TNF-α i IL-1β – odsutan tijekom remisije reumatoidnog artritisa - moguće specifičan za aktivnu bolest (106)

Osteopontin (OPN)	<ul style="list-style-type: none"> – nekolageni protein kosti, veže se za hidroksiapatit – djeluje kao citokin, potiče proizvodnju IFN-γ i IL-12, smanjuje proizvodnju IL-10, bitan za razvoj imuniteta tipa I – degradacija ECM-a 	<ul style="list-style-type: none"> – sinovitis i degradacija hrskavice – razine u sinovijalnoj tekućini povezane s progresijom osteoartritisa koljena – povećan u sinovitisu dječaka s hemofilijom, mogući biljeg rane faze bolesti zglobova uzrokovane krvlju (110, 123, 156, 157)
Pregnancy zone protein (PZP)	<ul style="list-style-type: none"> – inhibicija proteaza 	<ul style="list-style-type: none"> – povećana razina u egzosomima iz sinovijalne tekućine u reumatoidnom artritisu – pojačano izražen u proteomskom profilu seruma i povišenih vrijednosti u serumu u reumatoidnom artritisu (113, 114)
Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)	<ul style="list-style-type: none"> – struktura ECM-a hrskavice, interakcija s kolagenom – moguća uloga u patogenezi osteoartritisa 	<ul style="list-style-type: none"> – mogući biljeg pregradnje hrskavice – moguća korelacija s težinom hemofilične artropatije – proturječni rezultati razine kod bolesnika s hemofiličnom artropatijom (38, 39, 41, 69, 70, 158)
CD44	<ul style="list-style-type: none"> – receptor za adheziju stanica – veže komponente ECM-a (hijaluronsku kiselinu, kolagen, faktore rasta, citokine) 	<ul style="list-style-type: none"> – uključen u patološku angiogenezu (133)
Cadherin-related family member 2 (CDHR2)	<ul style="list-style-type: none"> – adhezija stanica 	<ul style="list-style-type: none"> – moguće narušavanje endotelne barijere kod teške hemofilične artropatije (141)

6. RASPRAVA

Hemofilija, obilježena epizodama krvarenja, zahtijeva kontinuiranu evaluaciju HA kako bi se rano otkrile patološke promjene. Ovaj pristup je ključan za sprječavanje napredovanja artropatije i poboljšanje kvalitete života bolesnika. Unatoč profilaktičkom liječenju, neizbježno je da se kod određenog broja bolesnika s teškom hemofilijom javljaju krvarenja u zglobovima.

U procjeni stupnja HA koriste se klinički pokazatelji i slikovne pretrage. U istraživanju korisnosti biljega u procjeni težine HA, analiziramo korelaciju između biljega i stupnja HA, slijedeći BIPED (engl. Burden of Disease, Investigative, Prognostic, Efficacy of Intervention, Diagnostic) klasifikaciju (34, 36). Podjela biljega prema njihovim funkcijama, poput težine bolesti, olakšava razumijevanje njihovih potencijalnih uloga u HA. Važno je napomenuti da većina istraživanja biljega provedenih u području OA koristi ovu klasifikaciju.

Otkriće lako dostupnog biljega hrskavice, koji može otkriti aktivni patološki proces prije nego što promjene postanu vidljive klinički ili slikovnim pregledom, otvorilo bi mogućnost za rano otkrivanje i pravovremenu intervenciju. Kolagen tipa II i agrekan, kao ključni biljezi hrskavice, najzastupljeniji su i najčešće istraživani biljezi u OA. Iako pružaju vrijedne biološke uvide u istraživačkim studijama, ovi biljezi još nisu standardizirani niti su dostigli razinu pouzdanosti potrebnu za široku kliničku primjenu, uključujući rutinsku dijagnostiku i praćenje bolesti (35).

Naši klinički i ultrazvučni rezultati pokazuju da bolesnici s teškom hemofilijom imaju značajno veća oštećenja zglobova u odnosu na one s blagom hemofilijom. Najviše su oštećeni gležnjevi, zatim koljena i laktovi. Bitno je naglasiti da ispitanici s teškom hemofilijom imaju ukupno devet endoproteza koljena, što je važno jer takvi zglobovi nisu bodovani ni klinički ni ultrazvučno.

U ovom istraživanju analizirana je povezanost između biljega pregradnje hrskavice i kosti s težinom HA. Analiza je obuhvatila biljeg sinteze proteoglikana (CS846), razgradnju kolagena tipa II (uCTX-II), agrekanazu (ADAMTS-4), biljege koštane sinteze (OC i koštana ALP) i razgradnje (CTX-I).

Naše istraživanje pruža prve rezultate proteomske analize plazme, ističući proteine koji bi mogli biti od potencijalnog značaja za HA. Poseban fokus je stavljen na IGF-1 i CTSG, izdvojene iz proteomske analize, koji pružaju dodatni uvid u biološke procese povezane s HA.

6.1. Vrijednost biljega uCTX-II i CS846 u ocjeni težine hemofilične artropatije

Kolagen tipa II igra ključnu ulogu u strukturi i funkciji hrskavice, te je njegova degradacija značajan pokazatelj artropatskih promjena. Naše istraživanje je pokazalo značajne razlike u razinama uCTX-II između zdravih ispitanika (192,99 ng/mmol), ispitanika s blagom (243,34 ng/mmol) i teškom hemofilijom (422,88 ng/mmol) ($p < 0,001$), pri čemu su razine uCTX-II rasle s težinom bolesti. Više razine uCTX-II u teškoj hemofiliji sugeriraju intenzivniju degradaciju kolagena tipa II. Naši rezultati pokazuju da uCTX-II može poslužiti kao pokazatelj oštećenja zglobova, pri čemu se jasno primjećuje povećanje vrijednosti s težinom hemofilije i HA.

Naša analiza nije pokazala značajnu korelaciju između uCTX-II i pojedinačnih i ukupnih kliničkih i HEAD-US skorova zglobova u bolesnika s blagom i teškom hemofilijom. Međutim kada se uCTX-II korelira s kliničkim i HEAD-US skorom za cijelu skupinu bolesnika s hemofilijom pokazuje značajne pozitivne korelacije.

Korelacije s HEAD-US skorom za cijelu skupinu bolesnika s hemofilijom pokazuju značajne pozitivne korelacije s ukupnim skorom ($\rho=0,308$, $p=0,040$), kao i sa pojedinačnim zglobovima (desni lakat: $\rho=0,309$, $p=0,024$, lijevi lakat: $\rho=0,294$, $p=0,033$, lijevo koljeno: $\rho=0,356$, $p=0,012$, lijevi gležanj: $\rho=0,282$, $p=0,041$).

Korelacije s kliničkim skorom za cijelu skupinu bolesnika s hemofilijom pokazuju značajne pozitivne korelacije s ukupnim skorom ($\rho=0,327$, $p=0,028$), kao i sa pojedinačnim zglobovima (desni lakat: $\rho=0,311$, $p=0,023$, lijevi lakat: $\rho=0,307$, $p=0,025$, lijevo koljeno: $\rho=0,326$, $p=0,022$, desni gležanj: $\rho=0,289$, $p=0,036$, lijevi gležanj: $\rho=0,349$, $p=0,011$).

Ovi rezultati ukazuju na to da postoji veza između degradacije kolagena tipa II i oštećenja zglobova i da su više vrijednosti uCTX-II povezane s većim oštećenjima. Odsustvo korelacije između uCTX-II i kliničkih i HEAD-US skorova kod pojedinačnih skupina s blagom i teškom hemofilijom može biti rezultat drugih faktora. Kod malih skupina ispitanika ne postoji dovoljno statističke snage za detekciju korelacija unutar skupina. Kada se podaci kombiniraju, moguće je da se pojave trendovi koji nisu vidljivi unutar pojedinačnih skupina.

Agrekan, kao najvažniji proteoglikan hrskavice, ima vitalnu ulogu u njezinom integritetu i funkciju. Rezultati analize razine CS846 u zdravih ispitanika (45,03 ng/mmol), ispitanika s blagom (47,63 ng/mmol) i s teškom hemofilijom (43,48 ng/mmol) nisu pokazali značajne razlike ($p=0,457$), ukazujući na nedostatak promjena s težinom bolesti. Iako su razine CS846 podjednake u sve tri skupine ispitanika, pokazana je različita korelacije s HEAD-US skorom u blagoj i teškoj hemofiliji. U ispitanika s blagom hemofilijom, CS846 pokazuje značajne negativne korelacije s HEAD-US skorom za lijevi lakat ($\rho = -0,468$, $p=0,021$), desno koljeno ($\rho = -0,465$, $p=0,025$) i lijevo koljeno ($\rho = -0,519$, $p=0,009$), kao i jaku negativnu korelaciju s ukupnim HEAD-US skorom ($\rho = -0,609$, $p=0,002$).

Ovi rezultati pokazuju da su niže vrijednosti CS846 povezane s većim oštećenjima zglobova. Nasuprot tome, u ispitanika s teškom hemofilijom nije bilo značajne povezanosti između CS846 i HEAD-US skora za nijedan pojedinačni zglob ili ukupan skor. Značajne negativne korelacije u blagoj hemofiliji sugeriraju da oštećenja hrskavice mogu biti povezana s nedostatnim ili neučinkovitim odgovorom hrskavice u smislu sinteze novog agrekana. Nedostatak korelacija u teškoj hemofiliji sugerira da kod većih oštećenja hrskavice, kapacitet za obnovu agrekana može biti nadmašen ili neučinkovit. Osim toga u teškoj HA istovremeno mogu biti aktivni i drugi procesi, poput upale, koji mogu utjecati na razinu CS846. Što možemo usporediti s prijašnjim studijama koje su pokazale da su u bolesnika s ranim, brzo napredujućim RA sa značajnim gubitkom zglobne hrskavice, primijećene snižene razine CS846 što može ukazivati na inhibiciju sinteze agrekana (27).

Što se tiče povezanosti CS846 s kliničkim skorom, u ispitanika s blagom hemofilijom uočena je značajna negativna korelacija za desno koljeno ($\rho = -0,458$, $p = 0,028$) i s ukupnim kliničkim skorom ($\rho = -0,514$, $p = 0,012$). U ispitanika s teškom hemofilijom nije uočena povezanost CS846 s kliničkim skorom. Za cijelu skupinu bolesnika s hemofilijom postoji značajna negativna korelacija s ukupnim kliničkim skorom ($\rho = -0,425$, $p = 0,005$).

Dosadašnja istraživanja analizirala su povezanost CS846 i uCTX-II s RTG, MR i kliničkim skorom, pri čemu su rezultati pokazali promjenjivu povezanost s HA. Studija Jansena (38) pokazala je povezanost CS846 i uCTX-II s RTG skorom ($r = 0,312$, $p = 0,032$; $r = 0,387$, $p = 0,010$) u bolesnika s teškom i umjerenom hemofilijom.

U studiji Oldenburga (39) pokazana je povezanost CS846 s MR skorom koljena i gležnjeva u bolesnika s teškom hemofilijom liječenih po potrebi ($r = 0,436$, $p = 0,04$), dok u bolesnika liječenih profilaktički nije bila uočena povezanost. U našoj studiji, također nismo primijetili povezanost između CS846 i HEAD-US skora u bolesnika s teškom hemofilijom. Važno je istaknuti da su svi naši bolesnici s teškom hemofilijom bili na profilaktičkom liječenju.

Studija Kloostermana (40) je pokazala negativnu korelaciju između uCTX-II i IPST MR skora ($R_s = -0,31$, $p = 0,03$) u ispitanika s umjerenom i blagom hemofilijom. U našem istraživanju, primijetili smo pozitivnu korelaciju između uCTX-II i HEAD-US skora u svih BSH ($\rho = 0,308$, $p = 0,040$). Osim toga, za razliku od nalaza Kloostermanove studije koja nije pronašla korelaciju između CS846 i MR skora, naša studija je pokazala značajnu negativnu korelaciju CS846 s HEAD-US skorom u ispitanika s blagom hemofilijom ($\rho = -0,609$, $p = 0,002$).

Rezultati studije Putza (41) nisu pokazali statistički značajne razlike u razinama CS846 i uCTX-II između bolesnika s teškom i umjerenom hemofilijom i zdravih kontrola. Iako nisu statistički značajne, razine uCTX-II bile su značajno više u bolesnika s hemofilijom (468 vs. 272 ng/mmol, $p = 0,253$). U skladu s rezultatima Putza, naše istraživanje je pokazalo statistički značajno više razine uCTX-II u BSH. Slično rezultatima Putza, naše istraživanje nije pokazalo značajne razlike u razinama CS846 između BSH i zdravih kontrola. Studija Putza

nije otkrila korelaciju između biljega i kliničkog skora. Naša analiza je pokazala značajne korelacije uCTX-II i CS846 s ukupnim kliničkim skorom za cijelu skupinu bolesnika s hemofilijom ($\rho=0,327$ i $\rho=-0,425$).

Studije su pokazale povezanost uCTX-II s kliničkim simptomima i radiološkim oštećenjem u OA. U normalnoj hrskavici odraslih CS846 je rijetko prisutan, no ustanovljeno je da su njegove razine povišene u OA. Porast CS846 smatra se odgovorom na oštećenje i aktiviranje procesa popravka matriksa hrskavice (159).

Možemo zaključiti da naša analiza vrijednosti uCTX-II pokazuje značajno povećanje s težinom hemofilije i HA. Naši rezultati pokazuju da su niže vrijednosti CS846 i više vrijednosti uCTX-II povezane s većim oštećenjima zglobova, što potvrđuju korelacije s ultrazvučnim skorom.

6.2. Povezanost biljega koštane pregradnje s CS846, uCTX-II i hemofiličnom artropatijom

U našem istraživanju, vrijednosti OC u ispitanika s blagom i teškom hemofilijom, kao i u kontrolnoj skupini su unutar referentnih vrijednosti bez statistički značajnih razlika. Vrijednosti CTX-I i koštane ALP u BSH su također unutar referentnih granica, bez statistički značajnih razlika između blage i teške hemofilije.

Vrijednosti OC, koštane ALP i CTX-I ukazuju na očuvanu koštanu pregradnju u ispitanika s hemofilijom, neovisno o težini bolesti. Ovi nalazi sugeriraju da, unatoč potencijalnom utjecaju hemofilije na zdravlje zglobova, koštani metabolizam kako je ocijenjen putem ovih biljega ostaje stabilan. Razlog za izostanak promjena u koštanim biljezima mogao bi biti mali broj godišnjih krvarenja prijavljenih kod ispitanika s teškom hemofilijom (medijan 1, IKR: 0-1), dok kod ispitanika s blagom hemofilijom nije bilo prijavljenih krvarenja unazad godinu dana (medijan 0, IKR: 0-0). Svi ispitanici s teškom hemofilijom su na profilaktičnoj terapiji, što značajno utječe na broj krvarenja.

Naši rezultati, koji pokazuju niže razine vitamina D u BSH, su u skladu s nalazima prijašnjih studija (63, 65, 67, 68) koje također bilježe smanjene razine ovog vitamina u BSH.

Naša studija doprinosi heterogenim rezultatima o OC u hemofiliji. Dok su prethodne studije s dječacima s hemofilijom izvijestile o nižim (63) ili višim (65, 66) vrijednostima OC u usporedbi s kontrolnom skupinom, naši nalazi su u skladu s rezultatima studije s odraslim BSH koja također nije našla značajne razlike u vrijednostima OC među bolesnicima s različitim stupnjevima težine bolesti i kontrolnom skupinom (71). Ovi nalazi ističu dob kao važan faktor u evaluaciji koštanog metabolizma.

Naši rezultati, koji nisu identificirali značajne korelacije između OC i kliničkog skora, podudaraju se s nalazima dvije studije (65, 66) dok je jedna studija (63) pokazala negativnu korelaciju.

Naše istraživanje nije otkrilo značajne korelacije između OC i HEAD-US skora, osim u izoliranom slučaju desnog koljena u blagoj hemofiliji, gdje je utvrđena značajna negativna korelacija ($\rho = -0,486$, $\rho = 0,014$)

Što se tiče koštane ALP, naši nalazi su u skladu s dosadašnjim istraživanjima koja nisu utvrdila značajnu razliku u razinama ALP između BSH i kontrolnih skupina (65-67) kao i između bolesnika s različitim stupnjevima težine hemofilije (71). Zanimljivo je napomenuti da su dvije studije (65, 66) obuhvatile dječake s hemofilijom, dok su druge dvije (67, 71) istraživale odrasle BSH. Ova konzistentnost nalaza među različitim dobnim skupinama podržava zaključak da koštana ALP ne varira značajno s težinom hemofilije niti u usporedbi s općom populacijom.

U ovom istraživanju nismo otkrili značajnu povezanost između koštane ALP i kliničkog skora (osim s desnim gležnjem u teškoj hemofiliji, $\rho = -0,421$, $p = 0,032$), što se podudara s nalazima prethodne studije (66). Također, naši rezultati nisu pokazali značajne korelacije između koštane ALP i HEAD-US skora, osim za lijevo koljeno u obje skupine ($\rho = -0,472$, $p = 0,015$ za blagu i $\rho = -0,476$, $p = 0,025$ za tešku hemofiliju).

Naši rezultati CTX-I su u skladu s istraživanjima provedenim s odraslim BSH (39, 69, 71) gdje su zabilježene vrijednosti CTX-I unutar normalnih raspona. Studija (65) s dječacima s hemofilijom nije utvrdila razlike u razinama CTX-I između ispitanika i kontrolne skupine. Nasuprot tome, studija Hua (70) je pokazala veće vrijednosti CTX-I za 30 % ($p < 0,001$) u odraslih BSH u usporedbi s kontrolnom skupinom.

U našoj analizi nije uočena povezanost CTX-I s kliničkim i HEAD-US skorom u obje skupine BSH. Ovi nalazi se slažu s rezultatima nekih prijašnjih studija. Na primjer, Jansen i sur. (38) nisu pronašli povezanost između serumskog/urinarnog CTX-I i radiološkog Pettersonovog skora u odraslih BSH. Slično tome, Oldenburg (39) i Plut (69) su izvijestili da CTX-I u odraslih BSH nije pokazao korelacije s MR skorom. Međutim, Anagnostis i sur. (64) su u svom istraživanju s odraslim BSH pokazali povezanost CTX-I s brojem zahvaćenih zglobova i radiološkim skorom.

Zaključno, možemo reći da naša analiza nije otkrila značajne korelacije između osteokalcina, koštane ALP i CTX-I s kliničkim i UZV skorom u bolesnika s hemofilijom. Primijetili smo izolirane slučajevne korelacije, poput one između osteokalcina i UZV skora desnog koljena u blagoj hemofiliji, te između koštane ALP i kliničkog skora desnog gležnja u teškoj hemofiliji, kao i između koštane ALP i UZV skora za lijevo koljeno u obje skupine hemofilije.

Naša analiza nije pokazala povezanost između CS846 i koštanih biljega u blagoj i teškoj hemofiliji. Na temelju toga možemo zaključiti da nema izravne povezanosti između koštane pregradnje i sinteze proteoglikana hrskavice.

Međutim, identificirali smo korelacije s uCTX-II koje su se razlikovale ovisno o težini hemofilije. U blagoj hemofiliji, primijetili smo negativnu korelaciju između koštane ALP i uCTX-II ($\rho = -0,422$, $p = 0,032$), dok smo u teškoj hemofiliji uočili pozitivnu korelaciju između CTX-I i uCTX-II ($\rho = 0,388$, $p = 0,049$). Nije uočena povezanost između OC i uCTX-II, bez obzira na težinu hemofilije.

U bolesnika s blagom hemofilijom, negativna korelacija između koštane ALP i uCTX-II sugerira moguću obrnutu interakciju između koštane sinteze i

degradacije hrskavice. Povećana sinteza kosti može biti povezana sa smanjenom razgradnjom kolagena tipa II.

Pozitivna korelacija između CTX-I i uCTX-II u teškoj hemofiliji sugerira interakciju između procesa razgradnje kosti i hrskavice. Ovaj nalaz implicira povezanost između razgradnje kolagena tipa I i II, na način da veća razgradnja kolagena tipa I može biti povezana s intenzivnijom razgradnjom kolagena tipa II, i obrnuto.

6.3. Vrijednost biljega ADAMTS-4 u ocjeni težine hemofilijne artropatije

Naši rezultati ne pokazuju statistički značajne razlike u vrijednostima ADAMTS-4 između ispitivanih skupina (medijani: zdravi = 82,20, blaga hemofilija = 61,49 teška hemofilija = 75,61 pg/mL, $p=0,958$).

Naši rezultati pokazuju da postoji značajna pozitivna korelacija između razine ADAMTS-4 i CS846 u teškoj hemofiliji ($\rho=0,502$, $p=0,015$). Ovo bi moglo sugerirati da je porast aktivnosti ADAMTS-4 povezan s povećanom sintezom proteoglikana kao pokušajem organizma da nadoknadi gubitak proteoglikana uzrokovan razgradnjom. Nisu pronađene značajne korelacije ADAMTS-4 s ostalim biljezima.

ADAMTS-4 i ADAMTS-5 agrekanaze se smatraju primarnim u razgradnji proteoglikana. Važno je napomenuti da, prema dostupnoj literaturi do sada, ADAMTS-4 nije bio istraživani u hemofilijnoj artropatiji. U studiji Hua (70) s 35 odraslih bolesnika s teškom hemofilijom razine ADAMTS-5 bile su 10 % niže u odnosu na zdrave ispitanike ($p<0,05$). Nisu pronašli korelaciju između ADAMTS-5 i kliničkog Gilbertovog i radiološkog Pettersonovog skora ($r=0,25$ $p=0,16$; $r=0,12$ $p=0,48$). Slično tome, naša studija nije otkrila korelaciju između razine ADAMTS-4 i UZV skorova ni u blagoj ni u teškoj hemofiliji. Nismo uočili značajne korelacije ADAMTS-4 s kliničkim skorom osim u blagoj hemofiliji za lijevo koljeno ($\rho=0,420$, $p=0,046$) i desni gležanj ($\rho=0,434$, $p=0,039$). Nedostatak značajnih

korelacija sugerira da ADAMTS-4 nema vrijednost kao biljeg težine hemofilčne artropatije.

6.4. Proteomska analiza

U ovom istraživanju usporedili smo združene proteome plazme ispitanika s teškom i blagom hemofilijom i zdravim kontrolama kako bismo identificirali proteine različite ekspresije povezane s težinom bolesti, procijenili njihove patofiziološke uloge i potencijalnu korist kao biljege za HA. Promjene u ekspresiji bile su značajno povezane s upalom i imunomodulacijom, što implicira njihove uloge u patofiziologiji HA.

Naša studija je prva koja istražuje proteomski profil krvi hemofilčara, stoga nemamo prethodne studije s kojima bismo mogli usporediti rezultate. Zbog toga smo usporedili naše rezultate s istraživanjima koja su mjerila koncentracije proteina u krvi. Takva usporedba može otežati interpretaciju, jer uspoređujemo relativne vrijednosti dobivene proteomskim profiliranjem s apsolutnim koncentracijama proteina, no smatramo ih korisnima za pružanje referentnog okvira. Referirali smo se na studije o RA i OA za proteine za koje nismo našli odgovarajuće studije specifične za HA.

Među 16 proteina čija je ekspresija pojačana u teškoj hemofiliji u usporedbi s zdravim ispitanicima uočena je zanimljiva podjela, s obzirom na to da je došlo do porasta proteina koji su povezani kako s pogoršanjem, tako i s ublažavanjem bolesti. Nekoliko proteina ukazuje na aktivaciju upalnih procesa i degradaciju hrskavice, posebice katepsin G (engl. cathepsin G, CTSG). Pronašli smo pojačano izražen CTSG u bolesnika s blagom i teškom hemofilijom u usporedbi s zdravim ispitanicima.

CTSG je serinska proteaza, nalazi se u polimorfonuklearnim leukocitima i ima ulogu u razgradnji različitih komponenata ECM-a. CTSG razgrađuje elastin i telopeptidna područja fibrilarnih kolagena tipa I, II i III. Dodatno, može razgraditi i druge tipove kolagena, poput IV, VI, VIII, IX, X i XI. CTSG djeluje i na razgradnju drugih molekula ECM-a, poput agrekana (160). CTSG je uključen u patogenezu

bolesti povezanih s kroničnim upalnim procesima i ima važnu ulogu u degradaciji zglobne hrskavice u RA. Kontrolira funkcionalno stanje imunoloških stanica, regulira upalne odgovore stimulirajući proizvodnju citokina i kemokina doprinoseći migraciji neutrofila. Osim što razgrađuje proteine ECM-a, utječe i na aktivaciju MMP-a, ključnih enzima u proteolitičkoj destrukciji hrskavice (161, 162). Miyata i sur. istraživali su ulogu CTSG-a u upalnom procesu RA kao monocitnog kemotaktičkog agensa. Rezultati pokazuju da je aktivnost CTSG-a značajno povećana u sinovijalnoj tekućini bolesnika s RA u usporedbi s onima s OA. Aktivnost CTSG-a bila je značajno povezana s brojem neutrofila u sinovijalnoj tekućini i koncentracijom IL-6, što ukazuje na to da bi njegova monocitna kemotaktička aktivnost mogla imati važnu ulogu u patogenezi sinovijalne upale u RA (103). Huang i sur. su otkrili prisutnost CTSG-a u sinovijalnoj tekućini kod bolesnika s OA koljena i sugeriraju da bi mogao sudjelovati u razgradnji lubrikina, proteina hrskavice važnog za održavanje normalne funkcije zgloba (108).

Pronašli smo također pojačanu ekspresiju endoplazmatske retikulum aminopeptidaze 2 (engl. endoplasmic reticulum aminopeptidase 2, ERAP2) u bolesnika s teškom i blagom hemofilijom, u usporedbi s zdravim ispitanicima. Polimorfizmi nukleotida gena ERAP2 povezani su sa osjetljivošću za razvoj ankilozantnog spondilitisa (AS) u HLA B27 pozitivnih bolesnika, no vjerojatno ne utječu na razine citokina IL-17A, IL-23 i IL-10 (102). U našem istraživanju povećana ekspresija ERAP2 ukazuje na povezanost s imunološkom reakcijom i potencijalnu ulogu u patofiziologiji HA. Iako se mehanizmi razlikuju, naši rezultati sugeriraju da bi ERAP2 mogao imati važnu ulogu u različitim upalnim stanjima. Studija koja je ispitala povezanost HLA B27 antigena i kroničnog sinovitisa u teškoj hemofiliji u Indiji uključila je 473 bolesnika, od kojih je 33 imalo kronični sinovitis, te 1175 zdravih kontrola. Rezultati su pokazali da je 64 % (21 od 33) bolesnika s kroničnim sinovitisom bilo HLA B27 pozitivno, u usporedbi s 5 % (23 od 440) bolesnika bez sinovitisa i 9 % (100 od 1175) zdravih kontrola. Autori predlažu da bi screening ove populacije na HLA B27 mogao identificirati one koji su skloni razvoju kroničnog sinovitisa. (152). Potrebna su daljnja istraživanja uloge ERAP2 u HA.

U teškoj hemofiliji pojačano je izražen proupalni protein S100-A9, koji ima ulogu u regrutiranju leukocita i poticanju proizvodnje citokina. Lee i sur. su ga identificirali kao jedan od proteina koji imaju potencijal razlikovanja bolesnika s RA od zdravih kontrola (153).

U našoj proteomskoj analizi C-reaktivni protein (CRP) bio je sniženo izražen u teškoj hemofiliji u odnosu na zdrave ispitanike i na blagu hemofiliju. Međutim, kada smo mjerili koncentraciju, utvrdili smo da je CRP viši u teškoj hemofiliji u odnosu na blagu hemofiliju (medijan: 1,95 vs. 1,40 mg/L), ali ta razlika nije bila statistički značajna ($p=0,419$). Slični rezultati su zabilježeni za IGF-1 i CTSG koji su pojačano izraženi u proteomskoj analizi, ali izmjerene koncentracije u krvi nisu pokazale značajne razlike između skupina. Ova diskrepancija između proteomske ekspresije i serumske koncentracije proteina naglašava važnost kombiniranja različitih analitičkih pristupa kako bismo dobili potpuniju sliku o biološkim procesima koji su uključeni u patofiziologiju HA.

Za razliku od onih koji vjerojatno pogoršavaju ishod bolesti, identificirali smo nekoliko proteina s očigledno zaštitnom ulogom u upalnim bolestima zglobova, poput pojačano izraženog IGF-1 kod teške hemofilije u odnosu na blagu i zdrave ispitanike.

Inzulinu sličan faktor rasta (IGF-1) je hormon koji posreduje rast, razvoj i anaboličke odgovore te inhibira apoptozu. Potiče diferencijaciju u različitim tipovima stanica uključujući skeletne mioblaste, glatke mišiće krvnih žila i endotel, hondroците i osteoblaste. Sinteza IGF-1 je primarno kontrolirana od strane hormona rasta (107, 155). IGF-1 ima ulogu u hemostazi hrskavice kroz poticanje sinteze proteoglikana i opstanka hondrocita te neutralizaciju kataboličkih citokina u suradnji s drugim anaboličkim čimbenicima (15). Pokazano je da IGF-1 održavaju stabilan metabolizam proteoglikana u eksplantatima zglobne hrskavice goveda (163). IGF-1 sudjeluje u regulaciji imuniteta i upale (101). U studiji Lee i sur. o IGF-1 u bolesnika s RA navodi se da sustav IGF-1 sudjeluje u regulaciji imuniteta i upale, ali mehanizam kojim je ovaj sustav uključen u aktivnost RA ostaje slabo razumljiv. Rezultati studije sugeriraju da IGF-1 može spriječiti apoptozu T stanica i doprinijeti antiapoptotskom učinku preko IL-6 (154). Postoje

indicije o povezanosti između razina IGF-1 i OA, međutim, dosadašnje informacije su nedosljedne (164, 165).

U teškoj i blagoj hemofiliji, također smo primijetili pojačanu ekspresiju apolipoproteina (a) (Apo(a)), proteina koji suprimira proizvodnju proupalnih citokina TNF- α i IL-1 β u sinovijalnom tkivu. Odsutan je u bolesnika s RA u remisiji, sugerirajući njegovu specifičnu ulogu tijekom aktivne faze bolesti i stoga je važan u razvoju RA (106). Pokazano je da TNF α i IL-1 β doprinose degradaciji hrskavice i sinovijalnoj upali u HA (9).

Sveukupno, pojačano izražavanje medijatora koji bi potencijalno mogli poboljšati HA može odražavati sistemski "obrambeni mehanizam" kako bi se suprotstavili napredovanju bolesti.

Također smo identificirali brojne smanjeno izražene medijatore imunološkog/upalnog odgovora poput osteopontina (OPN), koji potiče sinovitis te degradaciju kosti/hrskavice, čime doprinosi RA i OA (110). Povećana razina OPN-a u sinovijalnoj tekućini je povezana s progresijom OA, sugerirajući njegovu ulogu kao biljega težine OA (123, 156).

Studija Hakobyan i sur. istraživala je povezanost između razina plazmatskog OPN i kroničnog sinovitisa te HA, ocijenjene pomoću MR-a. U studiji su sudjelovali ispitanici s teškom hemofilijom uključujući pedijatrijske i odrasle bolesnike. U pedijatrijskih bolesnika (≤ 16 godina) sa sinovitisom, zabilježeno je značajno povećanje razine OPN-a u usporedbi s onima bez sinovitisa. Uočena je pozitivna korelacija između razine OPN i MR rezultata, ukazujući na potencijal OPN-a kao biljega za rano otkrivanje bolesti zglobova uzrokovane krvlju (157).

Detektirali smo i pregnancy zone protein (PZP) koji inhibira sintezu ili aktivnost proteaza. Povećana razina PZP-a potvrđena je u proteomima egzosoma iz sinovijalne tekućine u bolesnika s RA u usporedbi s OA (113). PZP je povišeno izražen u proteomskom profilu seruma u bolesnika s RA u usporedbi s kontrolnim ispitanicima, pri čemu su verificirane i povišene vrijednosti u serumu (114). Zanimljivo je da su naši nalazi sniženo izraženih OPN-a i PZP-a u teškoj i blagoj hemofiliji u suprotnosti s navedenim studijama u drugim artritisa pa čak

i u HA (157). Ove razlike impliciraju razlike u patofiziološkim mehanizmima koji razlikuju HA od drugih artritisa. Razlika u ekspresiji OPN-a može se pripisati i činjenici da je naše istraživanje uključilo odrasle bolesnike, ističući utjecaj dobi ispitanika i kliničkog stanja u proučavanju uloge OPN-a u HA.

Nekoliko studija s bolesnicima s hemofilijom istraživalo je ekspresiju COMP, biljega pregradnje hrskavice, koji stabilizira vlakna kolagena tipa II, međutim, rezultati su bili nekonzistentni (33, 34, 158). COMP je povezan sa suženjem zglobnog prostora u odraslih bolesnika s HA, ali ne i s ukupnim radiološkim skorom, dok kombinacija biljega uCTX-II, COMP i CS846 pokazuje najbolju korelaciju s radiološkim Pettersonovim skorom (38). Hua i sur. su primijetili povišene razine COMP (za 20 %) u bolesnika s teškom hemofilijom u usporedbi sa zdravima, međutim, nisu utvrdili korelaciju s kliničkim i radiološkim skorom (70). Slično našim rezultatima, Sun i sur. pronašli su niže razine COMP-a u odraslih bolesnika s teškom hemofilijom (158). Nekoliko studija nije uspjelo pronaći promjene u razinama COMP-a u odraslih bolesnika s teškom i umjerenom hemofilijom (39, 41, 69).

Prilikom usporedbe teške i blage hemofilije, također smo otkrili nekoliko različito izraženih proteina uključenih u upalne procese. Bone marrow proteoglycan (BMPG) je pojačano izražen u teškoj hemofiliji u odnosu na blagu i zdrave ispitanike, što sugerira pojačanu imunološku reakciju u teškoj HA (104).

Naše istraživanje otkrilo je da je LTBP-1, koji sudjeluje u regulaciji aktivnosti TGF- β 1, sniženo izražen i kod teške i blage hemofilije u usporedbi s zdravim ispitanicima (166). Međutim, u teškoj u odnosu na blagu hemofiliju, LTBP-1 je pojačano izražen. S obzirom na ulogu TGF- β 1 u imunološkom procesu, diferencijalna ekspresija LTBP-1 sugerira potencijalnu modulaciju imunološke reakcije kako bolest napreduje. Otkrili smo da je CD44, površinski receptor povezan s patološkom angiogenezom, pojačano izražen u teškoj hemofiliji u odnosu na blagu, ističući njegov potencijalni značaj u diferencijaciji između razina težine HA (133).

Naši rezultati pokazuju da je član obitelji kadherina 2 (engl. cadherin-related family member 2, CDHR2) smanjeno izražen u teškoj u odnosu na blagu

hemofiliju, a povišeno izražen u blagoj hemofiliji u usporedbi s zdravim ispitanicima. S obzirom na njegovu ulogu, to sugerira narušenu endotelnu barijeru u teškoj artropatiji, što dovodi do povećane vaskularne propusnosti i time doprinosi krvarenju (141).

Multimerin 1 (MMRN1) koji ima ulogu u formiranju tromba, smanjeno je izražen i kod teške i blage hemofilije, što potencijalno utječe na koagulaciju (120). Zanimljivo je da je MMRN1 više izražen u teškoj hemofiliji u odnosu na blagu, sugerirajući mogući kompenzacijski odgovor na veće izazove u koagulaciji.

Zaključno, u ovom istraživanju po prvi put smo profilirali plazmatski proteom bolesnika s teškom i blagom hemofilijom i kontrolne skupine te su uočene razlike u ekspresiji pojedinih proteina između skupina. Naši nalazi ističu složenu molekularnu dinamiku HA. Istaknuli smo deset proteina koji su potencijalno klinički i patofiziološki značajni za razvoj hemofilične artropatije: katepsin G, inzulinu sličan faktora rasta 1, endoplasmatsku retikulumsku aminopeptidazu 2, S100-A9, apolipoprotein (a), osteopontin, pregnancy zone protein, oligomerni protein hrskavičnog matriksa, CD44 i član obitelji kadherina 2.

6.5. Vrijednost biljega IGF-1 i CTSG u ocjeni težine hemofilične artropatije

Proteomskom analizom identificirana je povećana ekspresija IGF-1 i CTSG u ispitanika s teškom hemofilijom u usporedbi s zdravima, sugerirajući njihov potencijalni značaj za HA. Kriegsman (92) je proteomskom analizom sinovijalnog tkiva u HA identificirao katepsin B i D. U cilju detaljnijeg istraživanja ove povezanosti, izmjerili smo njihove koncentracije u ispitanika s teškom i blagom hemofilijom i zdravih kontrola. Prema početnim očekivanjima da će povećana ekspresija proteina biti povezana s povišenim koncentracijama u krvi, dobiveni rezultati nisu pokazali značajne razlike između ispitivanih skupina. IGF-1 vrijednosti između zdravih (15,80 nmol/L), blage hemofilije (16,65 nmol/L) i teške hemofilije (16,10 nmol/L) nisu pokazale značajne razlike ($p=0,813$), te su vrijednosti unutar referentnog raspona. Isto tako, vrijednosti CTSG nisu pokazale

značajne razlike između zdravih (0,124 ng/ml), blage hemofilije (0,119 ng/ml) i teške hemofilije (0,114 ng/ml), ($p=0,816$). Za CTSG ne postoji referentni raspon.

Kako bismo dodatno istražili potencijalnu ulogu IGF-1 i CTSG u HA, izračunati su koeficijenti korelacija njihovih koncentracija s HEAD-US i kliničkim skorom. Ovi rezultati pružaju dodatne uvide u njihovu potencijalnu kliničku relevantnost u kontekstu oštećenja zglobova kod hemofilije. Prema dostupnoj literaturi, dosad nije provedeno istraživanje o ulozi IGF-1 i CTSG u hemofilčnoj artropatiji.

Naši rezultati pokazuju značajne negativne korelacije između IGF-1 i ultrazvučnog te kliničkog skora zglobova. U ispitanika s blagom hemofilijom, IGF-1 pokazuje značajnu negativnu korelaciju samo s HEAD-US skorom lijevog lakta ($\rho = -0,432$, $p=0,028$). U teškoj hemofiliji utvrdili smo značajne negativne korelacije za oba koljena (desni: $\rho = -0,569$, $p=0,006$; lijevi: $\rho = -0,572$, $p=0,004$) i gležnja (desni: $\rho = -0,612$, $p=0,001$; lijevi: $\rho = -0,552$, $p=0,003$) kao i za ukupni HEAD-US skor ($\rho = -0,646$, $p=0,002$).

U blagoj hemofiliji nije bilo značajne korelacije IGF-1 s kliničkim skorom. S druge strane, u teškoj hemofiliji, pokazana je značajna negativna povezanost s kliničkim skorom desnog lakta ($\rho = -0,389$, $p=0,045$), oba koljena (desni: $\rho = -0,646$, $p=0,001$; lijevi: $\rho = -0,496$, $p=0,016$) i oba gležnja (desni: $\rho = -0,646$, $p=0,000$; lijevi: $\rho = -0,611$, $p=0,001$) te sa ukupnim skorom ($\rho = -0,621$, $p=0,003$).

Ovi nalazi sugeriraju da IGF-1, koji ima anabolički učinak na hrskavicu te potiče sintezu proteoglikana, inhibiciju apoptoze i neutralizaciju kataboličkih citokina (15, 163) može imati važnu ulogu u patofiziologiji HA. Ovi rezultati pokazuju da su niže razine IGF-1 povezane s većim oštećenjem zglobova.

Nedostatak značajnih korelacija između CTSG i HEAD-US skora, osim za lijevi lakat ($\rho = 0,463$, $p=0,015$) u teškoj hemofiliji, ukazuje na nedostatak povezanosti CTSG s detektiranim oštećenjem zglobova. Nedostatak značajnih korelacija između CTSG i kliničkog skora dodatno potvrđuje ovu pretpostavku. Imajući u vidu ulogu proteaze CTSG u degradaciji proteoglikana i kolagena (160) kao i njezinu ulogu u upalnim procesima (161, 162) potrebna su daljnja istraživanja u području hemofilčne artropatije.

Ograničenja istraživanja

Glavno ograničenje ovog istraživanja je što se radi o presječnom istraživanju ispitivanih skupina, umjesto longitudinalnom, što bi omogućilo bolju procjenu uloge biljega u ocjeni težine HA. Istraživanje obuhvaća mali broj ispitanika i provedeno je samo u jednom centru. U proteomskoj analizi, udruživanje uzoraka omogućuje stvaranje biološkog prosječnog uzorka, što olakšava detekciju ključnih proteina u različitim skupinama ispitanika. Međutim, istovremeno može otežati identifikaciju specifičnih proteina koji bi mogli biti prisutni samo u pojedinim uzorcima. Promjene u izražaju proteina koje pokreću patofiziološke mehanizme u HA, uglavnom se događaju lokalno u zglobovima, što može rezultirati prikrivenim ili "razrijeđenim" signalima prilikom analize potpunog plazmatskog proteoma bolesnika s HA. Izravno uzorkovanje i analiza proteoma sinovijalne tekućine mogli bi pružiti bolji uvid u te promjene, iako je analiza plazme manje invazivna za pacijente.

7. ZAKLJUČCI

1. Istraživanje je pokazalo značajne razlike u razinama biljega degradacije hrskavice uCTX-II između zdravih ispitanika, ispitanika s blagom i teškom hemofilijom. Razine rastu s težinom bolesti, najviše vrijednosti imaju bolesnici s teškom hemofilijom, koje su značajno više u odnosu na bolesnike s blagom hemofilijom i zdrave.
2. Nismo utvrdili korelaciju između uCTX-II i ultrazvučnog skora zglobova u pojedinačnih skupina s blagom i teškom hemofilijom. Međutim, primijetili smo pozitivnu korelaciju između uCTX-II i ultrazvučnog skora zglobova kada se promatra cijela skupina bolesnika s hemofilijom.
3. Biljeg uCTX-II pokazuje potencijal kao klinički koristan pokazatelj, pružajući dodatnu informaciju o oštećenju zglobova kod hemofilije. Praćenje razine uCTX-II moglo bi omogućiti praćenje progresije hemofilčne artropatije i pružiti vrijedne kliničke uvide.
4. Analiza nije pokazala značajne razlike u vrijednostima biljega sinteze proteoglikana CS846 između bolesnika s blagom i teškom hemofilijom te zdravih ispitanika.
5. CS846 pokazuje negativnu korelaciju s ultrazvučnim skorom zglobova u blagoj hemofiliji i s ukupnim skorom u cijeloj skupini bolesnika. Međutim, nije uočena korelacija u bolesnika s teškom hemofilijom, što sugerira da CS846 nije koristan kao biljeg težine bolesti u ovoj podskupini bolesnika. Rezultati korelacija upućuju na smanjenu sintezu proteoglikana u blagoj hemofiliji, te na nedostatak sinteze u teškoj hemofiliji.
6. uCTX-II pokazuje pozitivnu korelaciju s kliničkim skorom u cijeloj skupini bolesnika. CS846 pokazuje negativnu korelaciju s kliničkim skorom u blagoj hemofiliji i s ukupnim skorom u cijeloj skupini bolesnika.
7. Nema značajnih razlika u vrijednostima biljega koštane pregradnje osteokalcina, koštane ALP i CTX-I između ispitivanih skupina.
8. Naša analiza uglavnom nije otkrila značajne korelacije između osteokalcina, koštane ALP i CTX-I s kliničkim i ultrazvučnim skorom u bolesnika s hemofilijom.

9. Naša analiza nije otkrila korelacije između CS846 i koštanih biljega osteokalcina, koštane ALP i CTX-I u blagoj i teškoj hemofiliji. Na temelju ovih nalaza, zaključujemo da ne postoji povezanost između koštane pregradnje i sinteze proteoglikana hrskavice.
10. U bolesnika s blagom hemofilijom, negativna korelacija između biljega sinteze kosti koštane ALP i uCTX-II upućuje na interakciju između procesa koštane sinteze i degradacije hrskavice. Na temelju ovih nalaza, možemo zaključiti da povećana sinteza kosti može biti povezana sa smanjenom razgradnjom kolagena tipa II.
11. Pozitivna korelacija između biljega resorpcije kosti CTX-I i uCTX-II u teškoj hemofiliji upućuje na interakciju između procesa degradacije kosti i hrskavice. Povećane vrijednosti CTX-I povezane su s većim vrijednostima uCTX-II, što upućuje na intenzivniju razgradnju kolagena tipa II u prisutnosti veće razgradnje kolagena tipa I.
12. Naše istraživanje nije otkrilo statistički značajne razlike u vrijednostima ADAMTS-4 između ispitanika s teškom, blagom hemofilijom i zdravih ispitanika. Također, nismo uočili korelaciju između ADAMTS-4 i ultrazvučnih skorova, a većina korelacija s kliničkim skorom nije bila značajna, sugerirajući da nema vrijednost kao biljeg težine hemofilične artropatije.
13. Primijetili smo značajnu pozitivnu korelaciju ADAMTS-4 s CS846, što sugerira da porast razgradnje agrekana može potaknuti povećanu sintezu proteoglikana.
14. Proteomska analiza plazme bolesnika s blagom i teškom hemofilijom te zdravih ispitanika otkrila je razlike u ekspresiji pojedinih proteina među ispitivanim skupinama. Identificirali smo pojačano i smanjeno izražene proteine koji su većinom povezani s upalnim i imunološkim procesima te s degeneracijom zgloba.
15. Istaknuli smo deset proteina koji su potencijalno klinički i patofiziološki značajni za hemofiličnu artropatiju: katepsin G, inzulinu sličan faktor rasta 1, endoplasmatsku retikulum aminopeptidazu 2, S100-A9, apolipoprotein (a), osteopontin, pregnancy zone protein, oligomerni protein hrskavičnog matriksa, CD44 i član obitelji kadherina 2.

16. Analiza koncentracija katepsina G i IGF-1 nije otkrila razlike u vrijednostima između bolesnika s blagom i teškom hemofilijom te zdravih ispitanika.
17. Rezultati pokazuju negativnu korelaciju IGF-1 s ultrazvučnim skorom zglobova u blagoj i teškoj hemofiliji, te negativnu korelaciju s kliničkim skorom zglobova u teškoj hemofiliji. Na temelju toga možemo zaključiti da su niže razine IGF-1 povezane s većim oštećenjem zglobova, što sugerira da IGF-1 ima ulogu u patofiziologiji hemofilične artropatije. S obzirom na uočene korelacije s ultrazvučnim i kliničkim skorom, IGF-1 ima potencijal kao biljeg u ocjeni težine hemofilične artropatije.
18. Nije uočena korelacija CTSG s kliničkim skorom zglobova u blagoj i teškoj hemofiliji. Također, analiza nije pokazala korelaciju između CTSG i ultrazvučnog skora zglobova, osim pozitivnu za lijevi lakat u teškoj hemofiliji. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se bolje razumjela uloga CTSG-a u patofiziologiji hemofilične artropatije.

8. SAŽETAK

Provedeno je istraživanje vrijednosti biljega uCTX-II i CS846 u ocjeni težine hemofilične artropatije (HA) te njihove povezanosti s koštanim biljezima osteokalcinom, koštanom ALP i CTX-I. Analizirana je uloga ADAMTS-4 u HA te je učinjen proteomski profil plazme. Uključeno je 53 bolesnika s hemofilijom, od kojih 27 s teškom i 26 s blagom te 52 zdrava ispitanika. HA ocijenjena je kliničkim i ultrazvučnim HEAD-US skorom. Korištene su metode ELISA dok je proteomska analiza plazme provedena tekućinskom kromatografijom masene spektrometrije. Rezultati pokazuju da uCTX-II ima najviše vrijednosti u teškoj hemofiliji i pozitivnu korelaciju s kliničkim i UZV skorom u cijeloj skupini bolesnika. CS846 nije pokazao razlike u vrijednostima među skupinama, pokazuje negativnu korelaciju s kliničkim i UZV skorom u blagoj hemofiliji i s ukupnim skorom u cijeloj skupini bolesnika. Koštani biljezi nisu pokazali značajne razlike ili korelacije s kliničkim i UZV skorom, niti s biljezima hrskavice, osim što je uCTX-II pokazao korelacije s koštanom ALP i CTX-I. Analiza ADAMTS-4 nije otkrila značajne razlike između skupina, a korelacije s UZV i kliničkim skorovima uglavnom nisu bile značajne. Proteomska analiza identificirala je proteine potencijalno povezane s patofiziologijom HA. Među njima, analiza koncentracija IGF-1 i CTSG nije otkrila značajne razlike. IGF-1 negativno korelira s UZV skorom u blagoj i teškoj hemofiliji, kao i s kliničkim skorom u teškoj hemofiliji. CTSG ne korelira s kliničkim skorom i uglavnom nije pokazao korelaciju s UZV skorom.

Zaključak: Rezultati ukazuju na potencijal uCTX-II kao biljega za procjenu težine i praćenje hemofilične artropatije, dok IGF-1 pridonosi razumijevanju patofiziologije bolesti.

9. SUMMARY

The value of cartilage biomarkers serum chondroitin sulfate epitope 846 and urinary C-terminal telopeptide of type II collagen in assessing the severity of haemophilic arthropathy

Nataša Kalebota, 2024

Our aim was to examine the value of uCTX-II and CS846 in assessing the severity of HA, alongside evaluating ADAMTS-4, osteocalcin, bone ALP, and CTX-I. Plasma proteomic analysis was conducted. The study included 53 hemophilia patients (27 severe, 26 mild) and 52 healthy controls. HA severity was assessed using clinical and ultrasonographic HEAD-US scores. uCTX-II levels were highest in severe hemophilia and correlated positively with clinical and US scores across all patients. CS846 showed no significant differences among groups but negatively correlated with clinical and US scores in mild hemophilia and total scores across all patients. Bone markers did not significantly differ or correlate with clinical and US scores, except for uCTX-II, which correlated with bone ALP and CTX-I. ADAMTS-4 analysis revealed no significant group differences, and correlations with US and clinical scores were generally insignificant. Proteomic analysis identified potentially relevant proteins. IGF-1 negatively correlated with US scores in both mild and severe hemophilia, as well as with clinical scores in severe hemophilia, while CTSG showed no correlation with clinical scores and generally did not correlate with US scores. In conclusion, our findings suggest the potential of uCTX-II for assessing HA severity, while IGF-1 contributes to understanding disease pathophysiology.

10. POPIS LITERATURE

1. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW, i sur. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia*. 2020;26 Suppl 6:1-158. doi: 10.1111/hae.14046
2. Berntorp E, Fischer K, Hart DP, Mancuso ME, Stephensen D, Shapiro AD, i sur. *Haemophilia*. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):45. doi: 10.1038/s41572-021-00278-x
3. Nacca CR, Harris AP, Tuttle JR. Hemophilic Arthropathy. *Orthopedics*. 2017;40(6):e940-6. doi: 10.3928/01477447-20170619-05
4. Gualtierotti R, Solimeno LP, Peyvandi F. Hemophilic arthropathy: Current knowledge and future perspectives. *J Thromb Haemost*. 2021;19(9):2112-21. doi: 10.1111/jth.15444
5. van Vulpen LFD, Mastbergen SC, Lafeber FPJG, Schutgens REG. Differential effects of bleeds on the development of arthropathy - basic and applied issues. *Haemophilia*. 2017;23(4):521-7. doi: 10.1111/hae.13236
6. van Vulpen LFD, Holstein K, Martinoli C. Joint disease in haemophilia: Pathophysiology, pain and imaging. *Haemophilia*. 2018;24 Suppl 6:44-9. doi: 10.1111/hae.13449
7. Wyseure T, Mosnier LO, von Drygalski A. Advances and challenges in hemophilic arthropathy. *Semin Hematol*. 2016;53(1):10-9. doi: 10.1053/j.seminhematol.2015.10.005
8. Vodanović M. Pojavnost i rizični čimbenici za urolitijazu u bolesnika s hemofilijom [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2021.
9. Pulles AE, Mastbergen SC, Schutgens RE, Lafeber FP, van Vulpen LF. Pathophysiology of hemophilic arthropathy and potential targets for therapy. *Pharmacol Res*. 2017;115:192-9. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.032

10. Pulles AE, Lafeber F, van Vulpen LFD. Models of arthropathy: what can we learn from them to improve patient care? *Rheumatology (Oxford)*. 2019;58(4):565-6. doi: 10.1093/rheumatology/key278
11. Lyons LP, Weinberg JB, Wittstein JR, McNulty AL. Blood in the joint: effects of hemarthrosis on meniscus health and repair techniques. *Osteoarthritis Cartilage*. 2021;29(4):471-9. doi: 10.1016/j.joca.2020.11.008
12. Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(4):401-4. doi: 10.1016/s1357-2725(02)00301-1
13. Đudarić L. Zglobna hrskavica. *Medicina Fluminensis*. 2011;47(1):59-66.
14. Zoričić Cvek S, Đudarić L, Cvijanović O, Šantić V, Sućec M, Legović D, i sur. Primjena bioloških principa u pospješivanju cijeljenja i regeneracije zglobne hrskavice. *Medicina Fluminensis*. 2015;51(4):494-502.
15. Mobasher A, Goldring MB, Loeser RF. Cartilage and Chondrocytes. U: Firestein GS, ur. *Firestein & Kelley's Textbook of Rheumatology*. 11. izd. Philadelphia: Elsevier; 2021. Str. 34-59.
16. Salvatore L, Gallo N, Natali ML, Terzi A, Sannino A, Madaghiele M. Mimicking the Hierarchical Organization of Natural Collagen: Toward the Development of Ideal Scaffolding Material for Tissue Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:644595. doi: 10.3389/fbioe.2021.644595
17. Wang T, Lew J, Premkumar J, Poh CL, Win Naig M. Production of recombinant collagen: state of the art and challenges. *Eng Biol*. 2017;1:18-23. doi: 10.1049/enb.2017.0003
18. Meyer M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *Biomed Eng Online*. 2019;18(1):24. doi: 10.1186/s12938-019-0647-0
19. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55(12):1531-46. doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002
20. Garner P. The Role of Collagen Organization on the Properties of Bone. *Calcif Tissue Int*. 2015;97(3):229-40. doi: 10.1007/s00223-015-9996-2

21. Holmes DF, Lu Y, Starborg T, Kadler KE. Collagen Fibril Assembly and Function. *Curr Top Dev Biol.* 2018;130:107-42. doi: 10.1016/bs.ctdb.2018.02.004
22. Pawelec KM, Best SM, Cameron RE. Collagen: a network for regenerative medicine. *J Mater Chem B.* 2016;4(40):6484-96. doi: 10.1039/c6tb00807k
23. Krawetz RJ, Wu YE, Bertram KL, Shonak A, Masson AO, Ren G, i sur. Synovial mesenchymal progenitor derived aggrecan regulates cartilage homeostasis and endogenous repair capacity. *Cell Death Dis.* 2022;13(5):470. doi: 10.1038/s41419-022-04919-1
24. Roughley PJ, Mort JS. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *J Exp Orthop.* 2014;1(1):8. doi: 10.1186/s40634-014-0008-7
25. Sivan SS, Wachtel E, Roughley P. Structure, function, aging and turnover of aggrecan in the intervertebral disc. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(10):3181-9. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.07.013
26. Wei Q, Zhang X, Zhou C, Ren Q, Zhang Y. Roles of large aggregating proteoglycans in human intervertebral disc degeneration. *Connect Tissue Res.* 2019;60(3):209-18. doi: 10.1080/03008207.2018.1499731
27. Szeremeta A, Jura-Poltorak A, Zon-Giebel A, Kopec-Medrek M, Kucharz EJ, Olczyk K. Aggrecan Turnover in Women with Rheumatoid Arthritis Treated with TNF-alpha Inhibitors. *J Clin Med.* 2020;9(5):1377. doi: 10.3390/jcm9051377
28. Alberton P, Dugonitsch HC, Hartmann B, Li P, Farkas Z, Saller MM, i sur. Aggrecan Hypomorphism Compromises Articular Cartilage Biomechanical Properties and Is Associated with Increased Incidence of Spontaneous Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(5):1008. doi: 10.3390/ijms20051008
29. Nagy EE, Nagy-Finna C, Popoviciu H, Kovacs B. Soluble Biomarkers of Osteoporosis and Osteoarthritis, from Pathway Mapping to Clinical Trials: An Update. *Clin Interv Aging.* 2020;15:501-18. doi: 10.2147/CIA.S242288
30. Rodriguez-Merchan EC. Serological biomarkers in hemophilic arthropathy: Can they be used to monitor bleeding and ongoing progression of blood-

induced joint disease in patients with hemophilia? *Blood Rev.* 2020; 41:100642. doi: 10.1016/j.blre.2019.100642

31. Rizkalla G, Reiner A, Bogoch E, Poole AR. Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease. *J Clin Invest.* 1992;90(6):2268-77. doi: 10.1172/JCI116113
32. Månsson B, Carey D, Alini M, Ionescu M, Rosenberg LC, Poole AR. Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. *J Clin Invest.* 1995;95:1071-7. doi: 10.1172/JCI117753
33. Pasta G, Annunziata S, Polizzi A, Caliozna L, Jannelli E, Minen A, i sur. The Progression of Hemophilic Arthropathy: The Role of Biomarkers. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19):7292. doi: 10.3390/ijms21197292
34. van Bergen EDP, van Vulpen LFD, Schutgens REG, Mastbergen SC, Lafeber FPJG. Biochemical marker research in hemophilic arthropathy: A systematic review. *Blood Rev.* 2021;47:100781. doi: 10.1016/j.blre.2020.100781
35. Bay-Jensen AC, Mobasher A, Thudium CS, Kraus VB, Karsdal MA. Blood and urine biomarkers in osteoarthritis - an update on cartilage associated type II collagen and aggrecan markers. *Curr Opin Rheumatol.* 2022;34(1):54-60. doi: 10.1097/BOR.0000000000000845
36. Bauer DC, Hunter DJ, Abramson SB, Attur M, Corr M, Felson D, i sur. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(8):723-7. doi: 10.1016/j.joca.2006.04.001
37. van Bergen EDP, Mastbergen SC, Lafeber FPJG, Schutgens REG, van Vulpen LFD. Joint Health Markers in Hemophilia: The State of the Art. *J Cell Immunol.* 2021;3(6):355-63.
38. Jansen NW, Roosendaal G, Lundin B, Heijnen L, Mauser-Bunschoten E, Bijlsma JW, i sur. The combination of the biomarkers urinary C-terminal telopeptide of type II collagen, serum cartilage oligomeric matrix protein,

- and serum chondroitin sulfate 846 reflects cartilage damage in hemophilic arthropathy. *Arthritis Rheum.* 2009;60(1):290-8. doi: 10.1002/art.24184
39. Oldenburg J, Zimmermann R, Katsarou O, Zanon E, Kellermann E, Lundin B, i sur. Potential biomarkers of haemophilic arthropathy: correlations with compatible additive magnetic resonance imaging scores. *Haemophilia.* 2016;22(5):760-4. doi: 10.1111/hae.12936
 40. Kloosterman FR, Zwagemaker AF, Bay-Jensen AC, Cnossen MH, Kruij M, Leebeek FWG, i sur. Poor correlation between biomarkers and MRI-detected joint damage in a cross-sectional study of persons with nonsevere hemophilia A (DYNAMO study). *J Thromb Haemost.* 2023;21(7):1813-23. doi: 10.1016/j.jtha.2023.03.030
 41. Putz P, Durstberger S, Kaufmann C, Klinger M, Pleschl K, Rejto J, i sur. 3D gait analysis, haemophilia joint health score, leg muscle laterality and biomarkers of joint damage: A cross-sectional comparative assessment of haemophilic arthropathy. *Haemophilia.* 2020;26(6):e323-33. doi: 10.1111/hae.14154
 42. Pulles AE, Mastbergen SC, Foppen W, Schutgens REG, Lafeber FPJG, van Vulpen LFD. The combination of urinary CTX-II and serum CS-846: Promising biochemical markers to predict radiographic progression of haemophilic arthropathy-An exploratory study. *Haemophilia.* 2018;24(4): e278-80. doi: 10.1111/hae.13554
 43. van Vulpen LFD, van Meegeren ME, Roosendaal G, Jansen NW, van Laar JM, Schutgens REG, i sur. Biochemical markers of joint tissue damage increase shortly after a joint bleed; an explorative human and canine in vivo study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015;23(1):63-9. doi: 10.1016/j.joca.2014.09.008
 44. van Bergen EDP, van Leeuwen FHP, Foppen W, Timmer MA, Schutgens REG, Mastbergen SC, i sur. Subclinical synovial proliferation in patients with severe haemophilia A: The value of ultrasound screening and biochemical markers. *Haemophilia.* 2023;29(6):1580-8. doi: 10.1111/hae.14861

45. Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, Edwards DR. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol.* 2015;16(1):113. doi: 10.1186/s13059-015-0676-3
46. Leonardi R, Crimi S, Almeida LE, Pannone G, Musumeci G, Castorina S, i sur. ADAMTS-4 and ADAMTS-5 expression in human temporomandibular joint discs with internal derangement, correlates with degeneration. *J Oral Pathol Med.* 2015;44(10):870-5. doi: 10.1111/jop.12295
47. Verma P, Dalal K, Chopra M. Pharmacophore development and screening for discovery of potential inhibitors of ADAMTS-4 for osteoarthritis therapy. *J Mol Model.* 2016;22(8):178. doi: 10.1007/s00894-016-3035-8
48. Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis. *J Cell Biochem.* 2011;112(12):3507-14. doi: 10.1002/jcb.23298
49. Xue J, Wang J, Liu Q, Luo A. Tumor necrosis factor-alpha induces ADAMTS-4 expression in human osteoarthritis chondrocytes. *Mol Med Rep.* 2013;8(6): 1755-60. doi: 10.3892/mmr.2013.1729
50. Mimata Y, Kamataki A, Oikawa S, Murakami K, Uzuki M, Shimamura T, i sur. Interleukin-6 upregulates expression of ADAMTS-4 in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* 2012;15(1):36-44. doi: 10.1111/j.1756-185X.2011.01656.x
51. Li W, Du C, Wang H, Zhang C. Increased serum ADAMTS-4 in knee osteoarthritis: a potential indicator for the diagnosis of osteoarthritis in early stages. *Genet Mol Res.* 2014;13(4):9642-9. doi: 10.4238/2014.November. 14.9
52. Ozler K. The role of increased synovial fluid A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs4 and serglycin levels in osteoarthritis. *Ir J Med Sci.* 2019;188(3):867-72. doi: 10.1007/s11845-018-1945-4
53. Ozler K. The utility of synovial fluid levels of ADAMTS9 and ADAMTS4 in predicting treatment responses to intraarticular steroid injections in patients with knee osteoarthritis. *Turk J Med Sci.* 2020;50(5):1330-6. doi: 10.3906/sag-1809-108

54. Roberts S, Evans H, Wright K, van Niekerk L, Caterson B, Richardson JB, i sur. ADAMTS-4 activity in synovial fluid as a biomarker of inflammation and effusion. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(9):1622-6. doi: 10.1016/j.joca.2015.05.006
55. Zhang E, Yan X, Zhang M, Chang X, Bai Z, He Y, i sur. Aggrecanases in the human synovial fluid at different stages of osteoarthritis. *Clin Rheumatol*. 2013;32(6):797-803. doi: 10.1007/s10067-013-2171-0
56. Bozec A, Grüneboom A, Schett G. *Biology, Physiology, and Morphology of Bone*. U: Firestein GS, ur. *Firestein & Kelley's Textbook of Rheumatology*. 11. izd. Philadelphia: Elsevier; 2021. Str. 60-6.
57. Burch J, Rice S, Yang H, Neilson A, Stirk L, Francis R, i sur. Systematic review of the use of bone turnover markers for monitoring the response to osteoporosis treatment: the secondary prevention of fractures, and primary prevention of fractures in high-risk groups. *Health Technol Assess*. 2014;18(11):1-180. doi: 10.3310/hta18110
58. Singer FR, Eyre DR. Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. *Cleve Clin J Med*. 2008;75(10):739-50. doi: 10.3949/ccjm.75.10.739
59. Kušec V. Procjena koštane pregradnje pomoću biokemijskih pretraga klinička primjena i značenje. *Paediatr Croat*. 2005;49(3):193-8.
60. Cavalier E, Lukas P, Bottani M, Aarsand AK, Ceriotti F, Coskun A, i sur. European Biological Variation Study (EuBIVAS): within- and between-subject biological variation estimates of beta-isomerized C-terminal telopeptide of type I collagen (beta-CTX), N-terminal propeptide of type I collagen (PINP), osteocalcin, intact fibroblast growth factor 23 and uncarboxylated-unphosphorylated matrix-Gla protein-a cooperation between the EFLM Working Group on Biological Variation and the International Osteoporosis Foundation-International Federation of Clinical Chemistry Committee on Bone Metabolism. *Osteoporos Int*. 2020;31(8):1461-70. doi: 10.1007/s00198-020-05362-8

61. Leeming DJ, Alexandersen P, Karsdal MA, Qvist P, Schaller S, Tanko LB. An update on biomarkers of bone turnover and their utility in biomedical research and clinical practice. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006;62(10):781-92. doi: 10.1007/s00228-006-0174-3
62. Rauchenzauner M, Schmid A, Heinz-Erian P, Kapelari K, Falkensammer G, Griesmacher A, i sur. Sex- and age-specific reference curves for serum markers of bone turnover in healthy children from 2 months to 18 years. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(2):443-9. doi: 10.1210/jc.2006-1706
63. Alioglu B, Selver B, Ozsoy H, Koca G, Ozdemir M, Dallar Y. Evaluation of bone mineral density in Turkish children with severe haemophilia A: Ankara hospital experience. *Haemophilia.* 2012;18(1):69-74. doi: 10.1111/j.1365-2516.2011.02587.x
64. Anagnostis P, Vakalopoulou S, Vyzantiadis TA, Charizopoulou M, Karras S, Goulis DG, i sur. The clinical utility of bone turnover markers in the evaluation of bone disease in patients with haemophilia A and B. *Haemophilia.* 2014;20(2):268-75. doi: 10.1111/hae.12271
65. Giordano P, Brunetti G, Lassandro G, Notarangelo LD, Luciani M, Mura RM, i sur. High serum sclerostin levels in children with haemophilia A. *Br J Haematol.* 2016;172(2):293-5. doi: 10.1111/bjh.13481
66. Christoforidis A, Economou M, Papadopoulou E, Kazantzidou E, Farmaki E, Tzimouli V, i sur. Comparative study of dual energy X-ray absorptiometry and quantitative ultrasonography with the use of biochemical markers of bone turnover in boys with haemophilia. *Haemophilia.* 2011;17(1):e217-22. doi: 10.1111/j.1365-2516.2010.02385.x
67. Dagli M, Kutlucan A, Abusoglu S, Basturk A, Sozen M, Kutlucan L, i sur. Evaluation of bone mineral density (BMD) and indicators of bone turnover in patients with hemophilia. *Bosn J Basic Med Sci.* 2018;18(2):206-10. doi: 10.17305/bjbms.2018.2335
68. Anagnostis P, Vakalopoulou S, Christoulas D, Paschou SA, Papatheodorou A, Garipidou V, i sur. The role of sclerostin/dickkopf-1 and receptor activator

- of nuclear factor kB ligand/osteoprotegerin signalling pathways in the development of osteoporosis in patients with haemophilia A and B: A cross-sectional study. *Haemophilia*. 2018;24(2):316-22. doi: 10.1111/hae.13384
69. Plut D, Faganel Kotnik B, Preložnik Zupan I, Ključevsek D, Vidmar G, Snoj Z, i sur. Detection and evaluation of haemophilic arthropathy: Which tools may be considered more reliable. *Haemophilia*. 2021;27(1):156-63. doi: 10.1111/hae.14153
70. Hua B, Olsen EHN, Sun S, Gudme CN, Wang L, Vandahl B, i sur. Serological biomarkers detect active joint destruction and inflammation in patients with haemophilic arthropathy. *Haemophilia*. 2017;23(4):e294-300. doi: 10.1111/hae.13196
71. Boban A. Metabolizam kosti u bolesnika s hemofilijom [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2011.
72. Pasta G JE, Ivone A, Mosconi M, Ferranti Calderoni E, Minen A, i sur. The role of six biomarkers in diagnosis of hemophilic arthropathy: review of the literature. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2020;34:7-13.
73. Gooding R, Thachil J, Alamelu J, Motwani J, Chowdary P. Asymptomatic Joint Bleeding and Joint Health in Hemophilia: A Review of Variables, Methods, and Biomarkers. *J Blood Med*. 2021;12:209-20. doi: 10.2147/JBM.S304597
74. Bakeer N, Shapiro AD. Merging into the mainstream: the evolution of the role of point-of-care musculoskeletal ultrasound in hemophilia. *F1000Res*. 2019;8:1029. doi: 10.12688/f1000research.16039.1
75. Fischer K, Poonnoose P, Dunn AL, Babyn P, Manco-Johnson MJ, David JA, i sur. Choosing outcome assessment tools in haemophilia care and research: a multidisciplinary perspective. *Haemophilia*. 2017;23(1):11-24. doi: 10.1111/hae.13088
76. Martinoli C, Della Casa Alberighi O, Di Minno G, Graziano E, Molinari AC, Pasta G, i sur. Development and definition of a simplified scanning procedure and scoring method for Haemophilia Early Arthropathy Detection with

Ultrasound (HEAD-US). *Thromb Haemost.* 2013;109(6):1170-9. doi: 10.1160/TH12-11-0874

77. Zhou JY, Barnes RFW, Foster G, Iorio A, Cramer TJ, von Drygalski A. Joint Bleeding Tendencies in Adult Patients With Hemophilia: It's Not All Pharmacokinetics. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2019;25:1076029619862052. doi: 10.1177/1076029619862052
78. Ligocki CC, Abadeh A, Wang KC, Adams-Webber T, Blanchette VS, Doria AS. A systematic review of ultrasound imaging as a tool for evaluating haemophilic arthropathy in children and adults. *Haemophilia.* 2017;23(4):598-612. doi: 10.1111/hae.13163
79. Plut D, Kotnik BF, Zupan IP, Kljucsevsek D, Vidmar G, Snoj Z, i sur. Diagnostic accuracy of haemophilia early arthropathy detection with ultrasound (HEAD-US): a comparative magnetic resonance imaging (MRI) study. *Radiol Oncol.* 2019;53(2):178-86. doi: 10.2478/raon-2019-0027
80. Alvarez Roman MT, de la Corte Rodriguez H, Bonanad Boix S, Mingot-Castellano ME, Fernandez Mosteirín N. The factor VIII treatment history of non-severe hemophilia A: COMMENT. Joint damage in adult patients with mild or moderate hemophilia A evaluated with the HEAD-US system. *J Thromb Haemost.* 2021;19(10):2638-41. doi: 10.1111/jth.15475
81. De la Corte-Rodriguez H, Rodriguez-Merchan EC, Alvarez-Roman MT, Martin-Salces M, Martinoli C, Jimenez-Yuste V. The value of HEAD-US system in detecting subclinical abnormalities in joints of patients with hemophilia. *Expert Rev Hematol.* 2018;11(3):253-61. doi: 10.1080/17474086.2018.1435269
82. Foppen W, van der Schaaf IC, Beek FJA, Mali W, Fischer K. Diagnostic accuracy of point-of-care ultrasound for evaluation of early blood-induced joint changes: Comparison with MRI. *Haemophilia.* 2018;24(6):971-9. doi: 10.1111/hae.13524
83. De la Corte-Rodriguez H, Rodriguez-Merchan EC, Alvarez-Roman MT, Martin-Salces M, Jimenez-Yuste V. Clinical assessment and point of care

- ultrasonography: How to diagnose haemophilic synovitis. *Haemophilia*. 2022; 28(1):138-44. doi: 10.1111/hae.14441
84. Roussel NA, Chantrain VA, Foubert A, Lambert C, Hermans C, Meeus M, i sur. Gaining more insight into ankle pain in haemophilia: A study exploring pain, structural and functional evaluation of the ankle joint. *Haemophilia*. 2022;28(3):480-90. doi: 10.1111/hae.14544
 85. Surinova S, Schiess R, Huttenhain R, Cerciello F, Wollscheid B, Aebersold R. On the development of plasma protein biomarkers. *J Proteome Res*. 2011;10(1):5-16. doi: 10.1021/pr1008515
 86. Hsueh MF, Onnerfjord P, Kraus VB. Biomarkers and proteomic analysis of osteoarthritis. *Matrix Biol*. 2014;39:56-66. doi: 10.1016/j.matbio.2014.08.012
 87. Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(9):699-711. doi: 10.1038/nrm1468
 88. Matta C, Boocock DJ, Fellows CR, Miosge N, Dixon JE, Liddell S, i sur. Molecular phenotyping of the surfaceome of migratory chondroprogenitors and mesenchymal stem cells using biotinylation, glyco-capture and quantitative LC-MS/MS proteomic analysis. *Sci Rep*. 2019;9(1):9018. doi: 10.1038/s41598-019-44957-y
 89. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023 [internet]. Hinxton: UniProt Consortium; 2002-2024. [pristupljeno 25. 2. 2024.]. Dostupno na: <https://www.uniprot.org>
 90. Zaima N, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Setou M. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Int J Mol Sci*. 2010;11(12):5040-55. doi: 10.3390/ijms11125040
 91. Valentino LA. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) imaging mass spectrometry (IMS): peering into the cup of Jamshid. *Haemophilia*. 2014;20(3):304-5. doi: 10.1111/hae.12418
 92. Kriegsmann M, Casadonte R, Randau T, Gravius S, Pennekamp P, Strauss A, i sur. MALDI imaging of predictive ferritin, fibrinogen and proteases in

haemophilic arthropathy. *Haemophilia*. 2014;20(3):446-53. doi: 10.1111/hae.12377

93. White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. Definition in haemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the ISTH. *Thromb Haemost*. 2001;85:560.
94. Qvist P, Christgau S, Pedersen BJ, Schlemmer A, Christiansen C. Circadian variation in the serum concentration of C-terminal telopeptide of type I collagen (serum CTx): effects of gender, age, menopausal status, posture, daylight, serum cortisol, and fasting. *Bone*. 2002;31:57-61. doi: 10.1016/s8756-3282(02)00791-3.
95. Kong SY, Stabler TV, Criscione LG, Elliott AL, Jordan JM, Kraus VB. Diurnal variation of serum and urine biomarkers in patients with radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(8):2496-504. doi: 10.1002/art.21977
96. World Federation of Hemophilia - eLearning Platform [internet]. Montreal (QC): World Federation of Hemophilia; c2023. Compendium of assessment tools; 2023. [pristupljeno 29. 4. 2023.]. Dostupno na: https://elearning.wfh.org/resource/compendium-of-assessment-tools/#functional_and_physical_tools1a42-60ce78a1-2573f205-9a34.
97. Gilbert MS. Prophylaxis: musculoskeletal evaluation. *Semin Hematol*. 1993 Jul;30:3-6.
98. Gouw SC, Timmer MA, Srivastava A, de Kleijn P, Hilliard P, Peters M, i sur. Measurement of joint health in persons with haemophilia: A systematic review of the measurement properties of haemophilia-specific instruments. *Haemophilia*. 2019;25(1):e1-10. doi: 10.1111/hae.13631
99. Diz AP, Truebano M, Skibinski DOF. The consequences of sample pooling in proteomics: an empirical study. *Electrophoresis*. 2009;30(17):2967-75. doi: 10.1002/elps.200900210

100. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc.* 2007;2(8):1896-906. doi: 10.1038/nprot.2007.261
101. Heemskerk VH, Daemen MA, Buurman WA. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999;10(1):5-14. doi: 10.1016/s1359-6101(98)00022-7
102. Ebraze M, Ezzatifar F, Torkamandi S, Mohammadi FS, Salimifard S, Gowhari Shabgah A, i sur. Association of the genetic variants in the endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 gene with ankylosing spondylitis susceptibility. *Int J Rheum Dis.* 2021;24(4):567-81. doi: 10.1111/1756-185X.14079
103. Miyata J, Tani K, Sato K, Otsuka S, Urata T, Lkhagvaa B, i sur. Cathepsin G: the significance in rheumatoid arthritis as a monocyte chemoattractant. *Rheumatol Int.* 2007;27(4):375-82. doi: 10.1007/s00296-006-0210-8
104. Gray AL, Pun N, Ridley AJL, Dyer DP. Role of extracellular matrix proteoglycans in immune cell recruitment. *Int J Exp Pathol.* 2022;103(2):34-43. doi: 10.1111/iep.12428
105. Freudenberg J, Lee HS, Han BG, Shin HD, Kang YM, Sung YK, i sur. Genome-wide association study of rheumatoid arthritis in Koreans: population-specific loci as well as overlap with European susceptibility loci. *Arthritis Rheum.* 2011;63(4):884-93. doi: 10.1002/art.30235
106. Bresnihan B, Gogarty M, FitzGerald O, Dayer JM, Burger D. Apolipoprotein A-I infiltration in rheumatoid arthritis synovial tissue: a control mechanism of cytokine production? *Arthritis Res Ther.* 2004;6(6):R563-6. doi: 10.1186/ar1443
107. Clemmons DR. Physiology of insulin-like growth factor 1 [ažurirano 18. 1. 2024.; pristupljeno 20. 2. 2024.]. U: Snyder PJ, Martin KA, ur. UpToDate [internet]. Waltham (MA): UpToDate; c2024. Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/physiology-of-insulin-like-growth-factor-1>

108. Huang S, Thomsson KA, Jin C, Alweddi S, Struglics A, Rolfson O, i sur. Cathepsin g Degrades Both Glycosylated and Unglycosylated Regions of Lubricin, a Synovial Mucin. *Sci Rep.* 2020;10(1):4215. doi: 10.1038/s41598-020-61161-5
109. Ye RD, Sun L. Emerging functions of serum amyloid A in inflammation. *J Leukoc Biol.* 2015;98(6):923-9. doi: 10.1189/jlb.3VMR0315-080R
110. Martin-Marquez BT, Sandoval-Garcia F, Corona-Meraz FI, Martinez-Garcia EA, Sanchez-Hernandez PE, Salazar-Paramo M, i sur. Osteopontin: A Bone-Derived Protein Involved in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis Immunopathology. *Biomolecules.* 2023;13(3):502. doi: 10.3390/biom13030502
111. Liu B, Cheng L, Gao H, Zhang J, Dong Y, Gao W, i sur. The biology of VSIG4: Implications for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases and cancer. *Cancer Lett.* 2023;553:215996. doi: 10.1016/j.canlet.2022.215996
112. Uchida T, Nakashima M, Hirota Y, Miyazaki Y, Tsukazaki T, Shindo H. Immunohistochemical localisation of protein tyrosine kinase receptors Tie-1 and Tie-2 in synovial tissue of rheumatoid arthritis: correlation with angiogenesis and synovial proliferation. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(8):607-14. doi: 10.1136/ard.59.8.607
113. Huang Y, Liu Y, Huang Q, Sun S, Ji Z, Huang L, i sur. TMT-Based Quantitative Proteomics Analysis of Synovial Fluid-Derived Exosomes in Inflammatory Arthritis. *Front Immunol.* 2022;13:800902. doi: 10.3389/fimmu.2022.800902
114. Jahangir S, John P, Bhatti A, Aslam MM, Mehmood Malik J, Anderson JR, i sur. LC-MS/MS-Based Serum Protein Profiling for Identification of Candidate Biomarkers in Pakistani Rheumatoid Arthritis Patients. *Life (Basel).* 2022;12(3):464. doi: 10.3390/life12030464
115. Rahman MT, Muppala S, Wu J, Krukovets I, Solovjev D, Verbovetskiy D, i sur. Effects of thrombospondin-4 on pro-inflammatory phenotype differentiation

and apoptosis in macrophages. *Cell Death Dis.* 2020;11(1):53. doi: 10.1038/s41419-020-2237-2

116. Pathak A, Agrawal A. Evolution of C-Reactive Protein. *Front Immunol.* 2019;10:943. doi: 10.3389/fimmu.2019.00943
117. Kim JT, Jedrychowski MP, Wei W, Fernandez D, Fischer CR, Banik SM, i sur. A Plasma Protein Network Regulates PM20D1 and N-Acyl Amino Acid Bioactivity. *Cell Chem Biol.* 2020;27(9):1130-9.e4. doi: 10.1016/j.chembiol.2020.04.009
118. Heissler SM, Sellers JR. Myosin light chains: Teaching old dogs new tricks. *Bioarchitecture.* 2014;4(6):169-88. doi: 10.1080/19490992.2015.1054092
119. Deguchi H, Guo Z, Hayat M, Pflimlin E, Lear S, Shen W, i sur. Molecular interaction site on procoagulant myosin for factor Xa-dependent prothrombin activation. *J Biol Chem.* 2019;294(41):15176-81. doi: 10.1074/jbc.AC119.010236
120. Leatherdale A, Parker D, Tasneem S, Wang Y, Bihan D, Bonna A, i sur. Multimerin 1 supports platelet function in vivo and binds to specific GPAGPOGPX motifs in fibrillar collagens that enhance platelet adhesion. *J Thromb Haemost.* 2021;19(2):547-61. doi: 10.1111/jth.15171
121. Citi S, Pulimeno P, Paschoud S. Cingulin, paracingulin, and PLEKHA7: signaling and cytoskeletal adaptors at the apical junctional complex. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1257:125-32. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06506.x
122. Stenina-Adognravi O, Plow EF. Thrombospondin-4 in tissue remodeling. *Matrix Biol.* 2019;75-76:300-13. doi: 10.1016/j.matbio.2017.11.006
123. Abdelnaby R, Sonbol YT, Dardeer KT, Elgenidy A, Ebrahim MA, Elmenawi KA, i sur. Could Osteopontin be a useful biomarker in the diagnosis and severity assessment of osteoarthritis? A systematic review and meta-analysis of recent evidence. *Clin Immunol.* 2023;246:109187. doi: 10.1016/j.clim.2022.109187
124. Maly K, Schaible I, Riegger J, Brenner RE, Meurer A, Zaucke F. The Expression of Thrombospondin-4 Correlates with Disease Severity in

- Osteoarthritic Knee Cartilage. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2):447. doi: 10.3390/ijms20020447
125. Posner MG. Multimerin-1 and cancer: a review. *Biosci Rep.* 2022;42(2): BSR20211248. doi: 10.1042/BSR20211248
 126. Mun S, Lee J, Park M, Shin J, Lim MK, Kang HG. Serum biomarker panel for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2021;23(1):31. doi: 10.1186/s13075-020-02405-7
 127. Wang K, Huang XT, Miao YP, Bai XL, Jin F. MiR-148a-3p attenuates apoptosis and inflammation by targeting CNTN4 in atherosclerosis. *Ann Transl Med.* 2022;10(22):1201. doi: 10.21037/atm-22-3768
 128. Yeo L, Adlard N, Biehl M, Juarez M, Smallie T, Snow M, i sur. Expression of chemokines CXCL4 and CXCL7 by synovial macrophages defines an early stage of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(4):763-71. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206921
 129. Sangaletti S, Botti L, Gulino A, Lecis D, Bassani B, Portararo P, i sur. SPARC regulation of PMN clearance protects from pristane-induced lupus and rheumatoid arthritis. *iScience.* 2021;24(6):102510. doi: 10.1016/j.isci.2021.102510
 130. Xiao C, Lv C, Sun S, Zhao H, Ling H, Li M, i sur. TSP1 is the essential domain of SEMA5A involved in pannus formation in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2021;60(12):5833-42. doi: 10.1093/rheumatology/keab133
 131. Meng Y, Zhang M, Zhao X, Cheng Y, Jia R, Wang Y, i sur. Decreased serum thrombospondin-1 and elevation of its autoantibody are associated with multiple exacerbated clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2018;37(10):2707-14. doi: 10.1007/s10067-018-4188-x
 132. Misra S, Hascall VC, Markwald RR, Ghatak S. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Front Immunol.* 2015;6:201. doi: 10.3389/fimmu.2015.00201

133. Chen L, Fu C, Zhang Q, He C, Zhang F, Wei Q. The role of CD44 in pathological angiogenesis. *FASEB J.* 2020;34(10):13125-39. doi: 10.1096/fj.202000380RR
134. Heldin P, Kolliopoulos C, Lin CY, Heldin CH. Involvement of hyaluronan and CD44 in cancer and viral infections. *Cell Signal.* 2020;65:109427. doi: 10.1016/j.cellsig.2019.109427
135. Pircher A, Schafer G, Eigentler A, Pichler R, Puhr M, Steiner E, i sur. Robo 4 - the double-edged sword in prostate cancer: impact on cancer cell aggressiveness and tumor vasculature. *Int J Med Sci.* 2019;16(1):115-24. doi: 10.7150/ijms.28735
136. Scotece M, Koskinen-Kolasa A, Pemmari A, Leppanen T, Hamalainen M, Moilanen T, i sur. Novel adipokine associated with OA: retinol binding protein 4 (RBP4) is produced by cartilage and is correlated with MMPs in osteoarthritis patients. *Inflamm Res.* 2020;69(4):415-21. doi: 10.1007/s00011-020-01326-0
137. Cherif H, Mannarino M, Pacis AS, Ragoussis J, Rabau O, Ouellet JA, i sur. Single-Cell RNA-Seq Analysis of Cells from Degenerating and Non-Degenerating Intervertebral Discs from the Same Individual Reveals New Biomarkers for Intervertebral Disc Degeneration. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):3993. doi: 10.3390/ijms23073993
138. Mahlich D, Glasmacher A, Muller I, Oppermann J, Grevenstein D, Eysel P, i sur. Expression and Localization of Thrombospondins, Plastin 3, and STIM1 in Different Cartilage Compartments of the Osteoarthritic Varus Knee. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):3073. doi: 10.3390/ijms22063073
139. Wu Q, Tu H, Li J. Multifaceted Roles of Chemokine C-X-C Motif Ligand 7 in Inflammatory Diseases and Cancer. *Front Pharmacol.* 2022;13:914730. doi: 10.3389/fphar.2022.914730
140. Cholia RP, Nayyar H, Kumar R, Mantha AK. Understanding the Multifaceted Role of Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2 (ENPP2)

and its Altered Behaviour in Human Diseases. *Curr Mol Med*. 2015;15(10): 932-43. doi: 10.2174/1566524015666150921104804

141. Colas-Algora N, Millan J. How many cadherins do human endothelial cells express? *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(7):1299-317. doi: 10.1007/s00018-018-2991-9
142. Borza R, Salgado-Polo F, Moolenaar WH, Perrakis A. Structure and function of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (ENPP) family: Tidying up diversity. *J Biol Chem*. 2022;298(2):101526. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101526
143. Jia Y, Li Y, Xu XD, Tian Y, Shang H. Design and Development of Autotaxin Inhibitors. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(11):1203. doi: 10.3390/ph14111203
144. She S, Yang M, Hu H, Hu P, Yang Y, Ren H. Proteomics Based Identification of Autotaxin As An Anti-Hepatitis B Virus Factor and a Promoter of Hepatoma Cell Invasion and Migration. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(2):744-60. doi: 10.1159/000487166
145. Liu W, He J, Lin R, Liang J, Luo Q. Differential proteomics of the synovial membrane between bilateral and unilateral knee osteoarthritis in surgery-induced rabbit models. *Mol Med Rep*. 2016;14(3):2243-9. doi: 10.3892/mmr.2016.5511
146. Grek C, Townsend DM. Protein Disulfide Isomerase Superfamily in Disease and the Regulation of Apoptosis. *Endoplasmic Reticulum Stress Dis*. 2014;1(1):4-17. doi: 10.2478/ersc-2013-0001
147. Mathis S, Jala VR, Haribabu B. Role of leukotriene B4 receptors in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2007;7(1):12-7. doi: 10.1016/j.autrev.2007.03.005
148. Son CN, Lee J, Song BW, Jeong HJ, Chae JN, Kim JM, et al. Synovial fluid proteomics in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2019; 78:1536. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-eular.2017

149. Yu PM, Lin Y, Zhang C, Wang HM, Wei Q, Zhu SY, i sur. Low-Frequency Vibration Promotes Tumor Necrosis Factor-alpha Production to Increase Cartilage Degeneration in Knee Osteoarthritis. *Cartilage*. 2021;13 Suppl 2:1398S-406S. doi: 10.1177/1947603520931178
150. Zhang H, Liew CC, Marshall KW. Microarray analysis reveals the involvement of beta-2 microglobulin (B2M) in human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(12):950-60. doi: 10.1053/joca.2002.0850
151. Kenna TJ, Robinson PC, Haroon N. Endoplasmic reticulum aminopeptidases in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(9):1549-56. doi: 10.1093/rheumatology/kev218
152. Ghosh K, Shankarkumar U, Shetty S, Mohanty D. Chronic synovitis and HLA B27 in patients with severe haemophilia. *Lancet*. 2003;361(9361):933-4. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12763-8
153. Lee J, Mun S, Kim D, Lee YR, Sheen DH, Ihm C, i sur. Proteomics Analysis for Verification of Rheumatoid Arthritis Biomarker Candidates Using Multiple Reaction Monitoring. *Proteomics Clin Appl*. 2019;13(3):e1800011. doi: 10.1002/prca.201800011
154. Lee H, Suh YS, Lee SI, Cheon YH, Kim M, Noh HS, i sur. Serum IGF-1 in patients with rheumatoid arthritis: correlation with disease activity. *BMC Res Notes*. 2022;15(1):128. doi: 10.1186/s13104-022-06008-0
155. Kiepe D, Ciarmatori S, Hoeflich A, Wolf E, Tonshoff B. Insulin-like growth factor (IGF)-I stimulates cell proliferation and induces IGF binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 gene expression in cultured growth plate chondrocytes via distinct signaling pathways. *Endocrinology*. 2005;146(7):3096-104. doi: 10.1210/en.2005-0324
156. Li XY, Shen ZX, Yang D. Correlation between osteopontin and cartilage oligomeric matrix protein levels in joint synovial fluid of patients with knee osteoarthritis and disease severity. *Zhongguo Gu Shang*. 2022;35(7):655-60. doi: 10.12200/j.issn.1003-0034.2022.07.012

157. Hakobyan N, Enockson C, Manco-Johnson M, Valentino LA. Osteopontin as a biomarker for early stages of blood-induced joint disease in hemophilia patients. *Haemophilia*. 2014;20 Suppl 3:63. doi: 10.1111/hae.12400
158. Sun X, Zhou X, Zhuang J, Qiu S, Liu Z, Li Q, i sur. Relationship between serum cartilage turnover biomarkers and haemophilic arthropathy severity in adult patients with severe haemophilia A in China. *Haemophilia*. 2023;29(1):362-4. doi: 10.1111/hae.14695
159. Liem Y, Judge A, Kirwan J, Ourradi K, Li Y, Sharif M. Multivariable logistic and linear regression models for identification of clinically useful biomarkers for osteoarthritis. *Sci Rep*. 2020;10(1):11328. doi: 10.1038/s41598-020-68077-0
160. Itoh Y. Proteinases and Matrix Degradation. U: Firestein GS, ur. Firestein & Kelley's Textbook of Rheumatology. 11. izd. Philadelphia: Elsevier; 2021. Str. 109-31.
161. Steinmeyer J, Kalbhen DA. The inhibitory effects of antirheumatic drugs on the activity of human leukocyte elastase and cathepsin G. *Inflamm Res*. 1996;45(7):324-9. doi: 10.1007/BF02252944
162. Zamolodchikova TS, Tolpygo SM, Svirshchevskaya EV. Cathepsin G-Not Only Inflammation: The Immune Protease Can Regulate Normal Physiological Processes. *Front Immunol*. 2020;11:411. doi: 10.3389/fimmu.2020.00411
163. Luyten FP, Hascall VC, Nissley SP, Morales TI, Reddi AH. Insulin-like growth factors maintain steady-state metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys*. 1988;267(2):416-25. doi: 10.1016/0003-9861(88)90047-1
164. Luyten FP, DeBari C, Dell'Accio F. Regenerative Medicine and Tissue Engineering. U: Firestein GS, ur. Firestein & Kelley's Textbook of Rheumatology. 11. izd. Philadelphia: Elsevier; 2021. Str. 92-108.
165. Denko CW, Malesud CJ. Role of the growth hormone/insulin-like growth factor-1 paracrine axis in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum*. 2005;35(1):24-34. doi: 10.1016/j.semarthrit.2005.03.001

166. Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J.* 1991;10(5):1091-101. doi: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb08049.x

11. BIOGRAFIJA

Nataša Kalebota rođena je 1966. godine u Šibeniku te je diplomirala na Medicinskom fakultetu u Zagrebu 1991. godine. Radila je od 1994. do 1998. godine u Službi hitne medicinske pomoći, od 2000. do 2007. godine u Ministarstvu obrane RH, a od 2007. godine u Domu zdravlja Zagreb-Centar. Završila je znanstveni poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo te je 2006. godine stekla naziv magistra medicinskih znanosti na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Od 2013. godine je specijalist fizikalne medicine i rehabilitacije. 2014. stekla je europsku diplomu iz područja fizikalne medicine i rehabilitacije (engl. UEMS Fellow of European Board of Physical Medicine and Rehabilitation). Od 2015. godine zaposlena je u Klinici za reumatske bolesti i rehabilitaciju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Aktivno je sudjelovala na domaćim i međunarodnim kongresima, objavila je više stručnih i znanstvenih radova.