



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE**  
**„CAROL DAVILA” din BUCUREȘTI**



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE**

**„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI**

**ȘCOALA DOCTORALĂ**

**DOMENIUL MEDICINĂ**

***ANALIZA FACTORILOR DE RISC MOLECULARI,  
BIOLOGICI ȘI CLINICI ÎN HEMOFILIA A ȘI B  
SEVERĂ: IMPACTUL ACESTORA ASUPRA ALEGERII  
TERAPIEI ȘI EVOLUȚIEI***

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. CORIU DANIEL**

**Student-doctorand:**

**BRÎNZĂ MELEN**

***Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București***

*Strada Dionisie Lupu nr. 37 București, Sector 2, 020021 România, Cod fiscal: 4192910*

*Cont: RO57TREZ70220F330500XXXX, Banca: TREZORERIE sect. 2 +40.21*

*318.0719; +40.21 318.0721; +40.21 318.0722*

[www.umfcd.ro](http://www.umfcd.ro)

# CUPRINS

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

ABREVIERI

INTRODUCERE

<b>I. PARTEA GENERALĂ</b> .....	pagina 1
<b>Capitolul 1: Generalități în hemofilie</b> .....	pagina 1
1.1. Definiție .....	pagina 1
1.2. Epidemiologie .....	pagina 1
1.3. Etiologie .....	pagina 1
1.4. Manifestări clinice .....	pagina 2
1.5. Teste de laborator .....	pagina 4
<b>Capitolul 2: Strategii terapeutice în hemofilie</b> .....	pagina 9
2.1. Istoric .....	pagina 9
2.2. Regimuri terapeutice în hemofilie .....	pagina 11
<b>Capitolul 3: Complicațiile cronice ale hemofiliei</b> .....	pagina 15
3.1. Complicațiile bolii .....	pagina 15
3.1.1. Artropatia hemofilică cronică .....	pagina 15
3.1.2. Atrofii musculare .....	pagina 16
3.1.3. Pseudotumorile .....	pagina 16
3.1.4. Fracturile .....	pagina 17
3.2. Complicațiile tratamentului .....	pagina 17
3.2.1. Infecțiile virale .....	pagina 17
3.2.2. Dezvoltarea inhibitorilor .....	pagina 18
<b>Capitolul 4: Metode de evaluare a rezultatelor în hemofilie</b> .....	pagina 25
4.1. Frecvența sângerărilor .....	pagina 25
4.2. Evaluarea structurii și funcției .....	pagina 25
4.2.1. Examinarea fizică .....	pagina 26
4.2.2. Evaluarea imagistică .....	pagina 26
4.3. Evaluarea activității și participării .....	pagina 27

<b>II. PARTEA ORIGINALĂ</b> .....	pagina 28
<b>Capitolul 5: Ipoteza de lucru și obiective generale</b> .....	pagina 28
<b>Capitolul 6: Studiul 1: Analiza caracteristicilor clinice ale pacienților hemofilici și impactul asupra evoluției și tratamentului</b> .....	pagina 30
6.1. Obiective.....	pagina 30
6.2. Materiale și metodă .....	pagina 30
6.2.1. Tipul studiului .....	pagina 30
6.2.2. Pacienți .....	pagina 31
6.2.3. Perioada de observație .....	pagina 31
6.2.4. Parametrii investigați .....	pagina 31
6.2.5. Analiza statistică .....	pagina 32
6.3. Rezultate .....	pagina 32
6.3.1. Identificarea caracteristicilor clinice ale pacienților hemofilici .....	pagina 32
6.3.2. Stabilirea asocierii între caracteristicile bolii, comorbidități și evoluție și implicații terapeutice .....	pagina 44
6.4. Concluzii .....	pagina 58
<b>Capitolul 7: Studiul 2: Analiza factorilor de risc biologici în hemofilia – utilitatea farmacocineticii în personalizarea terapiei</b> .....	pagina 60
7.1. Obiective .....	pagina 60
7.2. Materiale și metodă .....	pagina 60
7.2.1. Tipul studiului .....	pagina 60
7.2.2. Pacienți .....	pagina 60
7.2.3. Perioada de observație .....	pagina 61
7.2.4. Parametrii investigați .....	pagina 61
7.2.5. Metoda de lucru .....	pagina 61
7.2.5. Analiza statistică .....	pagina 62
7.3. Rezultate .....	pagina 62
7.4. Concluzii .....	pagina 66

## **Capitolul 8: Studiul 3: Analiza factorilor de risc moleculari în hemofilia A severă**

.....	pagina 68
8.1. Obiective .....	pagina 68
8.2. Materiale și metodă .....	pagina 68
8.2.1. Tipul studiului .....	pagina 68
8.2.2. Pacienți .....	pagina 68
8.2.3. Parametrii investigați .....	pagina 68
8.2.5. Analiza statistică .....	pagina 69
8.2.6. Metoda de lucru .....	pagina 69
8.3. Rezultate .....	pagina 71
8.3.1. Analiza prevalenței inversiunilor Int22 și Int1 în hemofilia A severă .....	pagina 71
8.3.2. Analiza impactului inversiunilor Int22 și Int1 asupra fenotipului sângerărilor și al dezvoltării inhibitorilor .....	pagina 73
8.4. Concluzii .....	pagina 84

## **Capitolul 9: Studiul 4: Evaluarea impactului hemofiliei și a comorbidităților asupra funcționalității, activității și calității vieții** .....

.....	pagina 87
9.1. Obiective .....	pagina 87
9.2. Materiale și metodă .....	pagina 88
9.2.1. Tipul studiului .....	pagina 88
9.2.2. Pacienți .....	pagina 88
9.2.3. Perioada de observație .....	pagina 88
9.2.4. Parametrii investigați .....	pagina 88
9.2.5. Metoda de lucru .....	pagina 89
9.2.6. Analiza statistică .....	pagina 91
9.3. Rezultate .....	pagina 92
9.3.1. Evaluarea activității fizice în hemofilie utilizând chestionarul HAL .....	pagina 92
9.3.2. Evaluarea funcționalității în hemofilie utilizând scorul FISH .....	pagina 94

9.3.3. Evaluarea calității vieții în hemofilie utilizând chestionarul EQ-5D-5L .....	pagina 98
9.3.4. Analiza factorilor ce influențează scorurile HAL, FISH, EQ-5D-5L și evoluția în timp a HAL și FISH .....	pagina 103
9.4. Concluzii .....	pagina 119
<b>Capitolul 10: Concluzii generale ale tezei .....</b>	<b>pagina 121</b>
<b>Capitolul 11: Contribuții originale ale tezei .....</b>	<b>pagina 123</b>
BIBLIOGRAFIE .....	pagina 125
ANEXE .....	pagina 155

## INTRODUCERE

Hemofiliile reprezintă coagulopatii ereditare caracterizate prin sângerări prelungite, apărute spontan sau după traumatisme/intervenții chirurgicale. Sunt afecțiuni cu transmitere X-linkată ce se manifestă cu precădere la sexul masculin. Elementul patognomonic este reprezentat de sângerarea articulară (hemartroza) [1-2]. Aceasta prezintă caracter repetitiv, conducând la dizabilități locomotorii și scăderea calității vieții. Evoluția bolii este heterogenă, influențată fiind de o serie de factori: nivelul activității factorului VIII/IX, fenotipul sângerărilor, tipul mutației cauzatoare și alte mutații coexistente [3].

În ultimele decenii s-au înregistrat progrese deosebite atât în diagnosticarea și monitorizarea hemofiliilor, cât și în tratamentul acestora. Metodele de evaluare paraclinică au evoluat în același ritm, pentru a oferi posibilitatea monitorizării răspunsului la aceste tratamente. Concomitent au fost dezvoltate instrumente noi de evaluare a rezultatelor și eficacității schemelor terapeutice. Aceste instrumente sunt utile în evaluarea atât a stării de sănătate și a gradului de dizabilitate, cât și a impactului bolii asupra funcționalității, activității și participării.

Scopul acestei lucrări este de a analiza pacienții adulți diagnosticați cu hemofilie severă A și B aflați în evidență Institutului Clinic Fundeni, un centru de referință în acest domeniu. Analiza retrospectivă a pacienților înrolați a urmărit demonstrarea impactului anumitor caracteristici clinice asupra fenotipului bolii, statusului articular, gradului de activitate și independență funcțională și a calității vieții. În același timp, am demonstrat utilitatea testării genetice în hemofilie ca factor de prognostic al severității și evoluției bolii și ca factor de risc în dezvoltarea inhibitorilor. Aceste informații își găsesc utilitatea în practică medicală, în special în ghidarea terapiei profilactice și în monitorizarea pacienților.

Consider că experiența din viața reală joacă un rol semnificativ în identificarea persoanelor cu fenotip mai sever al sângerărilor și adaptarea terapiei acestora astfel încât să se păstreze sănătatea articulară pe termen cât mai lung și să se prevină instalarea dizabilităților locomotorii. Abordarea comprehensivă, multidisciplinară este esențială în îmbunătățirea calității vieții și asigurarea independenței funcționale.

## PARTEA GENERALĂ

### 1. Generalități în hemofilie

Hemofilia este o tulburare de coagulare rară, cu transmitere ereditară X-linkată [2], cauzată de deficitul unui factor de coagulare (VIII în cazul HA, IX în HB). Hemofilia A apare cu o incidență de 1-2 cazuri la 10.000 de nașteri de sex masculin și reprezintă ~80-85% din cazuri [2, 4]. Boala este cauzată de o anomalie la nivelul genei specifice (F8 sau F9) de pe brațul lung al cromozomului X, determinând sinteza deficitară a proteinei factorului VIII, respectiv IX [2, 4-6].

În funcție de nivelul rezidual al activității factorului, hemofiliile se clasifică în forme severe (factor <1%), medii (factor 1-5%) și ușoare (factor >5%) [4]. Manifestările clinice sunt reprezentate de sângerări abundente și prelungite ce pot apare spontan, precoce (în formele severe) sau tardiv, după traumatisme sau intervenții chirurgicale (forme medii și ușoare) [4, 7].

Hemartrozele reprezintă cea mai frecventă manifestare în hemofilie (70-80%), urmate de hematoamele musculare (10-25%) [4, 8]. Alte sângerări pot apare la nivel oro-faringian, urinar, digestiv sau intracranian. Cele din urmă, deși apar foarte rar, au o mortalitate crescută în absența diagnosticului și a tratamentului prompt [9].

Manifestările clinice sunt heterogene, ele variind de la un individ la altul, în funcție de fenotipul sângerării, mutațiile F8/F9 [5], mutații ale genelor reglatoare ale sistemului inflamator/imun [10], precum și de coexistența altor tulburări ale hemostazei (trombofilii) [5, 11]. Identificarea patternului sângerării are rol important în alegerea momentului inițierii profilaxiei și a schemei de tratament optime.

Diagnosticul se poate stabili încă din perioada prenatală, prin analiza genetică a produsului de concepție, după sfatul genetic și semnarea consințămintelor informate [12]. Postpartum, testele de laborator ce stabilesc diagnosticul de hemofilie sunt APTT (prelungit) și nivelul scăzut al activității factorului VIII sau IX măsurat prin teste one-stage sau cromogenice [13]. Aceste teste de hemostază se utilizează ulterior, în scopul monitorizării răspunsului la tratamentul administrat (teste de recovery și de farmacocinetică).

Testarea pentru inhibitori se face periodic (de la inițierea profilaxiei) sau când se suspectează scăderea eficienței terapiei în prevenirea/tratarea sângerărilor. Testarea se face prin metoda Bethesda sau Nijmegen și utilizează principiul măsurării activității factorului în diluții seriate din amestecul de plasmă pacient cu plasmă normală incubată 2 ore la 37°C [14]. Un rezultat peste 0.6 UB este considerat pozitiv.

Testarea genetică în hemofilie este utilă în stabilirea relației genotip-fenotip, în prezicerea riscului de inhibitori și a răspunsului la terapia de eradicare a acestora (terapia de inducere a toleranței imune) și în confirmarea statusului de carrier [13]. Până în prezent au fost identificate ~3500 de mutații la nivelul F8 și peste 1200 de mutații ale F9 [4, 15]. Aproximativ jumătate din cazurile de hemofilie A severă sunt determinate de inversiuni ale Intronilor 22 și 1 [4, 15]. Protocolul de testare genetică este dictat de tipul și severitatea hemofiliei și de istoricul familial. În HA severă se începe cu testarea inversiunilor Int22 și Int1; în HA medie și ușoară și cea severă negativă la cele două inversiuni se efectuează secvențierea genei; în HB se începe cu secvențierea genei indiferent de severitatea bolii.

## **2. Strategii terapeutice in hemofilie**

### **2.1. Istoric**

Tratamentul în hemofilie a cunoscut progrese semnificative, de la administrarea de plasmă proaspătă sau crioprecipitat și concentratele plasmatice liofilizate (cu dezavantajul transmiterii de infecții virale VHC, VHB sau HIV) [16], la produse recombinante obținute utilizând tehnici complexe de inactivare virală [16]. Noi concentrate de factor au apărut recent, cu durată prelungită de acțiune, pentru a veni în sprijinul pacienților cu abord venos precar, aderență scăzută sau nevoie de profilaxie intensivă [17].

Pentru pacienții cu inhibitori, care nu mai răspund la administrarea de factor VIII/IX, au devenit disponibili agenții de bypass (factor VII activat recombinat și complex protrombinic activat) [16]. Aceste două produse au deschis accesul pacienților cu inhibitori la intervenții chirurgicale majore (în special ortopedice), până la acel moment fiind contraindicate [18]. Terapia de inducere a toleranței imune (ITI) rămâne în continuare singura modalitate de eradicare a inhibitorilor [17, 19], succesul



ei depinzând de titrul de inhibitori (maxim și la inițierea terapiei), durata de la momentul depistării inhibitorilor până la inițierea ITI, mutația genetică F8/F9 și complianța pacientului.

Cercetările recente au pus la dispoziția hemofilicilor terapii noi, non-substitutive, ce au avantajul administrării subcutanate, la interval de 1-2 sau 4 săptămâni, unele fiind eficiente atât în hemofilia A cât și B, cu sau fără inhibitori [19].

## **2.2. Regimuri terapeutice în hemofilie**

În managementul hemofiliei există două strategii terapeutice: administrarea on demand, la nevoie, în caz de sângerare și terapia profilactică. Tratamentul episodic are ca obiectiv stoparea cât mai promptă a evenimentului hemoragic instalat, prin administrarea dozelor optime de factor din primele 2 ore de la debutul sângerării [20]. Profilaxia reprezintă standardul de tratament în hemofilie, recomandat de ghidurile internaționale pentru prevenirea sângerărilor în orice moment, îmbunătățirea calității vieții, prezervarea statusului articular și evitarea complicațiilor pe termen lung [13].

În funcție de momentul inițierii, profilaxia este primară, secundară sau terțiară [2, 13], toate având beneficii nete față de terapia episodică, mărturie stând studiile extensive desfășurate. Profilaxia se poate iniția în doze mici administrate cu frecvență crescândă (regim escaladat) sau în doze mari (regim intensiv). Diferențele constă în riscurile de sângerare (mai ridicat în regimul cu doze mici) și de dezvoltare de inhibitori (crescut în regimul intensiv [13]). Indiferent de regimul ales și de momentul inițierii, ghidurile internaționale recomandă individualizarea terapiei în funcție de fenotipul sângerării, statusul articular, farmacocinetică și preferințele pacientului [13, 21]. Alți factori care trebuie luați în considerare sunt vârsta pacientului, abordul venos, nivelul activității fizice și prezența articulațiilor țintă.

## **3. Complicațiile cronice ale hemofiliei**

### **3.1. Complicațiile bolii**

Principala cauză de morbiditate și dizabilitate în hemofilie este artropatia hemofilică cronică, o consecință a hemartrozelor repetate [22]. Încă de la primele episoade de sângerare articulară apar modificări structurale la nivelul sinovialei [22], cartilajului și țesutului osos [13]. Acestea sunt declanșate de formarea radicalilor toxici

de fier (rezultați din degradarea sângelui), eliberarea citokinelor proinflamatorii și de acțiunea nocivă directă a sângelui. Artropatia hemofilică cronică este de multe ori pluriarticulară și afectează în special genunchii, coatele și gleznelor, interferând cu activitățile cotidiene [2].

În stadiile avansate de artropatie, consecutiv limitării mobilității și flexiei antalgice, se instalează atrofiile musculaturii extensoare. Se recomandă ca fiecare episod de sângerare articulară să fie urmat de ședințe de recuperare și kinetoterapie.

O altă complicație este reprezentată de scăderea densității minerale osoase și creșterea riscului de fracturi [23]. Acestea pot apărea spontan sau după traumatisme.

Hematoamele musculare tratate insuficient se pot transforma în timp în pseudotumori [24], formațiuni încapsulate ce au creștere lentă și pot cauza durere, necroză tisulară sau afectare vasculo-nervoasă.

### **3.2. Complicațiile tratamentului**

Cele două complicații secundare terapiei în hemofilie sunt reprezentate de infecțiile virale cu virus hepatitic B și C sau HIV și dezvoltarea de inhibitori.

În ceea ce privește *infecțiile virale*, acestea se datorează administrării produselor derivate de sânge (plasmă sau crioprecipitat) sau a concentratelor plasmaticice liofilizate în anii 60-70' [16].

*Dezvoltarea de inhibitori* (allo-anticorpi) împotriva factorului administrat rămâne complicația de temut a terapiei în hemofilie [2, 5, 19]. Apare cu o rată de ~25-30% în rândul persoanelor cu HA severă și de 3-5% în cazul celor cu HB severă. Aproximativ 80% din inhibitori apar în primele 10-20 de zile de expunere, de aceea se recomandă monitorizarea atentă și frecventă a acestora [25].

Mecanismul apariției acestor anticorpi este unul complex ce implică mediatori ai sistemului imun, citokine și celule specializate în apărare (limfocite B, T<sub>H</sub>, celule prezentatoare de antigen APC) [26]. Rezultatul final este activarea și diferențierea limfocitelor B și producția de anticorpi policlonali din clasa IgG împotriva factorului VIII sau IX exogen [27].

Factorii de risc implicați în dezvoltarea inhibitorilor sunt clasificați în [28]: a) factori nemodificabili (tipul mutației F8/F9, istoric familial, severitatea hemofiliei, genotipul HLA, mutații în genele IL10, TNF $\alpha$ , CTLA<sub>4</sub>) [5, 27, 29-32]; b) factori

modificabili (tipul de concentrat de factor, vârsta inițierii terapiei, numărul de zile de expunere, intensitatea tratamentului) [27, 33-34] și c) factori posibili (infecții, vaccinări, tratamente intensive) [35]. Având în vedere că persoanele cu inhibitori au o calitate a vieții mai precară și morbiditate și mortalitate crescute comparativ cu cei fără inhibitori, devine tot mai importantă identificarea acestor factori predispozanți și adoptarea de strategii de prevenție pentru pacienții cu risc crescut [28].

#### **4. Metode de evaluare a rezultatelor în hemofilie**

În contextul disponibilității unei game variate de opțiuni terapeutice în hemofilie, a fost necesară utilizarea de instrumente de evaluare și de cuantificare a rezultatelor obținute [36]. Metodele clasice de evaluare, prin teste de laborator sau rata de sângerare anuală, nu sunt suficiente, mai ales că ținta terapiei este „zero sângerări” iar preparatele noi sunt dificil de monitorizat [36]. De asemenea, rata de sângerare nu oferă și informații privitoare la impactul sângerărilor asupra funcționalității și activității [37], iar multe evenimente hemoragice subclinice nu sunt raportate. În scopul optimizării schemelor terapeutice, a justificării resurselor utilizate și a standardizării monitorizării în hemofilie, au fost introduse metode generice și specifice de măsurare a stării de sănătate articulară (examen clinic și imagistic), a gradului de activitate și independență funcțională, a calității vieții [13, 36]. Examinarea fizică utilizează scoruri pentru cuantificarea gradului de afectare articulară: scorul Gilbert și Hemophilia Joint Health Score [37]. Evaluarea imagistică vine în completarea examenului clinic și se face prin ecografie (modificările incipiente de afectare articulară) [13], radiografie (pentru modificările de structură osoasă) [38] sau RMN (gold-standardul în evaluarea articulară) [36].

Pentru evaluarea activității și participării au fost elaborate o serie de chestionare completate fie de către pacient (Hemophilia Activity List) [39], fie de către medic (Funcțional Independence Score în Hemophilia) [40]. Ambele evaluează posibilitățile pacienților hemofilici de a efectua anumite activități ce implică funcția brațelor și a picioarelor, măsurând astfel impactul hemofiliei asupra abilităților funcționale ale pacienților.

## II. PARTEA SPECIALĂ

### Capitolul 5: Ipoteze de lucru și obiective generale ale cercetării

Încadrarea pacienților cu hemofilie în grupe de severitate nu se mai face doar pe baza nivelului plasmatic de factor VIII sau IX, deoarece s-a demonstrat că există o heterogenitate a fenotipului sângerărilor în rândul persoanelor cu hemofilie. Ca urmare, se acordă o atenție sporită identificării factorilor ce influențează severitatea manifestărilor în hemofilie: mutația genetică F8/F9, statusul articular, vârsta primelor sângerări, frecvența sângerărilor, gradul de activitate fizică, mutații ale altor gene implicate în hemostază (FV Leiden, Protrombina) sau în reglarea răspunsului inflamator.

Dezvoltarea de allo-anticorpi împotriva factorului VIII sau IX exogen reprezintă cea mai de temut complicație a tratamentului în hemofilie, cu impact asupra statusului articular, a managementului sângerărilor și a calității vieții. Factorii predispozanți demonstrați a fi implicați în apariția inhibitorilor sunt genetici sau de mediu. Identificarea acestor factori oferă medicului posibilitatea de a anticipa apariția acestei complicații și de a interveni asupra abordării terapeutice a pacientului la risc.

Un alt aspect care trebuie luat în considerație este cel al monitorizării rezultatelor în hemofilie, mai precis identificarea instrumentelor de evaluare a evoluției bolii și a răspunsului la tratament. În contextul accesului la regimuri profilactice intensive și personalizate (care să țintească un nivel prag de minim 3-5% și zero sângerări), a terapiilor non-factor, metodele uzuale de monitorizare (rata anuală a sângerării sau nivelul plasmatic al FVIII/IX) nu mai sunt suficiente. Trebuie utilizate noi instrumente de evaluare care să măsoare starea de sănătate în ansamblu, gradul de activitate, de participare și integrare în viața socială, de independență funcțională și de calitate a vieții.

În acest context, cercetarea doctorală prezentă are ca obiectiv studiul caracterelor clinice, biologice și genetice și impactul acestora în evoluția persoanelor cu hemofilie și în alegerea terapiei optime. Lucrarea își propune să demonstreze corelația între fenotipul sângerării și gradul de afectare articulară, vârsta primelor manifestări clinice

și a diagnosticului, mutația genetică, prezenta comorbiditatilor; relația dintre tipul de profilaxie și gradul artropatiei, precum și beneficiile profilaxiei asupra funcționalității și activității articulare prin utilizarea chestionarelor HAL și FISH. În plus, această teză a avut ca scop demonstrarea impactul hemofiliei, al tipului de tratament și al comorbiditatilor asupra calității vieții. Se dorește implementarea testării genetice în investigarea persoanelor cu hemofilie datorită rolului acesteia, nu doar în consilierea genetică și diagnosticul prenatal, dar și în managementul pacienților (prezența inversiei intronului 22 se asociază cu risc semnificativ de dezvoltare de inhibitori).

### **Analiza statistică**

Pentru prelucrarea statistică a datelor din studiu am utilizat softul IBM SPSS Statistics for Windows, Versiunea 29.0. (30-day trial version) Armonk, NY: IBM Corp. De asemenea am efectuat și o analiză descriptivă, a frecvențelor, utilizând programul Office 365. Am prezentat datele nominale ca frecvență absolută și ca procent, iar variabilele continui au fost exprimate prin valoare medie, mediană, abatere standard, minim și maxim, Q25 (percentila 25), Q75 (percentila 75) și IQR (intervalul intercuartil).

Am efectuat analiza asocierii dintre variabilele categoriale utilizând tabelul încrucișat și testul  $\chi^2$  (chi-pătrat). În cazul în care rezultatele testului chi-pătrat au fost alterate suficient cât să nu poată fi luate în considerare am folosit testul exact al lui Fisher. Pentru compararea mediilor în funcție de variabilele dihotomice din studiu am utilizat testul t pentru eșantioane independente. Pentru a compara trei sau mai multe medii de grup în care participanții sunt aceiași în fiecare grup, am utilizat testul ANOVA. O valoare a coeficientului de semnificație statistică  $p < 0,05$  a fost considerată semnificativă.

## **Capitolul 6 - Studiul 1: Analiza caracteristicilor clinice ale pacienților hemofilici și impactul asupra evoluției și tratamentului**

În acest studiu am avut ca obiective identificarea caracteristicilor demografice și clinice ale pacienților hemofilici și stabilirea asocierii între caracteristicile bolii, comorbidități și evoluție și implicații terapeutice.

## **6.1. Materiale și metode**

Am efectuat un studiu retrospectiv de tip observațional, de cohortă, ce a inclus un număr de 201 de cazuri de adulți de adulți diagnosticați cu hemofilie A și B severă (Factor VIII/IX <1%) aflați în evidența Institutului Clinic Fundeni.

### **6.1.1. Perioada de observație**

Pacienții au fost urmăriți în perioada 2018-2023 sau până la deces.

### **6.1.2. Parametri investigați**

Datele au fost extrase din fișele de internare, baza de date electronică a spitalului, anamneza și documentația pacienților. Principalele date colectate au fost vârsta la înrolare, înălțimea, greutatea, antecedentele heredo-colaterale, vârsta primelor manifestări hemoragice și a primei sângerări articulare, vârsta la care s-a stabilit diagnosticul de hemofilie; statusul virusologic (VHC, VHB, HIV), comorbidități, numărul de articulații țintă, prezența inhibitorilorș abordul venos, tipul de terapie la momentul înrolării, vârsta de debut a profilaxiei, doza de profilaxie, rata anuală medie a sângerărilor articulare și istoricul de intervenții ortopedice.

## **6.2. Rezultate**

Lotul de studiu a cuprins 201 pacienți cu hemofilie severă, 89.6% de tip A și 10.4% de tip B cu o vârstă medie de 39.89 ani (18-80 ani). 72.1% din pacienți erau activi fizic. 55.2% din subiecți prezentau infecție VHC secundară transfuziilor de produse de sânge (incidența crescând cu vârsta, 95% din cei peste 60 ani fiind VHC+), însă doar 25.9% au urmat un tratament antiviral. Din punct de vedere al severității fenotipului, 67.7% prezentau un fenotip sever al sângerărilor.

În lotul nostru de pacienți 43.3% relatează absența antecedentelor familiale.

Vârsta la debutul simptomelor a fost în medie de 6.12 luni (SD±3.295), prima sângerare articulară a apărut în medie la 12.82 (SD±4.129). Diagnosticul de hemofilie s-a stabilit în medie la 21.58 luni (SD±20.573), relativ tardiv comparativ cu datele raportate în literatură [41] .

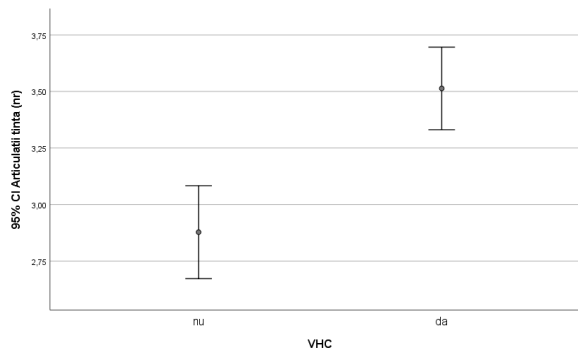
În ceea ce privește tratamentul urmat, 21.4% din pacienți primeau factor doar on demand, iar 78.6% se aflau în tratament profilactic (16.9% continuu, 61.7% intermitent). Profilaxia s-a inițiat tardiv, în medie la 33.91 ani (9-68 ani).

Cei mai mulți pacienți au fost diagnosticați în context de hematoame posttraumatice (34%) sau sângerări orale (20%). Hemartroza a reprezentat un criteriu de prezentare la medic și de diagnostic la 15% din pacienți. Doar 4% din pacienți au fost diagnosticați de la naștere datorită antecedentelor declarate de hemofilie.

Numărul mediu de articulații țintă a fost de 3.23 (SD±1.023), valoarea fiind semnificativ mai mare la cei cu fenotip sever (3.58) față de cei cu fenotip mediu (2.49) ( $t(199)=8.1, p<.00001$ ).

Utilizând testul t pentru eșantioane independente am demonstrat absența unei diferențe semnificative între cei cu fenotip mediu și cei cu fenotip sever în ceea ce privește vârsta la diagnostic ( $p=0,360$ ), însă am constatat diferențe semnificative în ceea ce privește vârsta de debut a primelor simptome ( $p<0,001$ ) și vârsta primei sângerări articulare. La cei cu fenotip sever vârsta de debut a primelor simptome și vârsta primei sângerări articulare au fost semnificativ mai mici decât la cei cu fenotip mediu.

Am încercat să demonstrez existența unei asocieri între statusul articular și prezența coinfecțiilor B, C, HIV. Rezultatele au fost influențate și de lotul mic de pacienți HIV+ și HVB+. Dintre comorbidități, doar prezența hepatitei VHC face diferență semnificativă, în sensul că pacienții infectați VHC au articulații mai afectate decât cei fără infecție (figura 6.1).



**Figura 6.1** Distribuția numărului de articulații țintă în funcție de VHC

Ponderea pacienților cu VHC și cu fenotip sever este semnificativ mai mare (78,4%) decât cea a pacienților fără VHC și cu fenotip sever (54,4%) ( $\chi^2=13,012; df=1; p<0,001; Cramer's V=0,254$ ).

Utilizând testul chi-patrat am putut să demonstrez că intervențiilor ortopedice se întâlnesc cu o pondere mai mare a la pacienții cu fenotip sever (41,9%), comparativ cu pacienții cu fenotip mediu care au intervenții ortopedice în proporție de 21,5% ( $\chi^2=7,990$ ;  $df=1$ ;  $p=0,005$ ). În mod similar, vârsta tardivă de debut a profilaxiei a avut un impact negativ asupra statusului articular, acești pacienți necesitând mai frecvent intervenții chirurgicale ortopedice ( $p=0,002$ ).

Intervențiile ortopedice la cei ce au primit profilaxie de la vârsta mai mică (9-17 și 18-29 ani) sunt reprezentate de sinovectomii (în 3 din 3 cazuri, respectiv 8 din 32), în timp ce la persoanele cu debut tardiv al profilaxiei predomină artroplastii totale (36%) și fracturile (8%) favorizate de osteoporoză.

### **6.3 Concluzii**

1. În lotul aflat în studiu, prevalența HA severe a fost de 89.6% și a HB severe de doar 10.4%. 43.3% din cazurile de hemofilie au fost încadrate ca fiind de novo.
2. În lotul nostru de pacienți, deși deficitul de factor era sever (sub 1%), diagnosticul s-a stabilit tardiv, în medie la 21.58 luni
3. 67.7% din pacienții evaluați prezintă un fenotip sever al bolii, caracterizat printr-un debut mai precoce al sângerărilor, o rată anuală mai ridicată de hemartroze și un număr mai mare de articulații țintă. Această categorie de pacienți ar trebui să beneficieze de un tratament mai intensiv.
4. Profilaxia a fost introdusă tardiv, în medie 33.91 ani (9-68 ani).
5. Peste 30% din pacienții cu vârste peste 60 de ani au suferit cel puțin o intervenție de protezare articulară. Sinovectomia a reprezentat o soluție temporară de reducere a numărului de sângerări pentru ~16% din tinerii cu vârsta între 18 și 35 ani.
6. Infecția cu virus hepatitic C (VHC) se regăsește la ~55% din pacienții înrolați, incidența crescând cu vârsta (ajungând la 95% la cei cu vârsta peste 60 ani). În lotul studiat am observat un efect negativ al coinfectiei VHC asupra statusului articular (o rată mai mare de sângerări și un număr mai mare de articulații afectate).



## **Capitolul 7 - Studiul 2: Analiza factorilor de risc biologici în hemofilie – utilitatea farmacocineticii în personalizarea terapiei**

Terapia profilactică cu concentrate de factor VIII sau IX reprezintă standardul de tratament în hemofilia A și B severă (FVIII<1%) sau medie cu fenotip sever al sângerărilor. Are ca obiectiv menținerea unui nivel al factorului suficient de ridicat astfel încât să se prevină sângerările. O serie de factori pot influența doza și frecvența administrării factorului. Dintre aceștia menționăm: profilul farmacocinetic, fenotipul sângerării, statusul articular, nivelul activității fizice, aderența la tratament, abordul venos și tipul de preparat de factor utilizat (SHL sau EHL).

### **7.1. Obiective**

- Aplicarea analizei farmacocinetice în individualizarea regimului profilactic
- Demonstrarea beneficiilor terapiei personalizate utilizând analiza farmacocinetică

### **7.2. Materiale și metodă**

Am desfășurat un studiu prospectiv, observațional, de tip intervențional. Au fost incluși 30 de pacienți adulți cu hemofilia A severă (Fact VIII<1%) din evidența Institutului Clinic Fundeni, aflați anterior într-un regim profilactic standard (doza/kgc) și la care a fost necesară personalizarea terapiei profilactice. Pacienții au fost urmăriți între 2019-2023, cu un follow-up de minim 1 an și maxim 4 ani.

#### **7.2.1. Parametri investigați**

Datele au fost extrase din fișele de observație ale pacienților, baza de date electronică a spitalului, jurnalele pacienților și anamneza.

S-au urmarit următorii parametri:

- rata anuală de sângerare articulară (AjBR) înainte și la 1 an după personalizarea terapiei;
- analiza farmacocinetică și trough level în timpul ambelor scheme de tratament;
- numărul pacienților ce au atins „zero sângerări” cu ambele scheme de tratament.

### 7.2.2. Metoda de lucru

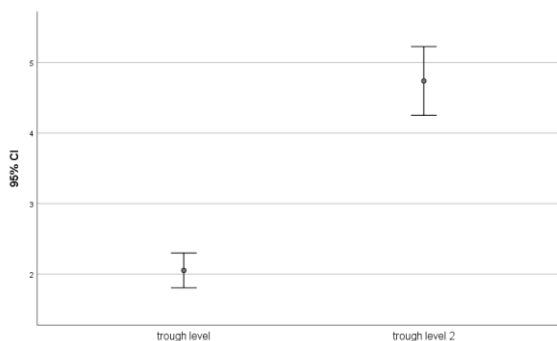
S-au utilizat teste one-stage sau cromogenice, conform specificațiilor din prospectul medicațiilor utilizate.

Pentru produsele standard FVIII am prelevat probe de sânge (în eprubete cu citrat de sodiu) înainte de administrarea factorului, la 1 oră, 24 ore și 48 ore (înainte de următoarea administrare- nivelul prag), iar pentru FIX au fost necesare 2 probe la interval de 24 ore (în intervalele 24-36 ore și 48-60 ore după injectare). Pentru produsele cu timp de înjumătățire prelungit (EHL) de FVIII am mai adăugat o probă recoltată la 60-84 ore, iar pentru FIX o probă la 5-12 zile. Curbele de farmacocinetica s-au realizat cu ajutorul programelor online: Wapps-hemo, myPKfit®.

### 7.3. Rezultate

Principalul motiv de personalizare a terapiei profilactice a fost necesitatea asigurării unei protecții sporite împotriva sângerărilor (73.3% din cazuri, 22/30). La 16.7% din pacienți (5/30) s-a modificat schema terapeutică datorită abordului venos foarte dificil; la 6.7% (2 din 30) aderența joasă la administrările de 3 ori/săptămână a impus ajustarea frecvenței de administrare.

Am observat că terapia personalizată asigură un nivel prag (trough level) semnificativ mai ridicat (4.7) comparativ cu schema anterioară (2.1) (figura 7.1).

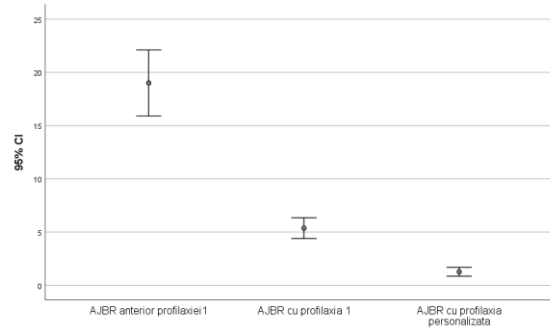


**Figura 7.1** Nivelul prag minim (trough level) asigurat de profilaxia standard vs profilaxia personalizată

Dacă evaluăm comparativ profilaxia cu produse EHL și cea cu rFVIII putem vedea că media trough level e mai mare la cei trecuți pe EHL (5.1) decât pe rFVIII (3.9), chiar dacă administrarea e mai rară.

Diferențele sunt semnificative și în ceea ce privește rata anuală de sângerare articulară. Aceasta a scăzut de la o maximă de 19.0 (în regimul on demand), la 5.4 (sub

profilaxia standard) și atinge minimumul sub regimul personalizat de profilaxie (1.3) (figura 7.2).



**Figura 7.2** Compararea AjBR între regimurile de tratament

Un alt aspect important pe care l-am demonstrat a fost eficacitatea superioară a profilaxiei personalizate în prevenirea sângerărilor, 26.7% din pacienții cărora li s-a modificat schema de tratament au atins obiectivul ”zero sângerări” (vs 0% in profilaxia standard).

#### 7.4. Concluzii

1. în lotul nostru de pacienți înrolați, 73.3% necesitau o protecție sporită (deci un nivel prag mai ridicat), iar 16.7% aveau un abord venos foarte dificil;
2. prin terapia personalizată am obținut un trough level mai ridicat (4.7%) comparativ cu terapia profilactică anterioară (2.1%);
3. terapia cu EHL asigură un nivel prag mai ridicat (5.1%) decât SHL (3.9%), chiar la administrări mai rare;
4. rata de sângerare articulară a scăzut de la o medie de 19 (anterior oricărui regim de profilaxie) la 5.4 după introducerea profilaxiei standard și a atins un minim de 1.3 cu ajutorul terapiei personalizate;
5. 26.7% din pacienții aflați în tratament personalizat au atins obiectivul „zero sângerări”.

## **Capitolul 8 - Studiul 3: Analiza factorilor de risc moleculari in hemofilia A**

Acest studiu a avut drept obiectiv principal evaluarea prevalenței inversiunilor Int22 și Int1 în lotul studiat și compararea datelor cu cele din literatură. Obiectivul secundar a fost de a evalua impactul acestor inversiuni asupra fenotipului clinic și a dezvoltării inhibitorilor.

### **8.1. Materiale și metodă**

Am efectuat un studiu transversal, cross-secțional, observațional în care au fost incluși un număr de 180 de adulți cu hemofilie A severă din evidența Clinicii de Hematologie a Institutului Clinic Fundeni. Din aceștia, 162 au fost testați genetic pentru Inv22 și Inv1. Pentru evaluarea prevalenței inversiunilor, au fost excluși 24 de pacienți înrudiți, lotul analizat totalizând un număr de 138 de pacienți neînrușiți cu HA severă.

#### **8.1.1. Parametri analizați**

Datele au fost extrase din fișele de internare, baza de date electronică a spitalului, anamneza și documentația pacienților. Rezultatele testării moleculare au fost furnizate de către Laboratorul de Biologie Moleculară al Institutului Clinic Fundeni.

Parametri evaluați: fenotipul sângerării, numărul de articulații țintă, vârsta la debutul simptomelor, vârsta primei sângerări articulare, vârsta la diagnostic și tipul mutației genetice.

#### **8.1.2. Metoda de lucru**

De la fiecare pacient s-a colectat sânge periferic în 3 vacutainere cu EDTA. Probele s-au prelucrat în cadrul departamentului de Biologie Moleculară al Institutului Clinic Fundeni.

După izolarea ADN-ului din sângele și verificarea calitativă și cantitativă a ADN-ului extras s-a utilizat analiza de Inverse Shifting-PCR (IS-PCR) și protocolul descris de Rossetti et al. [42]. Următorii pași au fost digestia ADN-ului genomic și inactivarea enzimatică cu obținerea de ADN circular [15]. Pentru fiecare pacient s-au efectuat 3 reacții de polimerizare utilizând ADN-ul circular, 2 reacții pentru Inv22 (diagnostic și test complementar) și o reacție pentru Inv1 [15]. Producții de amplificare

au fost analizați prin Electroforeza pe gel de agaroză 2% și vizualizați cu bromură de etidiu sub lampă cu UV [15].

## 8.2. Rezultate

### 8.2.1 Analiza prevalenței inversiunilor Int22 și Int1 în hemofilia A severă

A fost identificată prezența Inv22 în 66 din cei 138 de pacienți neînrușiți cu HA severă (47.83%): 51 din pacienți cu inversiunea distală Inv22 tip I (36.9% din total, 77.27% din cei cu Inv 22) și 15 cu inversiunea proximală (10.8% din total, 22.73% din cei cu Inv22). Inv1 a fost detectată la 7 pacienți neînrușiți cu HA severă (5.07%). În total 73 pacienți (52.9%) au fost depistați cu inversiunile 22 și 1 (tabel VIII.1).

**Tabel VIII.1** Prevalența Inv22 și Inv1 în lotul studiat

	N (%)
Inv Int22	66 (47.83%)
Inv Int22 tip I	51 (77.27%)
Inv Int22 tip II	15 (22.73%)
Inv Int1	7 (5.07%)

Datele sunt concordante cu literatura și rezultatele studiilor ce indică o frecvență a Inv22 și Inv1 de 40-50% și respectiv 2-5% în rândul persoanelor cu hemofilie A severă [15, 43-44]. Am comparat rezultatele noastre cu raportările altor studii derulate în Europa de Est, procentele fiind asemănătoare (tabel VIII.2).

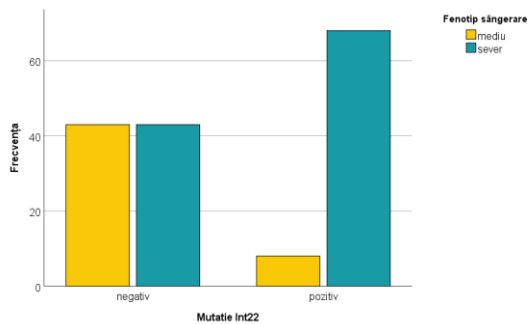
**Tabel VIII.2** Frecvența Inv22 și Inv1 în rândul pacienților cu HA severă din Europa de Est

Țară	Număr pacienți testați pentru Inv22	Inv22	Inv22 I	Inv22 II	Număr pacienți testați pentru Inv1	Inv1
Ungaria [45]	104	54 (52%)	43 (80%)	11 (20%)	NA	NA
Ungaria [46]	34	20(58.8%)	16 (80%)	3 (15%)	NA	NA
România [15]	156	65 (41.7%)	56 (86.2%)	9 (13.8%)	156	5 (3.2%)
<b>România</b>	<b>138</b>	<b>66 (47.8%)</b>	<b>51 (77.3%)</b>	<b>15 (22.7%)</b>	<b>137</b>	<b>7 (5.07%)</b>
Serbia [47]	50	21 (42%)	17 (81.8%)	4 (18.2%)	50	3 (6%)
Polonia [48]	113	57 (50.5%)	47 (82.5%)	10 (17.5%)	NA	NA
Cehia [49]	162	71 (44%)	NA	NA	162	7 (4.3%)

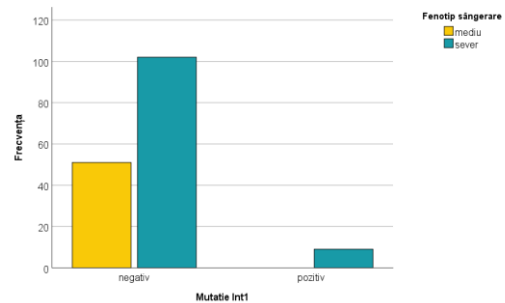
### 8.2.2. Analiza impactului inversiunilor Int22 și Int1 asupra fenotipului sângerării și al dezvoltării inhibitorilor

Am comparat vârsta la debutul simptomelor, vârsta la prima sângerare articulară și vârsta la diagnostic la pacienții cu Inv22 pozitivă și cei cu Inv22 negativă. Diferențele sunt semnificative pentru toate cele trei cazuri. Pentru vârsta la debut simptome:  $t(146)=8.86$ ,  $p<0.0001$ , astfel că vârsta la debut simptome este semnificativ mai mică la cei cu Inv22+. De asemenea, pacienții cu Inv22+ au o vârstă a primei sângerări articulare și a diagnosticului mai mici decât cei Inv22-.

Pentru a testa relația dintre fenotipul de sângerare și mutația Inv1 sau Inv22, am utilizat testul chi-pătrat. Am constatat că pacienții cu mutație Inv22 sau Inv1 pozitivă au într-o pondere semnificativ mai ridicată (89.5%, respectiv 100%) fenotip sever comparativ cu cei cu mutație Inv22 sau Inv1 negativă (50%, respectiv 66.7%) ( $\chi^2=29,144$ ;  $df=1$ ;  $p<0,001$ , respectiv  $\chi^2=4,378$ ;  $df=1$ ;  $p=0,036$ ) (figura 8.1 și 8.2).



**Figura 8.1** Fenotipul sângerării în funcție de statusul mutației Inv22



**Figura 8.2** Fenotipul sângerării în funcție de statusul mutației Inv1

Am comparat pacienții Inv22+, Inv1+ cu cei cu ambele inversiuni negative din punct de vedere a numărului de articulații țintă și am observat o diferență semnificativă între cele 3 loturi, mutațiile Inv22 și Inv1 asociindu-se cu un număr mediu mai mare de articulații țintă decât cei negativi la ambele mutații. Intervalele de încredere se suprapun, dar când ținem cont de faptul că sunt legate categoriile, în ANOVA, diferența devine semnificativă:  $F(2, 159)=3.345$ ,  $p=.038<.05$ .

Comparând ratele anuale medii de sângerare articulară la pacienții Inv22+și Inv1+ cu cei cu negativi am observat că cei pozitivi pentru Inv22 și Inv1 au AjBR mult mai mare înainte de profilaxie decât cei negativi (20.37 vs 14.93, respectiv 20.89 vs 17.28), iar după profilaxie toți au AjBR mult mai mică și, în plus, nu mai sunt diferențe între pozitiv și negativ în cazul Inv22 (4.75 vs 4.37).

În lotul de 11 pacienți cu hemofilie A și inhibitori am observat că 54.54% (6 din 11) din inhibitori au fost depistați în contextul pierderii eficacității terapiei cu factor, 27.27% (3 din 11) din cazurile de inhibitori au fost diagnosticate la monitorizarea anuală de rutină, iar 18.18% (2 din 11) au fost depistate în contextul evaluării perioperatorii.

Consecutiv am evaluat posibilități factori asociați dezvoltării inhibitorilor la acești pacienți. Mutațiile genetice Inv22 și Inv1 se regăsesc la 81.81% (9/11) din pacienții care au inhibitori, subliniind impactul factorului genetic în dezvoltarea inhibitorilor. 4 din 11 pacienți (36.36%) prezentau antecedente colaterale de inhibitori sau aveau mai puțin de 50 zile de expunere. 3 pacienți (27.27%) au dezvoltat inhibitori după doze intensive de factor (în context operator sau de sângerare majoră), iar 2 din 11 (18.18%) pacienți prezentau concomitent o infecție activă la momentul diagnosticării.

### **8.3. Concluzii**

1. Prevalența inversiunilor în lotul de pacienți studiat a fost de 47.82% pentru Inv22 și 5.07% pentru Inv1. Datele sunt concordante cu literatura și rezultatele studiilor ce indică o frecvență a Inv22 și Inv1 de 40-50% și respectiv 2-5% în rândul persoanelor cu hemofilie A severă [15, 43-44];

2. Pacienții ce prezintă Inv22 sau Inv1 au vârsta mai mică la debut, la prima sângerare articulară și la diagnostic decât persoanele fără aceste mutații, diferența fiind semnificativă statistic ( $p < 0.05$ ). De asemenea cei pozitivi au un fenotip mai sever al sângerărilor, un număr de articulații țintă mai mare (cei mai afectați fiind cei cu Inv22+) și o rată anuală medie de sângerare articulară mai ridicată decât cei negativi. Nu s-au evidențiat diferențe semnificative ( $p = 0,839$ ) între fenotipul pacienților cu Inv22+ și cei cu Inv1+, cele două mutații având impact asemănător asupra fenotipului, ambele fiind mutații tip null;

3. Puțin peste jumătate din pacienți (54.54%) au fost testați de inhibitori datorită raportării pierderii eficienței terapiei substitutive, 27.27% au ieșit pozitivi la testarea anuală de rutină, iar ~18% au fost depistați în cursul evaluării preoperatorii;

4. Mutația genetică a reprezentat factorul major de risc în dezvoltarea inhibitorilor (în 81.81% cazuri);

5. Rezultatele studiului subliniază necesitatea testării genetice în hemofilie (de preferat din momentul stabilirii diagnosticului) și rolul acesteia în stabilirea fenotipului sângerării, în abordarea terapeutică (tipul de produs utilizat, intensitatea tratamentului) și monitorizarea atentă a pacientului cu risc de inhibitori.

## **Capitolul 9 - Studiul 4: Evaluarea impactului hemofiliei și a comorbiditatilor asupra funcționalității, activității și calității vieții**

Acest studiu a avut ca scop evaluarea pacienților cu hemofilie severă utilizând chestionarele HAL, FISH și EQ-5D-5L și analiza impactului bolii, a comorbidităților și tratamentului asupra acestora. Această cercetare pornește de la necesitatea introducerii de noi instrumente în evaluarea persoanelor cu hemofilie nu doar din punct de vedere al bolii și al structurii, dar și al funcționalității, activității și participării.

### **9.1. Materiale și metode**

Am efectuat un studiu prospectiv, de tip observațional, de cohortă (pentru analiza în dinamică a HAL și FISH) concomitent cu un studiu transversal, cross-section, observațional (pentru evaluarea calității vieții). Au fost incluși în studiu pacienți adulți diagnosticați cu hemofilie severă aflați în evidența Institutului Clinic Fundeni. Aceștia au fost urmăriți în perioada 2019-2023.

#### **9.1.1 Parametri investigați**

Datele au fost extrase din fișele de internare, baza de date electronică a spitalului, anamneza și documentația pacienților. S-au completat chestionarele HAL (Hemophilia Activity List), FISH (Functional Independence Score in Hemophilia) și EQ-5D-5L.

Datele colectate au fost: tipul de hemofilie, vârsta la momentul înrolării, vârsta la debutul profilaxiei, fenotipul sângerării, tipul profilaxiei (intermitentă/continuă/absentă), status virusologic (VHC, VHB, HIV), număr articulații afectate, rezultatele



chestionarelor administrate la interval de 4 ani (HAL si FISH) și a chestionarului de calitate a vieții (EQ-5D-5L).

### 9.1.2. Metoda de lucru

Chestionarele HAL și FISH au fost completate de pacienți la interval de 4 ani, pentru a se evalua eventualele modificările sub profilaxie; testul FISH nu s-a administrat pacienților ce aveau o sângerare articulară acută sau în ultimele 2 săptămâni.

### 9.2. Rezultate

Din analiza rezultatelor chestionarelor **HAL** am observat următoarele aspecte:

➤ cele mai bune rezultate s-au obținut la activitățile membrelor superioare UPPER (63.98), urmate de activitățile de bază ale picioarelor LOWBAS (47.64), cel mai scăzut punctaj înregistrându-se la activitățile complexe ale membrelor inferioare LOWCOM (30.66).

➤ la 4 ani se observă o ameliorare a rezultatelor, atât a scorurilor normalizate pe toate activitățile (valori în creștere, deci funcționalitate îmbunătățită), cât și a scorului total (în scădere de la 137.34 la 116.4). UPPER rămâne în continuare cu cel mai bun punctaj din domeniile compuse, în timp ce LOWCOM rămâne cu scorurile cele mai mici.

Din analiza rezultatelor chestionarelor **FISH** am observat următoarele aspecte:

➤ cele mai afectate sunt domeniile C8 (**alergatul**), B5 (**statul în genunchi**), C7 (**urcatul scărilor**) și C6 (**mersul**), ele având valorile medii cele mai mici ale scorurilor. Alergatul (C8) și statul în genunchi (B5) au fost singurele activități imposibile de efectuat de unii pacienți;

➤ la 4 ani cele mai afectate au rămas în continuare domeniile B5, C8 și C7. Domeniile B5 și C8 rămân în continuare imposibile pentru unii pacienți, într-un procent ușor diminuat.

Din analiza rezultatelor chestionarelor **EQ-5D-5L** am observat următoarele aspecte:

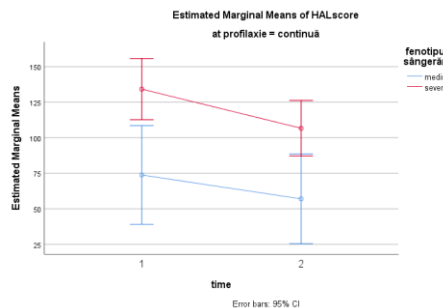
➤ procentul de pacienți cu probleme severe: 16.5% durere, 13.9% mobilitate, 8.9% activitate, 1.3% autoîngrijire, 1.3% anxietate;;

➤ scorul mediu pentru *EQ-VAS* a avut valoarea de 77.85 (SD±14.77), cu un minim de 35 și un maxim de 100. Pacienții cu vârste 18-24 ani au scoruri comparabile cu populația generală (91.82 vs 90.6), după vârsta de 25 ani scorurile încep să scadă progresiv comparativ cu populația generală, diferența fiind semnificativă după 35 ani.

Pentru demonstrarea corelațiilor între rezultatele HAL, FISH și EQ-5D-5L (*EQ-VAS*) și vârsta de debut a profilaxiei, tipul profilaxiei, prezența infecțiilor virale și fenotipul sângerărilor am efectuat o analiză multivariată și am utilizat T-test. Am observat că au obținut valori semnificativ mai mari pacienții cu:

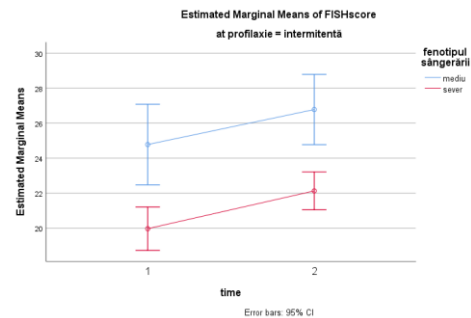
- fenotip mediu (față de sever) (figura 9.1, figura 9.2)
- profilaxie continuă (față de intermitentă)
- nu au VHC (față de cei ce au VHC)

Se observă de asemenea că, profilaxia, indiferent dacă este continuă sau intermitentă, are beneficii care sunt demonstrate prin scoruri îmbunătățite, deci funcționalitate articulară ameliorată.



**Figura 9.1** Scorul HAL 2019-2023

în funcție de fenotipul sângerării



**Figura 9.2** Scorul FISH 2019-2023

în funcție de fenotipul sângerării

### 9.3. Concluzii

1. În lotul nostru de pacienți, atât chestionarul HAL cât și FISH au decelat probleme semnificativ mai mari în gradul de funcționalitate și activitate la nivelul membrelor inferioare;

2. Hemofilicii care au primit profilaxie continuă (52 săptămâni/an) au obținut

scoruri semnificativ mai bune la chestionarele HAL și FISH decât cei aflați în profilaxie intermitentă (maxim 45 săptămâni/an), atât în 2019 cât și în 2023.

3. Prezența infecției VHC s-a dovedit a avea o influență negativă asupra activității și funcționalității, dar și asupra calității vieții pacienților hemofilici;

4. Comparativ cu populația generală, pacienții hemofilici au obținut scoruri mai mici la chestionarul EQ-VAS, diferențele începând să fie semnificative după 35 ani.

## **Capitolul 10: Contribuții originale**

Această lucrare doctorală reprezintă cel mai extensiv studiu asupra hemofiliei din România, cu o cohortă de 201 pacienți și o analiză simultană a parametrilor clinici, biologici și moleculari.

Scopul acestei teze este de a furniza informații utile și practice despre populația generală cu hemofilie A și B severă, necesare în managementul optim al acestor pacienți. Cele patru studii prezentate au avut ca obiective identificarea factorilor ce influențează evoluția clinică în hemofilie și înțelegerea aprofundată a impactului lor asupra abordării terapeutice.

Toate cele patru studii și-au atins obiectivele, prin rezultatele lor, ele contribuind la o mai bună înțelegere a:

1. stratificării pacienților în funcție de fenotipul sângerării (nu doar pe baza nivelului de factor) și individualizarea terapiilor în funcție de categoria de risc;

2. utilității testelor de farmacocinetică în monitorizarea și personalizarea regimurilor profilactice astfel încât acestea să satisfacă nevoile pacientului și să atingă obiectivul de “zero sângerări”

3. necesității implementării testării moleculare în hemofilie în România, în scopul confirmării diagnosticului, stabilirea relației genotip-fenotip, prezicerea riscului de inhibitori și a răspunsului la terapia de inducere a toleranței imune;

4. gestionării pacientului vârstnic cu hemofilie și a necesității abordării multidisciplinare a comorbidităților și complicațiilor survenite la această categorie de pacienți

5. utilității chestionarelor HAL și FISH în monitorizarea gradului de afectare articulară, a impactului fenotipului bolii, a regimului profilactic și a infecțiilor virale asupra gradului de activitate și funcționalitate în hemofilie.

### **Perspective de Viitor**

1. Analiza completă genotip-fenotip utilizând și rezultatele testelor de secvențiere ale genelor F8 și F9 (restul de aproape 50% din populația de hemofilii severe);

2. Cercetarea altor factori ce pot influența fenotipul sângerării: mutații trombofilie, Proteina C, Proteina S, antitrombina III;

3. Evaluarea fenotipului sângerării utilizând Testul de generare a trombinei (TGT), analiză utilă în aprecierea riscului hemoragic, în diferențierea fenotipurilor de sângerare (atât la pacienții cu inhibitori cât și la cei fără).

### **Bibliografie selectivă**

1. Berntorp E, Fischer K, Hart DP, Mancuso ME, Stephensen D, Shapiro AD, et al. Haemophilia. Nat Rev Dis Primers. 2021 Jun 24;7(1):45. doi: 10.1038/s41572-021-00278-x. PMID: 34168126

2. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Treatment Guidelines Working Group on Behalf of The World Federation Of Hemophilia. Guidelines for the management of hemophilia. Haemophilia. 2013 Jan;19(1):e1-47. doi: 10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x. Epub 2012 Jul 6. PMID: 22776238.

3. Pavlova A, Oldenburg J. Defining severity of hemophilia: more than factor levels. Semin Thromb Hemost. 2013 Oct;39(7):702-10. doi: 10.1055/s-0033-1354426. Epub 2013 Sep 11. PMID: 24026911

4. Napolitano M, Kessler CM, Hemophilia A and Hemophilia B, Consultative Hemostasis and Thrombosis (Fourth Edition), Elsevier, 2019, Pages 39-58, ISBN 9780323462020, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46202-0.00003-0>.

5. Pezeshkpoor B, Oldenburg J, Pavlova A. Insights into the Molecular Genetic of Hemophilia A and Hemophilia B: The Relevance of Genetic Testing in Routine Clinical Practice. *Hamostaseologie*. 2022 Dec;42(6):390-399. doi: 10.1055/a-1945-9429. Epub 2022 Dec 22. PMID: 36549291; PMCID: PMC9779947.
6. Karim, Md Anwarul & Jamal, Chao. (2013). A Review on Hemophilia in Children. *Bangladesh Journal of Child Health*. 37. 10.3329/bjch.v37i1.15349.
7. Franchini M, Mannucci PM. Past, present and future of hemophilia: a narrative review. *Orphanet J Rare Dis*. 2012 May 2;7:24. doi: 10.1186/1750-1172-7-24. PMID: 22551339; PMCID: PMC3502605.
8. Alcalay M, Deplas A. Rheumatological management of patients with hemophilia. Part II: Muscle hematomas and pseudotumors. *Joint Bone Spine*. 2002 Dec;69(6):556-9. doi: 10.1016/s1297-319x(02)00451-7. PMID: 12537262
9. Stieltjes N, Calvez T, Demiguel V, Torchet MF, Briquel ME, Fressinaud E, et al. Intracranial haemorrhages in French haemophilia patients (1991-2001): clinical presentation, management and prognosis factors for death. *Haemophilia*. 2005 Sep;11(5):452-8. doi: 10.1111/j.1365-2516.2005.01090.x. PMID: 16128887.
10. de Alencar JB, Macedo LC, de Barros MF, Rodrigues C, Cadide RC, Sell AM, et al. Importance of immune response genes in hemophilia A. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35(4):280-6. doi: 10.5581/1516-8484.20130095. PMID: 24106448; PMCID: PMC3789435.
11. Nichols WC, Amano K, Cacheris PM, Figueiredo MS, Michaelides K, Schwaab R, et al. Moderation of hemophilia A phenotype by the factor V R506Q mutation. *Blood*. 1996 Aug 15;88(4):1183-7. PMID: 8695835.
12. Kitchen S, Signer-Romero K, Key NS. Current laboratory practices in the diagnosis and management of haemophilia: a global assessment. *Haemophilia*. 2015 Jul;21(4):550-7. doi: 10.1111/hae.12639. Epub 2015 Feb 16. PMID: 25688866.
13. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia panelists and co-authors.

WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia*. 2020 Aug;26 Suppl 6:1-158. doi: 10.1111/hae.14046. Epub 2020 Aug 3. Erratum in: *Haemophilia*. 2021 Jul;27(4):699. PMID: 32744769.

14. Verbruggen B, van Heerde WL, Laros-van Gorkom BA. Improvements in factor VIII inhibitor detection: From Bethesda to Nijmegen. *Semin Thromb Hemost*. 2009 Nov;35(8):752-9. doi: 10.1055/s-0029-1245107. Epub 2010 Feb 18. PMID: 20169511.

15. **Brinza, M.**; Grigore, A.; Dragomir, M.; Jordan, D.; Jordan, C.; Balanescu, P.; et al. Large Intron Inversions in Romanian Patients with Hemophilia A—First Report. *Medicina* 2023, 59, 1821. <https://doi.org/10.3390/medicina59101821>.)

16. Franchini M, Mannucci PM. Past, present and future of hemophilia: a narrative review. *Orphanet J Rare Dis*. 2012 May 2;7:24. doi: 10.1186/1750-1172-7-24. PMID: 22551339; PMCID: PMC3502605.

17. Marchesini E, Morfini M, Valentino L. Recent Advances in the Treatment of Hemophilia: A Review. *Biologics*. 2021 Jun 15;15:221-235. doi: 10.2147/BTT.S252580. PMID: 34163136; PMCID: PMC8214539.

18. Rangarajan S, Austin S, Goddard NJ, Négrier C, Rodriguez-Merchan EC, Stephensen D, et al. Consensus recommendations for the use of FEIBA(®) in haemophilia A patients with inhibitors undergoing elective orthopaedic and non-orthopaedic surgery. *Haemophilia*. 2013 Mar;19(2):294-303. doi: 10.1111/hae.12028. Epub 2012 Sep 19. PMID: 22989234.

19. **Brinza M**, Uscatescu V, Hemcinschi M, Chiriac E, Gherghe G, Coriu D. Challenges in prophylactic therapy with Emicizumab in patients with hemophilia A: Focus on monitoring tests. *Rev Romana Med Lab*. 2024;32(1):89-96. DOI:10.2478/rrlm-2024-0003

20. Saulyte Trakymiene S, Steen Carlsson K. On-demand treatment in persons with severe haemophilia. *Eur J Haematol Suppl*. 2014 Aug;76:39-47. doi: 10.1111/ejh.12373. PMID: 24957106.

21. Valentino LA. Considerations in individualizing prophylaxis in patients with haemophilia A. *Haemophilia*. 2014 Sep;20(5):607-15. doi: 10.1111/hae.12438. Epub 2014 Apr 8. PMID: 24712891.
22. Lafeber FP, Miossec P, Valentino LA. Physiopathology of haemophilic arthropathy. *Haemophilia*. 2008 Jul;14 Suppl 4:3-9. doi: 10.1111/j.1365-2516.2008.01732.x. PMID: 18494686.
23. Caviglia H, Landro ME, Galatro G, Candela M, Neme D. Epidemiology of fractures in patients with haemophilia. *Injury*. 2015 Oct;46(10):1885-90. doi: 10.1016/j.injury.2015.06.034. Epub 2015 Jul 3. PMID: 26190631.
24. Caviglia H, Candela M, Landro ME, Douglas Price AL, Neme D, Galatro GA. Haemophilia pseudotumours in patients with inhibitors. *Haemophilia*. 2015 Sep;21(5):681-5. doi: 10.1111/hae.12632. Epub 2015 Feb 16. PMID: 25688657.
25. Tabriznia-Tabrizi S, Gholampour M, Mansouritorghabeh H. A close insight to factor VIII inhibitor in the congenital hemophilia A. *Expert Rev Hematol*. 2016 Sep;9(9):903-13. doi: 10.1080/17474086.2016.1208554. Epub 2016 Aug 16. PMID: 27367203.
26. Franchini M, Mannucci PM. Inhibitors of propagation of coagulation (factors VIII, IX and XI): a review of current therapeutic practice. *Br J Clin Pharmacol*. 2011 Oct;72(4):553-62. doi: 10.1111/j.1365-2125.2010.03899.x. PMID: 21204915; PMCID: PMC3195733.
27. Astermark J. Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. *Haemophilia*. 2006 Jul;12 Suppl 3:52-60. doi: 10.1111/j.1365-2516.2006.01261.x. PMID: 16683997.
28. Coppola A, Santoro C, Tagliaferri A, Franchini M, DI Minno G. Understanding inhibitor development in haemophilia A: towards clinical prediction and prevention strategies. *Haemophilia*. 2010 Jan;16 Suppl 1:13-9. doi: 10.1111/j.1365-2516.2009.02175.x. PMID: 20059564.

29. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia*. 2006 Dec;12 Suppl 6:15-22. doi: 10.1111/j.1365-2516.2006.01361.x. PMID: 17123389.

30. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK; MIBS Study Group. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*. 2006 Apr 15;107(8):3167-72. doi: 10.1182/blood-2005-09-3918. Epub 2005 Dec 27. PMID: 16380445.

31. Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, et al. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3739-45. doi: 10.1182/blood-2006-05-024711. Epub 2006 Aug 22. PMID: 16926287.

32. Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert AK; MIBS Study Group. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2007 Feb;5(2):263-5. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02290.x. PMID: 17269936.

33. van den Berg HM, Fischer K, Carcao M, Chambost H, Kenet G, Kurnik K, et al. PedNet Study Group. Timing of inhibitor development in more than 1000 previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood*. 2019 Jul 18;134(3):317-320. doi: 10.1182/blood.2019000658. Epub 2019 Jun 11. PMID: 31186271.

34. Astermark J, Altisent C, Batorova A, Diniz MJ, Gringeri A, Holme PA, et al. European Haemophilia Therapy Standardisation Board. Non-genetic risk factors and the development of inhibitors in haemophilia: a comprehensive review and consensus report. *Haemophilia*. 2010 Sep 1;16(5):747-66. doi: 10.1111/j.1365-2516.2010.02231.x. Epub 2010 Apr 14. PMID: 20398077.

35. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002 Apr 12;296(5566):301-5. doi: 10.1126/science.1071059. PMID: 11951032.



36. Manco-Johnson MJ, Warren BB, Buckner TW, Funk SM, Wang M. Outcome measures in Haemophilia: Beyond ABR (Annualized Bleeding Rate). *Haemophilia*. 2021 Feb;27 Suppl 3:87-95. doi: 10.1111/hae.14099. Epub 2021 Jan 4. PMID: 33398908.

37. Recht M, Konkle BA, Jackson S, Neufeld EJ, Rockwood K, Pipe S. Recognizing the need for personalization of haemophilia patient-reported outcomes in the prophylaxis era. *Haemophilia*. 2016 Nov;22(6):825-832. doi: 10.1111/hae.13066. Epub 2016 Aug 31. PMID: 27581872.

38. Fischer K, Poonnoose P, Dunn AL, Babyn P, Manco-Johnson MJ, David JA, et al. participants of the International Symposium on Outcome Measures in Hemophilic Arthropathy. Choosing outcome assessment tools in haemophilia care and research: a multidisciplinary perspective. *Haemophilia*. 2017 Jan;23(1):11-24. doi: 10.1111/hae.13088. Epub 2016 Sep 15. PMID: 27633342.

39. van Genderen FR, van Meeteren NL, van der Bom JG, Heijnen L, de Kleijn P, van den Berg HM, et al. Functional consequences of haemophilia in adults: the development of the Haemophilia Activities List. *Haemophilia*. 2004 Sep;10(5):565-71. doi: 10.1111/j.1365-2516.2004.01016.x. PMID: 15357785.

40. Poonnoose PM, Manigandan C, Thomas R, Shyamkumar NK, Kavitha ML, Bhattacharji S, et al. Functional Independence Score in Haemophilia: a new performance-based instrument to measure disability. *Haemophilia*. 2005 Nov;11(6):598-602. doi: 10.1111/j.1365-2516.2005.01142.x. PMID: 16236109.

41. Pollmann H, Richter H, Ringkamp H, Jürgens H. When are children diagnosed as having severe haemophilia and when do they start to bleed? A 10-year single-centre PUP study. *Eur J Pediatr*. 1999 Dec;158 Suppl 3:S166-70. doi: 10.1007/pl00014347. PMID: 10650861.

42. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost*. 2008

May;6(5):830-6. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.02926.x. Epub 2008 Feb 12. PMID: 18284600.

43. Schröder J, El-Maarri O, Schwaab R, Müller CR, Oldenburg J. Factor VIII intron-1 inversion: frequency and inhibitor prevalence. *J Thromb Haemost.* 2006 May;4(5):1141-3. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01884.x. PMID: 16689771.

44. Peyvandi F. Carrier detection and prenatal diagnosis of hemophilia in developing countries. *Semin Thromb Hemost.* 2005 Nov;31(5):544-54. doi: 10.1055/s-2005-922226. PMID: 16276463.

45. Andrikovics H, Klein I, Bors A, Nemes L, Marosi A, Váradi A, Tordai A. Analysis of large structural changes of the factor VIII gene, involving intron 1 and 22, in severe hemophilia A. *Haematologica.* 2003 Jul;88(7):778-84. PMID: 12857556.

46. Klein I, Andrikovics H, Bors A, Nemes L, Tordai A, Váradi A. A haemophilia A and B molecular genetic diagnostic programme in Hungary: a highly informative and cost-effective strategy. *Haemophilia.* 2001 May;7(3):306-12. doi: 10.1046/j.1365-2516.2001.00497.x. PMID: 11380636.

47. Ilić, N.; Krstić, A.; Kuzmanović, M.; Mičić, D.; Konstantinidis, N.; Guć-Šćekić, M. Identification of intron 1 and intron 22 inversions of factor VIII gene in Serbian patients with hemophilia A. *Genetika* 2013, 45, 207–216.

48. Sawecka J, Skulimowska J, Windyga J, Lopaciuk S, Kościelak J. Prevalence of the intron 22 inversion of the factor VIII gene and inhibitor development in Polish patients with severe hemophilia A. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2005 Jul-Aug;53(4):352-6. PMID: 16088320.

49. Habart D, Kalabova D, Hrachovinova I, Vorlova Z. Significant prevalence of the intron 1 factor VIII gene inversion among patients with severe hemophilia A in the Czech Republic. *J Thromb Haemost.* 2003 Jun;1(6):1323-4. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.t01-4-00326.x. PMID: 12871342.

## LISTA CU LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

1. Batorova A, Boban A, **Brinza M**, Lissitchkov T, Nemes L, Zupan Preložnik I, Smejkal P, Zozulya N, Windyga J. Expert opinion on current and future prophylaxis therapies aimed at improving protection for people with hemophilia A. *J Med Life*. 2022 Apr;15(4):570-578. doi: 10.25122/jml-2022-0103. PMID: 35646171; PMCID: PMC9126455. Impact factor **3.9**

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9126455/>

2. Dirzu N, Hotea I, Jitaru C, **Brinza M**, Urian L, Peters MC, Gal K, Popescu L, Blag C, Marian M, Pal E, Stanescu M, Cenariu D, Tarniceriu C, Serban M, Dima D, Coriu D, Tomuleasa C. Mobile Health Technology for the Personalized Therapy of Hemophilia. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Aug 10;8:711973. doi: 10.3389/fmed.2021.711973. PMID: 34447770; PMCID: PMC8382969. Impact factor **3.9** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8382969/>

3. Zimta AA, Hotea I, **Brinza M**, Blag C, Iluta S, Constantinescu C, Bashimov A, Marchis-Hund EA, Coudsy A, Muller-Mohnssen L, Dirzu N, Gulei D, Dima D, Serban M, Coriu D, Tomuleasa C. The Possible Non-Mutational Causes of FVIII Deficiency: Non-Coding RNAs and Acquired Hemophilia A. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Apr 15;8:654197. doi: 10.3389/fmed.2021.654197. PMID: 33968959; PMCID: PMC8099106. Impact factor **3.9**

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8099106/>

4. Hotea I, **Brinza M**, Blag C, Zimta AA, Dirzu N, Burzo C, Rus I, Apostu D, Benea H, Marian M, Mester A, Pasca S, Iluta S, Teodorescu P, Jitaru C, Zdrenghia M, Bojan A, Torok-Vistai T, Niculescu R, Tarniceriu C, Dima D, Truica C, Serban M, Tomuleasa C, Coriu D. Current therapeutic approaches in the management of hemophilia-a consensus view by the Romanian Society of Hematology. *Ann Transl Med*. 2021 Jul;9(13):1091. doi: 10.21037/atm-21-747. PMID: 34423003; PMCID: PMC8339806. Impact factor **3.932**

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8339806/>

5. **Melen B**, Uscatescu V, Gheorghe G, Chiriac E, Ciobanu C, Orban H, et al. Thromboelastography in pre-surgery monitoring in Hemophilia A with high inhibitor titer: case report and literature review. *Rev Romana Med Lab.* 2020; 28(2):217-24. DOI:10.2478/rrlm-2020-0021. Factor de impact **0.5** (capitolul 1, pagina 6; capitolul 3, pagina 19; capitolul 8, pagina 85); <https://sciendo.com/it/article/10.2478/rrlm-2020-0021>
6. Vladareanu AM, Marinescu C, Vasile D, Gaman M, Onisai M, Giovani AM, **Brinza M**, Uscatescu V – The subtlety of a rare disorder – acquired Hemophilia B; *Documenta Haematologica.* 2017, vol XXXVII, Nr 3-4: 12-15
7. **Brinza M**, Uscatescu V, Hencinschi M, Chiriac E, Gherghe G, Coriu D. Challenges in prophylactic therapy with Emicizumab in patients with hemophilia A: Focus on monitoring tests. *Rev Romana Med Lab.* 2024;32(1):89-96. DOI:10.2478/rrlm-2024-0003. Factor de impact **0.5** (capitolul 2, pagina 10)  
<https://sciendo.com/it/article/10.2478/rrlm-2024-0003>
8. **Brinza M**, Grigore A, Dragomir M, Jordan D, Jordan C, Balanescu P, Tarniceriu CC, Badulescu OV, Blag C, Tomuleasa C, et al. Large Intron Inversions in Romanian Patients with Hemophilia A—First Report. *Medicina* 2023, 59, 1821. doi: 10.3390/medicina59101821. Factor de impact **3.3** (capitolul 1, pagina 2, 8, capitolul 8); <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10608589/>
9. Grigore A, Dragomir M, Călugăru OT, Jordan D, Jordan C, **Brinza M**, Bălănescu P, Coriu D, Mutational Profile in Romanian Patients with Hemophilia A. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 8366. <https://doi.org/10.3390/ijms25158366>. Factor de impact **4.9**; <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/15/8366>