

# Utjecaj kromogene metode za određivanje aktivnosti koagulacijskog faktora IX na klasifikaciju i liječenje bolesnika s hemofilijom B

---

Rebrek, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:373749>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Dora Rebrek**

**Utjecaj kromogene metode za određivanje  
aktivnosti koagulacijskog faktora IX na  
klasifikaciju i liječenje bolesnika s  
hemofilijom B**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dunje Rogić i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Désirée Coen Herak.

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Dunji Rogić na ukazanom povjerenju i stručnom vodstvu. Od srca zahvaljujem svojoj dragoj komentorici doc. dr. sc. Désirée Coen Herak na iznimnoj susretljivosti, razumijevanju, strpljenju, savjetima i uloženom trudu prilikom izrade ovog rada.*

*Veliko hvala mojoj obitelji, a posebno mojim roditeljima na odricanju, neizmjerne podršci i svemu što su mi pružili. Hvala što ste vjerovali u mene! Bez vas ništa od ovog ne bi bilo moguće. Hvala mojem najdražem na strpljenju, razumijevanju, motivaciji i potpori koju mi pruža. Hvala ti što si mi bio vjetar u leđa tijekom cijelog studiranja!*

*Zahvaljujem mojim kolegama i kolegicama, mojim dragim prijateljima, na svakoj podijeljenoj skripti, međusobnom poticanju, druženjima i svim nezaboravnim trenucima koji su mi uljepšali studentske dane.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Hemofilija B - općenito .....	1
1.2. Klasifikacija hemofilije B.....	2
1.3. Struktura i sinteza FIX .....	3
1.4. Uloga FIX u sustavu zgrušavanja.....	5
1.5. Molekularna osnova i nasljeđivanje hemofilije B .....	6
1.6. Klinička slika bolesnika s hemofilijom B.....	8
1.7. Laboratorijska dijagnostika hemofilije B .....	10
1.7.1. Probirne laboratorijske pretrage .....	11
1.7.2. Određivanje aktivnosti FIX .....	12
1.7.2.1. Koagulacijska metoda .....	12
1.7.2.2. Kromogena metoda .....	13
1.8. Terapijski pristupi u liječenju pacijenata s hemofilijom B.....	14
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	18
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	20
3.1. Ispitanici i uzorci .....	20
3.2. Metode.....	21
3.2.1. Određivanje APTV-a.....	21
3.2.2. Određivanje aktivnosti koagulacijskog faktora IX .....	21
3.2.2.1. Koagulacijska metoda .....	21
3.2.2.2. Kromogena metoda .....	23
3.3. Statistička analiza podataka.....	27
<b>4. REZULTATI</b> .....	28
4.1. Opće karakteristike ispitanika .....	28
4.2. Klasifikacija ispitanika na temelju aktivnosti FIX izmjerenih koagulacijskom metodom u jednom stupnju .....	28
4.3. Demografski i klinički podatci pacijenata s hemofilijom B .....	29
4.4. Usporedba rezultata koagulacijskih pretraga.....	30
4.5. Usporedba određivanja aktivnosti FIX koagulacijskom i kromogenom metodom .....	32
4.6. Klasifikacija ispitanika na temelju aktivnosti FIX izmjerenih kromogenom metodom.....	37
4.6.1. Demografski i klinički podatci .....	38
4.6.2. Usporedba rezultata koagulacijskih pretraga.....	39
4.6.3. Usporedba određivanja aktivnosti FIX koagulacijskom i kromogenom metodom .....	41
4.6.4. Korelacija rezultata APTV-a, FIXkgl i FIXkr s dobi prvog krvarenja.....	42

4.7. Prikaz nepodudarnih rezultata klasifikacije kromogenom metodom i koagulacijskom metodom u jednom stupnju .....	43
4.8. Rezultati ispitanika na nadomjesnoj terapiji.....	44
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>54</b>
<b>7. POPIS KRATICA .....</b>	<b>56</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>58</b>
<b>9. SAŽETAK.....</b>	<b>62</b>
<b>10. SUMMARY.....</b>	<b>63</b>
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

## 1.1. Hemofilija B - općenito

Hemofilija B je nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi uzrokovan manjkom aktivnosti koagulacijskog faktora IX (FIX) uslijed mutacije u genu za FIX. Drugi naziv za hemofiliju B je Christmasova bolest, prema prvom zabilježenom pacijentu s hemofilijom B Stephenu Christmasu iz 1952. godine. U odnosu na hemofiliju A, nasljedni manjak koagulacijskog faktora VIII, hemofilija B je rjeđa bolest s incidencijom 1 na 30 000 muške novorođene djece (odnosno 1 na 60 000 ukupno rođene djece) i na nju otpada otprilike 15-20 % svih slučajeva hemofilije (Shen i sur., 2022). Hemofilija B klinički se očituje ponavljanim, prekomjernim krvarenjima u različite dijelove tijela, čiji intenzitet korelira s ostatnom aktivnosti FIX te se prema kliničkim obilježjima ne može razlikovati od hemofilije A (Iorio i sur., 2019; Labar i sur., 2007).

Najraniji zapisi o hemofiliji datiraju iz 2. stoljeća poslije Krista kada su rabini zabranili dječaku obrezivanje jer su sinovi majčinih sestara umrli uslijed produljenog krvarenja prilikom obrezivanja. Čak je u babilonskom Talmudu zabilježeno da je žena oslobođena obaveze obrezivanja trećeg sina ako su joj prethodna dva sina umrla nakon postupka obrezivanja. Prvi moderni zapisi o hemofiliji zabilježeni su tek 1803. godine kada je američki liječnik Otto opisao hemofiliju kao nasljedni poremećaj krvarenja u kojem oboljevaju jedino muškarci, a prenose ga zdrave žene (Schramm, 2014). Hemofilija se često naziva i „bolešću kraljeva“ ili „kraljevskom bolesti“ zahvaljujući britanskoj kraljici Viktoriji koja je bila nositelj hemofilije i prenijela je mutirani gen svom sinu Leopoldu, koji je umro od cerebralnog krvarenja u 31. godini života, te dvjema kćerima Alice i Beatrice. Njihove su kćeri nositeljice, potom udajom prenijele bolest na španjolsku, njemačku i rusku kraljevsku obitelj (Franchini i Mannucci, 2014; Schramm, 2014). Vjerojatno najpoznatiji slučaj „kraljevske bolesti“ je carević Aleksej, sin ruskog cara Nikole II. Romanova, koji je imao teška krvarenja od djetinjstva. Nakon što su otkriveni posmrtni ostaci ruske carske obitelji Romanov ubijene 1918. godine, napravljena je analiza DNA kojom je potvrđeno da je carević Aleksej patio od teškog oblika hemofilije B, odnosno da je „kraljevska bolest“ koja je potekla od kraljice Viktorije zapravo hemofilija B (Franchini i Mannucci, 2014; Rogaeu i sur., 2009).

## 1.2. Klasifikacija hemofilije B

Karakteristični fenotip hemofilije B je povećana sklonost krvarenju. Težina kliničke slike, odnosno intenzitet i učestalost krvarenja najčešće ovise o stupnju manjka aktivnosti FIX. Međutim, u nekim slučajevima klinički fenotip hemofilije B nije u skladu s klasifikacijom na temelju izmjerene aktivnosti FIX pa tako neki pacijenti koji nose istu mutaciju mogu imati različitu sklonost krvarenju koja varira od blage do teške (Shen i sur., 2022; Srivastava i sur., 2020). S obzirom na to da klinički fenotip u većini slučajeva dobro korelira s izmjerenom aktivnosti FIX, preporuka je Znanstvenog pododbora za FVIII i FIX Međunarodnog društva za trombozu i hemostazu (engl. *International Society on Thrombosis and Haemostasis*, ISTH) da se klasifikacija hemofilije B temelji na izmjerenoj aktivnosti FIX u krvi (Srivastava i sur., 2020; Blanchette i sur., 2014). Normalna aktivnost FIX u krvi iznosi 1,0 kIU/L. Teški oblik hemofilije B definira se aktivnostima FIX  $<0,01$  kIU/L, umjereni oblik aktivnostima u rasponu od 0,01 do 0,05 kIU/L dok je blagi oblik hemofilije B definiran aktivnostima FIX  $>0,05$  do 0,40 kIU/L. Teški oblik, koji predstavlja približno 50% svih slučajeva hemofilije B, karakteriziraju učestala, spontana krvarenja u zglobove, mišićni hematomi te krvarenja nakon manjih ozljeda koja se javljaju od najranijeg djetinjstva. U pacijenata s umjerenim oblikom bolesti (oko 10 % slučajeva hemofilije B) spontana krvarenja su rijetka, a hematomi u mišićima i zglobovima javljaju se sekundarno nakon ozljede ili kirurškog zahvata. Kod blagog oblika bolesti (otprilike 40 % svih slučajeva hemofilije B) nema spontanih krvarenja, međutim javljaju se produljena krvarenja nakon kirurških zahvata i težih ozljeda (Tablica 1.) (Shen i sur., 2022; Key i sur., 2017).

**Tablica 1.** Klasifikacija hemofilije B

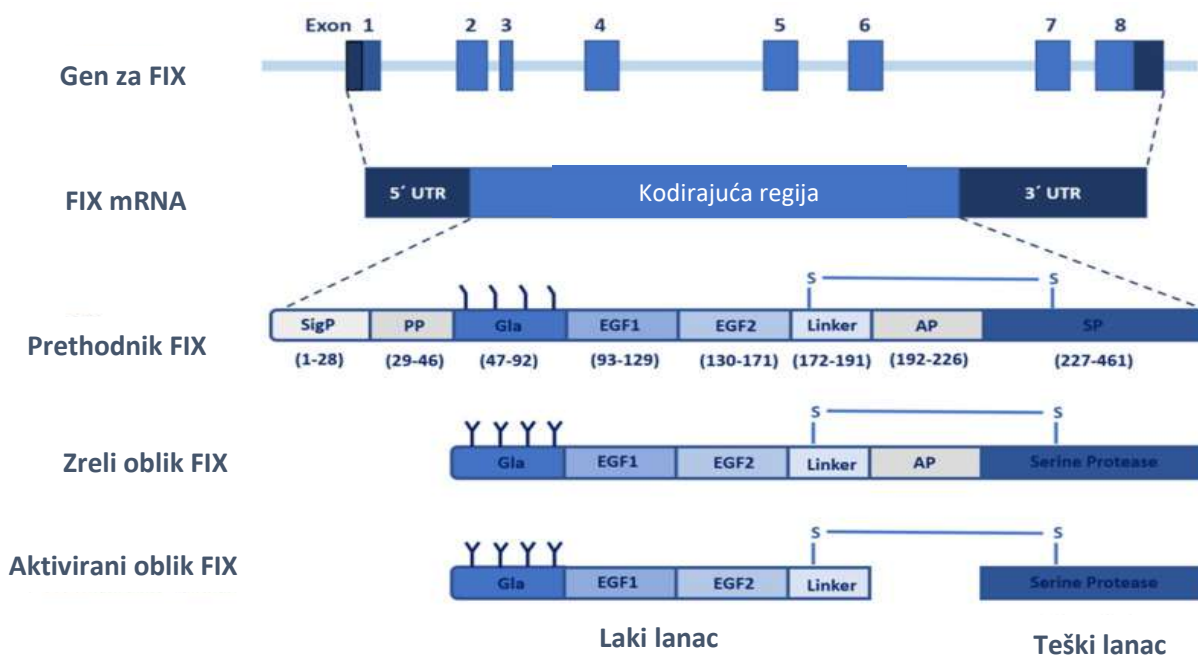
Aktivnost FIX (kIU/L)	Oblik hemofilije B	Klinički pokazatelji
$<0,01$	teški	Spontana krvarenja u zglobove i mišiće; krvarenja nakon manjih ozljeda
0,01 - 0,05	umjereni	Rijetka spontana krvarenja, uglavnom sekundarna krvarenja (ozljeda, kirurški zahvat)
$>0,05 - 0,40$	blagi	Nema spontanih krvarenja, produljena krvarenja nakon težih ozljeda i kirurških zahvata

Prema najnovijim epidemiološkim istraživanjima uočena je velika varijabilnost u prevalenciji ukupnog broja slučajeva, ali i pojedinih oblika hemofilije B u različitim zemljama, prvenstveno ovisno o njihovom socioekonomskom statusu. U slabije razvijenim zemljama, utvrđen je puno manji broj blagih slučajeva hemofilije nego što je to slučaj u razvijenijim zemljama s naprednijom dijagnostikom. Prema najnovijem istraživanju iz 2019. godine procijenjena prevalencija hemofilije B iznosi 3,8 na 100 000 muškaraca dok je prevalencija teškog oblika bolesti 1,1 na 100 000 muškaraca. Udio novodijagnosticiranih slučajeva hemofilije B u razdoblju od 1991. do 2015. godine je 5,0 na 100 000 muške novorođenčadi, pri čemu je udio teškog oblika hemofilije B 1,5 na 100 000 muške novorođenčadi. Uzevši u obzir prevalenciju hemofilije A i hemofilije B te trenutnu svjetsku populaciju od 7,8 milijardi stanovnika od čega je 3,9 milijarde muškaraca, očekivani broj pacijenata s hemofilijom je 818 928, od kojih je 278 200 očekivano s teškim oblikom bolesti. Međutim, prema podacima iz izvještaja Godišnje globalne ankete (engl. *Annual Global Survey*) Svjetskog udruženja hemofilije (engl. *World Federation of Hemophilia*, WFH) iz 2021. godine u svijetu je zabilježeno 233 577 slučajeva hemofilije, od čega je 37 998 slučajeva hemofilije B (<https://wfh.org/>; Iorio i sur., 2019).

### 1.3. Struktura i sinteza FIX

FIX, poznatiji kao Christmasov faktor, je glikoprotein molekularne mase 57 kDa koji se ubraja u skupinu koagulacijskih faktora ovisnih o vitaminu K, a sintetizira se u jetri kao prethodnik FIX (Slika 1.). Jednolančani prethodnik FIX sastoji se od signalnog peptida, propeptida, domene Gla, dvije domene slične epidermalnom faktoru rasta (EGF), aktivacijskog peptida te katalitičke domene SP sa serinsko-proteaznom aktivnošću. Prije izlučivanja iz hepatocita u cirkulaciju, prethodnik FIX podliježe višestrukim post-translacijskim modifikacijama koje uključuju otcijepljivanje signalnog peptida i propeptidnog slijeda, djelomičnu  $\beta$ -hidroksilaciju, N-vezanu i O-vezanu glikozilaciju, sulfataciju i fosforilaciju. Najvažnija post-translacijska modifikacija za funkciju FIX je  $\gamma$ -karboksilacija 12 glutamatnih ostataka domene Gla koju katalizira enzim gama-glutamil karboksilaza čija je aktivnost ovisna o vitaminu K (Shen i sur., 2022; Labar i sur., 2007; Horava i Peppas, 2017; Larson i High, 1992).





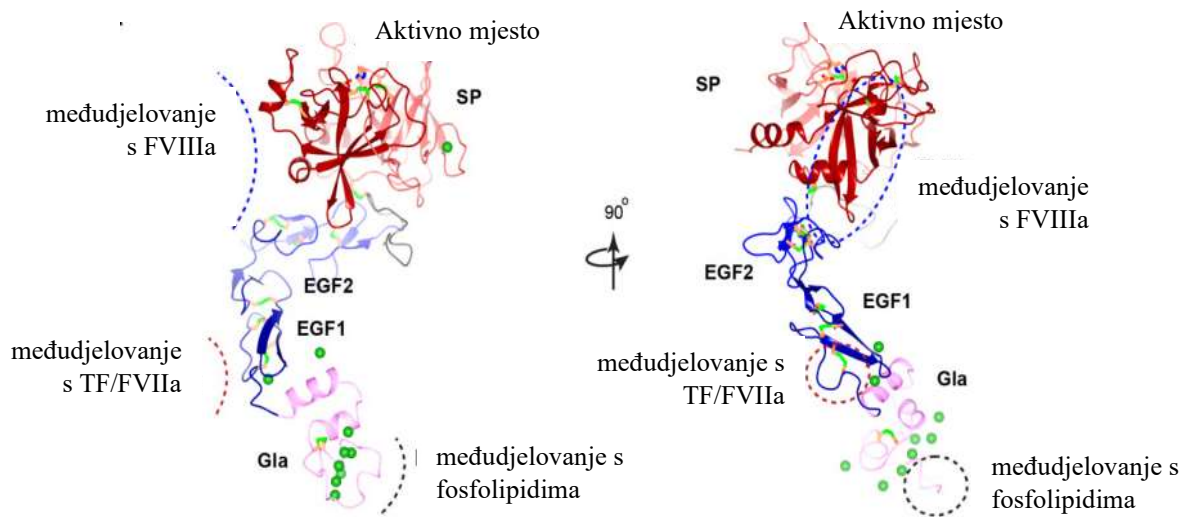
**Slika 1.** Shematski prikaz strukture gena za FIX i sinteze proteina FIX (preuzeto i prilagođeno prema Shen i sur., (2020))

Domena Gla prisutna je kod svih faktora ovisnih o vitaminu K i nužna je za njihovu optimalnu funkciju, a  $\gamma$ -karboksilacija glutamatnih ostataka omogućuje vezanje kalcijevih iona koji potiču konformacijsku promjenu domene Gla omogućujući enzimsku aktivnost i vezanje FIXa na fosfolipidne membrane. Osim vezanja na membrane, domena Gla FIX bitna je i za vezanje tkivnog faktora (TF) u kompleksu FIX/TF/FVIIa koji aktivira FIX (Shen i sur., 2022; Horava i Peppas, 2017).

FIX sadrži dvije domene EGF, a to su EGF1 i EGF2. Domena EGF1 sudjeluje u aktivaciji FIX međudjelovanjem s FXIa, odnosno kompleksom TF i FVIIa. Također je uz domenu Gla važna za vezanje TF u ternarnom kompleksu FIX/TF/FVIIa te međudjelovanju FIXa s kofaktorom FVIIIa. Također, odvaja domenu Gla od domena EGF2 i SP omogućujući međudjelovanje FIXa i FVIIIa s FX. Domena EGF2 aktiviranog FIX ključna je za vezanje FIXa za fosfolipidne membrane aktiviranih trombocita te nastajanje kompleksa FIXa/FVIIIa, poznatog još kao tenazni kompleks (Shen i sur., 2022).

Domena SP je katalitička domena FIX koja se sastoji od dvije poddomene koje pridonose stvaranju katalitičke trijade His267, Asp315 i Ser411 (Shen i sur., 2022). FIX se s obzirom na to da sadrži serin u svom aktivnom mjestu, ubraja u obitelj enzima serinskih proteaza (Larson i High, 1992). Domena SP je važna za vezanje na domene A2 i A3 FVIIIa čime se ostvaruje potpuna enzimsku aktivnost FIXa. Osim toga, domena SP sadrži višestruka vezna mjesta,

uključujući vezno mjesto za FX, heparin te visoko afinitetni  $\text{Ca}^{2+}$  (Shen i sur., 2022). Prikaz strukture i važnih mjesta međudjelovanja FIX s ostalim čimbenicima zgrušavanja prikazan je na Slici 2.



**Slika 2.** Prikaz strukture i važnih mjesta međudjelovanja FIX s ostalim faktorima (preuzeto i prilagođeno prema Shen i sur.,(2020))

#### 1.4. Uloga FIX u sustavu zgrušavanja

Glavna uloga sustava zgrušavanja je stvaranje stabilnog fibrinskog ugruška kao rezultat niza složenih kaskadnih enzimskih reakcija u kojima je FIX jedan od važnijih faktora unutarnjeg puta zgrušavanja (Labar i sur., 2007). Relativno je niska koncentracija FIX (2,5-5 mg/L) prisutna u plazmi i to u inaktivnom zimogenom obliku (Horava i Peppas, 2017; Larson i High, 1992). U koagulacijskoj kaskadi, inaktivni zimogeni oblik FIX aktivira se u FIXa dvostrukim proteolitičkim cijepanjem između Arg191-Ala192 i Arg226-Val227 pri čemu se otpušta aktivacijski peptid molekularne mase 11 kDa. Proteolitičko cijepanje odvija se u prisutnosti  $\text{Ca}^{2+}$  djelovanjem FVIIa preko puta TF i proteaze unutarnjeg puta, aktiviranog oblika FXI (FXIa) (Xu i sur., 2023; Shen i sur., 2022; Horava i Peppas, 2017; Larson i High, 1992.) Otpuštanjem aktivacijskog peptida nastaje aktivirani oblik FIX (FIXa) koji sadrži laki i teški lanac međusobno povezanih disulfidnim mostom (Shen i sur., 2022; Larson i High, 1992). Teški lanac sastoji se od domene SP dok se na lakom lancu nalaze dvije domene EGF i domena Gla. Potpunu enzimsku aktivnost, FIXa postiže stvaranjem tenaznog kompleksa s kofaktorom

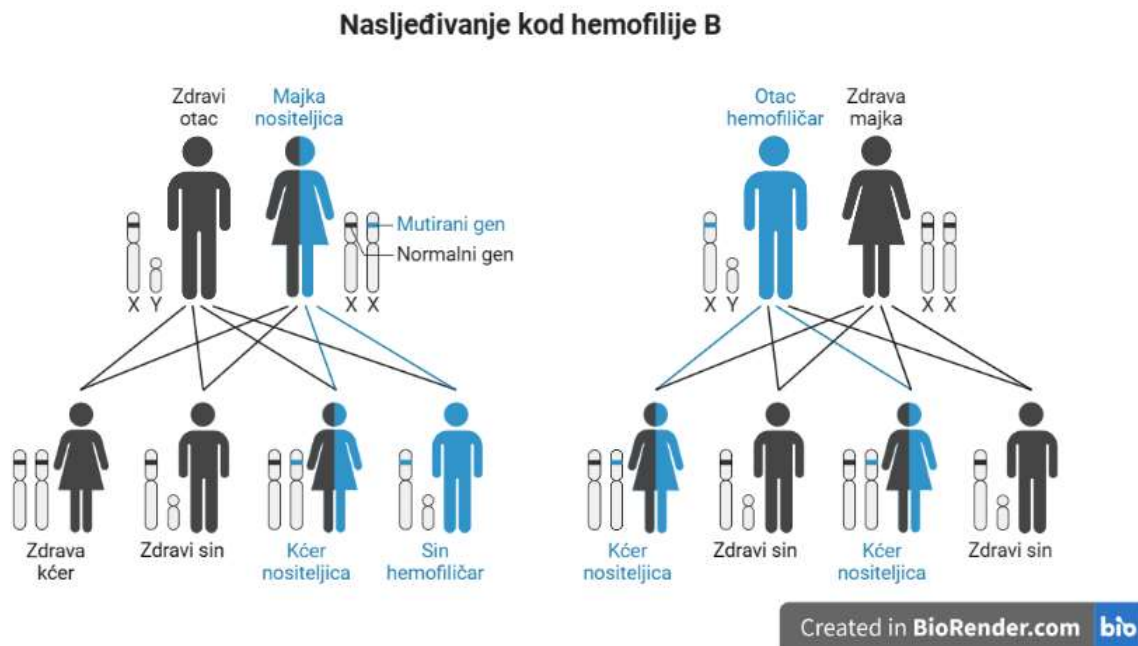
FVIIIa, koji mu višestruko povećava katalitičku aktivnost i to čak 200 000 puta (Shen i sur., 2022). Za nastajanje tenaznog kompleksa važni su i  $\text{Ca}^{2+}$  ioni te fosfolipidna membrana aktiviranih trombocita koji lokaliziraju koagulacijski proces na mjestu ozljede krvne žile. Tenazni kompleks zatim aktivira inaktivni faktor X u aktivirani faktor Xa, koji u prisutnosti  $\text{Ca}^{2+}$  i fosfolipida s aktiviranim faktorom Va stvara protrombinazu, kompleks ključan za pretvorbu inaktivnog protrombina u trombin. Djelovanjem trombina na fibrinogen nastaju fibrinski monomeri koji, u prisutnosti FXIIIa, stvaraju stabilni fibrinski ugrušak (Bhaskar i sur., 2016).

### **1.5. Molekularna osnova i nasljeđivanje hemofilije B**

Gen koji je odgovoran za sintezu FIX nalazi se na dugom kraku kromosoma X (Xq27.1), veličine je 34 kb, a sastoji se od osam egzona koji kodiraju sintezu jednolančanog prethodnika FIX i sedam introna (Shen i sur., 2022). Hemofilija B je X-vezani recesivni nasljedni poremećaj od kojeg gotovo isključivo obolijevaju muškarci, dok su žene uglavnom zdrave prenositeljice (Key i sur., 2017). Međutim, nije rijetko da žene prenositeljice imaju sniženu aktivnost FIX koja se klinički očituje kao menoragija, produljeno krvarenje prilikom vađenja zuba, kirurških zahvata ili poroda (Miller, 2021). Prema Dolan i sur., (2017) prenositeljice hemofilije B imaju veći rizik od krvarenja prilikom poroda u odnosu na žene prenositeljice hemofilije A, stoga je nužno odrediti aktivnost FIX u 32. tjednu trudnoće te u slučaju niskih aktivnosti primijeniti nadomjesnu terapiju prije poroda. Žene mogu oboljeti od hemofilije B ukoliko su kćeri oca hemofiličara i majke prenositeljice ili u rijetkim slučajevima ekstremne lajonizacije, odnosno nasumične inaktivacije X kromosoma uz ekspresiju samo mutiranih alela. Te žene će razviti simptome koji su prisutni u oboljelih muškaraca poput krvarenja u zglobove i mišiće (Miller, 2021; Key i sur., 2017). Također, poremećaji poput Turnerovog (XO) sindroma, ili stečene hemofilije mogu kod žena prenositeljica dovesti do značajno sniženih vrijednosti FIX u cirkulaciji (Key i sur., 2017).

S obzirom na to da je hemofilija B X-vezani nasljedni poremećaj, 50 % je vjerojatnost da će zdrava heterozigotna žena nositeljica prenijeti bolest na svoje sinove, koji će razviti puni fenotip bolesti zbog hemizigotnosti, odnosno 50 % je vjerojatnost da će prenijeti mutirani alel na svoje kćeri koje će biti nositeljice. Ukoliko oboljeli muškarac hemofiličar ima djecu sa zdravom ženom, sve njihove kćeri će biti nositeljice mutiranog alela, dok će sinovi biti zdravi jer od oca

dobivaju samo kromosom Y (Miller, 2021; Key i sur., 2017, Zimmerman i Valentino, 2013). Prikaz nasljeđivanja kod hemofilije B prikazan je na Slici 3.



**Slika 3.** Prikaz nasljeđivanja kod hemofilije B

Otpriblike trećina slučajeva hemofilije je sporadična, odnosno javlja se uslijed novonastalih mutacija uz negativnu obiteljsku anamnezu bolesti. Dosad je zabilježeno preko 1000 različitih mutacija u genu za FIX (Key i sur., 2017). Prema najnovijim podacima baze podataka za FIX iz ožujka 2023. godine, u 5 358 slučajeva hemofilije B registrirano je 1 692 jedinstvenih varijanti u genu za FIX koje uzrokuju hemofiliju B (<http://www.factorix.org/>). Najviše je registrirano točkastih mutacija (55,85 %), zatim polimorfizama (20,80 %) i delecija (16,61 %) dok je najmanje insercija (3,72 %) (Xu i sur., 2023). Većina delecija, insercija i duplikacija u kodirajućoj regiji dovodi do pomaka okvira čitanja i takozvanih mutacija pogrešnog smisla koje su najčešći uzrok manjka koagulacijskog faktora u hemofiliji B (Shen i sur., 2022; Key i sur., 2017). Razlikujemo dva tipa mutacija pogrešnog smisla – kvantitativne i kvalitativne.

Kvantitativne mutacije dovode do smanjenih koncentracija normalnog proteina dok kvalitativne mutacije uzrokuju smanjenu funkciju proteina uz normalne ili smanjene koncentracije. Za razliku od drugih deficijencija koagulacijskih faktora, većina mutacija koje uzrokuju hemofiliju B su kvalitativne mutacije. Najčešće se javljaju u katalitičkoj trijadi onemogućujući katalitičku aktivnost FIX što dovodi do teškog oblika hemofilije. Kvalitativne mutacije u propetidnoj regiji dovode do smanjene funkcije FIX uslijed nemogućnosti vezanja

za fosfolipide, posljedično uzrokujući umjereni do blagi oblik hemofilije B (Horrava i Peppas, 2017). Jedne od klinički najvažnijih mutacija u genu za FIX koje dovode do teškog oblika bolesti su velike delecije koje između ostalog, doprinose riziku razvoja inhibitora (Shen i sur., 2022). Kod pacijenata s hemofilijom B koji imaju točkaste mutacije u genu za FIX, klinički fenotip može varirati od teškog do blagog. Točkaste mutacije u promotorskoj regiji FIX povezuju se s fenotipom Leyden hemofilije B. Pojedinci s takvim fenotipom imaju nisku aktivnost FIX po rođenju koja postupno raste tijekom puberteta te dostiže normalne vrijednosti u odrasloj dobi (Shen i sur., 2022; Key i sur., 2017).

## **1.6. Klinička slika bolesnika s hemofilijom B**

Kao što je već objašnjeno u poglavlju 1.2., hemofilija B je karakterizirana povećanom sklonosti krvarenjima čiji intenzitet i učestalost ovise o ostatnoj aktivnosti FIX (Srivastava i sur., 2020). Kod teškog oblika bolesti prisutna su ponavljajuća, bolna, spontana krvarenja u zglobove i hematomi u mišićima koji postupno prerastu u tipične deformacije uzrokujući invaliditet. S obzirom na to da je kod pacijenata s hemofilijom očuvana primarna hemostaza, nakon minimalnih površinskih se ozljeda poput ogrebotina ne pojavljuju prekomjerna krvarenja (Labar i sur., 2007). Kod novorođenčadi s teškim oblikom hemofilije najčešće se javljaju krvarenja u meka tkiva i mišiće, krvarenja nakon obrezivanja te uzorkovanja krvi iz pete. Također, tijekom prvih 6-9 mjeseci života javljaju se i mukokutana krvarenja u ustima uslijed rasta zuba. U dobi od 1. do 2. godine života, kada dijete počinje puzati i kretati se, tipično se pojavljuju značajnija potkožna krvarenja te prva krvarenja u zglobove. Potkožna krvarenja postupno nestanu primjenom profilakse te se ne pojavljuju u odraslih s teškim oblikom hemofilije (Srivastava i sur., 2020; Key i sur., 2017).

Pacijenti s umjerenim oblikom bolesti imaju povremena spontana krvarenja te mogu razviti hematome u mišićima i zglobovima nakon blažih ozljeda. Također, prisutna su i produljena krvarenja nakon kirurških zahvata i vađenja zuba. Bolest se uglavnom dijagnosticira u dobi od 4. do 5. godine života (Key i sur., 2017).

Blagi se oblik hemofilije uglavnom dijagnosticira u kasnijoj životnoj dobi u odnosu na druge oblike bolesti. Pacijenti s blagim oblikom bolesti nemaju spontanih krvarenja, a produljena se krvarenja javljaju samo u slučaju većih trauma ili prilikom kirurških intervencija. S obzirom na to, blagi oblik hemofilije često ostaje nedijagnosticiran sve dok se ne pojave teži simptomi ili

komplikacije koje ugrožavaju život pacijenta. Također, za razliku od hemofilije A, blagi se oblik hemofilije B ne može dijagnosticirati odmah po rođenju jer aktivnost FIX dostiže vrijednost odraslih tek 90 dana nakon rođenja (Benson i sur., 2018; Key i sur., 2017).

Karakterističan simptom hemofilije je krvarenje u specifične velike zglobove, najčešće koljena, kuk, gležanj, lakat te ručni i rameni zglob (Srivastava i sur., 2020). U akutnoj fazi dolazi do nakupljanja krvi u zglobnu šupljinu i posljedično razvoja upale. Klinički znakovi akutne faze krvarenja uključuju blagi osjećaj nelagode (aura) uz ograničenje pokretljivosti zgloba. Uslijed nakupljanja krvi u sinovijalnom prostoru i razvoja upalne reakcije dolazi do hiperemije i oticanja zgloba koji postaje vruć i bolan (Srivastava i sur., 2020; DeLoughery, 2019). Učestala krvarenja uzrokuju zadržavanje krvi u zglobnoj šupljini zbog čega dolazi do razvoja kronične upale, hiperplazije sinovijalne membrane te angiogeneze što potiče daljnja krvarenja u zglob i dovodi do progresivnog oštećenja. Uznapredovali stadij, kronična hemofilična artropatija, obično se ispoljava u drugom desetljeću života, a karakterizira ga ozbiljno oštećenje zgloba uslijed progresivne erozije i gubitka hrskavice, razvoj koštanih cisti i skleroze koja dodatno ograničava pokretljivost zgloba, uzrokuje slabost mišića te u konačnici dovodi do deformacije (Gualtierotti i sur., 2021; Srivastava i sur., 2020).

Druga tipična krvarenja koja se javljaju kod hemofilije su: intramuskularna krvarenja, intrakranijalna krvarenja, hematurija, gastrointestinalna krvarenja te krvarenja kod vađenja zuba.

Intramuskularna krvarenja mogu zahvatiti bilo koju grupu mišića, međutim najčešće su pogođeni mišići *iliopsoas* i *gastrocnemius*. Krvarenja u mišić *iliopsoas* mogu biti izuzetno opasna jer izazivaju kompresiju femoralnog živca što dovodi do trajnog oštećenja i gubitka funkcije, odnosno paralize (Srivastava i sur., 2020; DeLoughery, 2019). Kao rezultat se javlja jaka bol u bedrima, kukovima ili preponama, bolovi u trbuhu te rotacija (fleksija) kuka zbog parestezije u području femoralnog živca (DeLoughery, 2019). Izuzetno je važno na vrijeme prepoznati krvarenje u mišiće kako bi se spriječile trajne kontrakture, ponovna krvarenja te pojava pseudotumora (Srivastava i sur., 2020).

Intrakranijalno je krvarenje najčešći uzrok smrti uslijed krvarenja kod hemofilije, posebno kod starijih pacijenata. Može se javiti spontano ili nakon blage traume. U slučaju sumnje na ozljedu glave kod bolesnika s hemofilijom nužno je hitno primijeniti nadomjesnu terapiju odgovarajućim faktorom prije dijagnostičkih testova (DeLoughery, 2019; Key i sur., 2017).

Spontana hematurija relativno se često javlja kod pacijenata s teškim oblikom hemofilije. Uglavnom je bezbolna i prolazi bez potrebe za terapijom. Ukoliko ne prestane unutar nekoliko dana, potrebno je primijeniti nadomjesnu terapiju odgovarajućim faktorom (Key i sur., 2017).

Učestala krvarenja na jednom mjestu i neodgovarajuće liječenje mogu rezultirati razvojem pseudotumora, inkapsuliranog hematoma koji se progresivno povećava i pritiska okolne strukture. Kirurško uklanjanje pseudotumora izrazito je teško i opasno po život. Međutim, s razvojem terapije i napretkom u liječenju hemofilije danas je pojava pseudotumora rijetkost (Key i sur., 2017).

### **1.7. Laboratorijska dijagnostika hemofilije B**

Različiti poremećaji krvarenja mogu imati sličnu kliničku sliku, pa je stoga postavljanje točne dijagnoze ključno kako bi pacijent primio odgovarajuću terapiju. Nadalje, sveobuhvatna i pouzdana laboratorijska dijagnostička obrada ima važnu ulogu (Srivastava i sur., 2020). Točne i pouzdane metode određivanja aktivnosti FIX ključne su za postavljanje dijagnoze, klasifikaciju stupnja i oblika hemofilije, terapijsko praćenje nadomjesnim pripravcima, kao i za testiranje prisutnosti inhibitora na FIX (Adcock i sur., 2018; Kitchen i sur., 2016). Kako se klasifikacija hemofilije B temelji na izmjerenoj ostatnoj aktivnosti FIX, za razlikovanje teškog od umjerenog oblika bolesti su potrebne metode s vrlo niskom granicom detekcije aktivnosti FIX (manjom od 0,01 kIU/L) (Strandberg i Augustsson, 2021; Marlar i sur., 2019). Također, točno i precizno određivanje izrazito niskih aktivnosti FIX ključno je u praćenju nadomjesne terapije jer već i blagi porast aktivnosti FIX ( $\geq 0,01$  kIU/L) dovodi do značajnog napretka u smanjenju učestalosti i težine krvarenja te poboljšanja kvalitete života pacijenata s teškim oblikom bolesti (Matsumoto i sur., 2006).

Danas su u primjeni dvije osnovne metode za određivanje aktivnosti FVIII i FIX – koagulacijska metoda u jednom stupnju koja se temelji na modifikaciji aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTV-a) i kromogena metoda. Koagulacijska metoda, kao osnovna metoda za laboratorijsku dijagnostiku hemofilije, prevladava u većini laboratorija u svijetu. Prema svjetskoj anketi iz 2015. u kojoj je sudjelovalo ukupno 210 laboratorija iz sedam zemalja (Francuske, Njemačke, Italije, Japana, Španjolske, Ujedinjenog Kraljevstva i SAD-a), čak 88 % laboratorija koristi koagulacijsku metodu za dijagnozu hemofilije B, dok kromogenu metodu koristi samo 11 % laboratorija (Kitchen i sur., 2015). Iako je metodologija prvi put

opisana 1990. godine, kromogena je metoda za određivanje aktivnosti FIX tek nedavno postala dostupna za primjenu u laboratorijskoj praksi. U Europi su trenutno za dijagnostičke svrhe dostupne dvije kromogene metode – Rox FIX® (Rossix, Švedska) i Biophen® FIX (Hyphen Biomed, Francuska). S druge strane, u SAD-u se kromogena metoda još uvijek koristi samo u istraživačke svrhe (Bowyer i sur., 2018).

U posljednje se vrijeme istražuju novije metode za određivanje aktivnosti FIX kao što su analiza reakcijske krivulje APTV-a i analiza stvaranja trombina. Iako ove metode još uvijek nisu u rutinskoj primjeni, pokazale su se vrlo osjetljivima te mogu izmjeriti puno niže vrijednosti FIX u odnosu na dosadašnje metode. Primjena ovih metoda u laboratorijskoj praksi pridonijela bi obradi hemofilicara s razvijenim inhibitorima te obradi prije primjene genske terapije (Matsumoto i sur., 2006).

### **1.7.1. Probirne laboratorijske pretrage**

Kao dio početne obrade pacijenata sa sumnjom na poremećaje krvarenja koriste se nespecifične probirne laboratorijske pretrage određivanja broja trombocita te probirnih (globalnih) koagulacijskih pretraga, protrombinskog vremena (PV-a) i APTV-a (Srivastava i sur., 2020). U pacijenata s hemofilijom karakteristično je produljenje APTV-a, dok su broj trombocita i PV unutar referentnih intervala. U teškom obliku hemofilije vrijednost APTV-a je 2 do 3 puta veća od gornje granice referentnog intervala čiji raspon obično iznosi 22-40 s, ovisno o korištenom reagensu (Marlar i sur., 2018; Zimmerman i Valentino, 2013). Međutim, kako je u nekim slučajevima blage hemofilije B moguć rezultat APTV-a unutar referentnog intervala, takvi se rezultati APTV-a ne smiju zanemariti ukoliko postoji klinička sumnja na hemofiliju (Srivastava i sur., 2020).

APTV je probirna koagulacijska pretraga na kojoj se temelji koagulacijska metoda, koja se koristi za ispitivanje funkcije unutarnjeg i zajedničkog puta zgrušavanja. Definira se kao vrijeme potrebno za stvaranje ugruška koje ovisi o aktivnosti faktora zgrušavanja. Osjetljivost metode za otkrivanje manjka faktora ovisi o korištenim komercijalno dostupnim reagensima koji se razlikuju među različitim proizvođačima. Kod određivanja APTV-a kontaktni aktivator i fosfolipidi dodaju se u plazmu ispitanika koja se potom inkubira na 37 °C kako bi se aktivirao kontaktni sustav. Potom se dodaje kalcij kako bi se aktivirao unutarnji i zajednički put zgrušavanja, odnosno potaknulo stvaranje fibrinskog ugruška. U konačnici, APTV se



izračunava kao vrijeme u sekundama koje je potrebno za nastajanje ugruška nakon dodatka kalcijevog klorida. Iako se produljeno APTV povezuje s manjkom faktora unutarnjeg puta zgrušavanja, do produljenja APTV-a može doći zbog prisutnosti antikoagulacijskih lijekova, lupus antikoagulanta ili specifičnih inhibitora pojedinih faktora (Marlar i sur., 2018). Kako bi se otkrio uzrok produljenja APTV-a, koristi se test miješanja tako da se napravi mješavina plazme ispitanika i normalne plazme koja sadrži sve faktore zgrušavanja, u omjeru 1:2 u kojoj se zatim ponovno odredi APTV. U slučaju manjka faktora prilikom testa miješanja doći će do potpune korekcije produljenog APTV-a, dok će korekcija izostati u slučaju prisutnosti inhibitora (Marlar i sur., 2018; Zimmerman i Valentino, 2013).

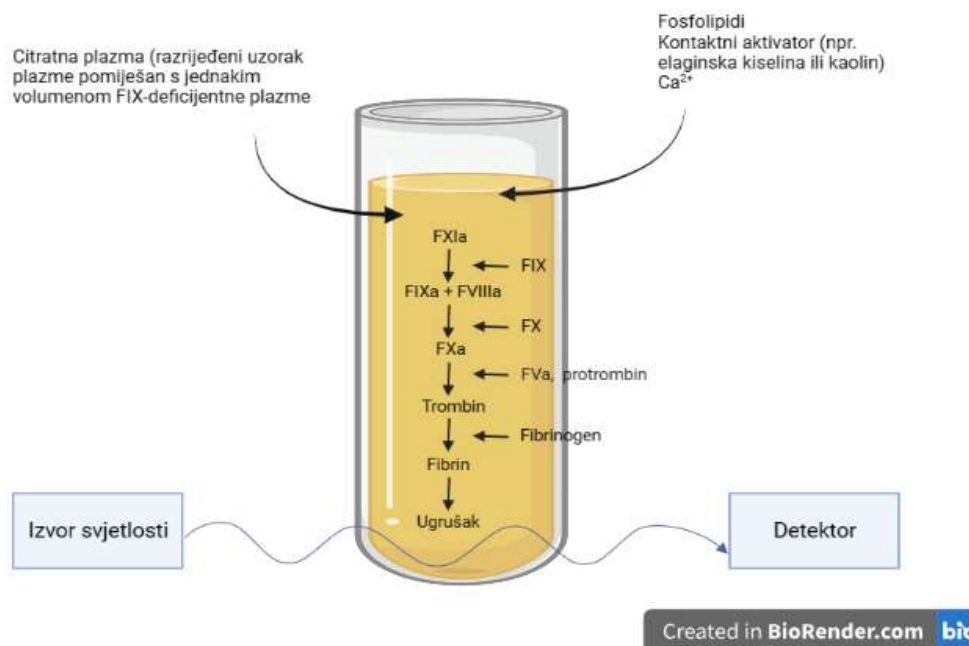
## **1.7.2. Određivanje aktivnosti FIX**

### *1.7.2.1. Koagulacijska metoda*

Koagulacijska metoda u jednom stupnju (engl. *one-stage assay*) je modificirana metoda za određivanje APTV-a koja se temelji na sposobnosti plazme ispitanika da korigira, odnosno skрати produljeno vrijeme zgrušavanja FVIII ili FIX deficijentne plazme (Adcock i sur., 2018). Deficijentna plazma za FIX je plazma koja sadrži aktivnost FIX < 0,01 kIU/L uz normalne aktivnosti svih ostalih faktora zgrušavanja (Srivastava i sur., 2020).

Kod mjerenja koagulacijske aktivnosti FIX koagulacijskom metodom, serijska razrjeđenja citratne plazme ispitanika se miješaju s istovjetnim volumenima FIX deficijentne plazme te inkubiraju 3-5 minuta na 37 °C zajedno s fosfolipidima i kontaktnim aktivatorom koji su sastavni dio reagensa za određivanje APTV-a. Dodavanjem kalcijevih iona se pokreće proces zgrušavanja. Kako FIX-deficijentna plazma sadrži sve faktore zgrušavanja u suvišku osim FIX (< 0,01 kIU/L), vrijeme nastanka ugruška (mjereno kao APTV) ovisit će isključivo o aktivnosti FIX u uzorku ispitanika (Slika 4.) (Adcock i sur., 2018).

Prema aktualnim smjernicama WFH koagulacijska je metoda u jednom stupnju navedena kao preporučena metoda u početnoj dijagnostičkoj laboratorijskoj obradi pacijenata s kliničkom sumnjom na hemofiliju B (Srivastava i sur., 2020).

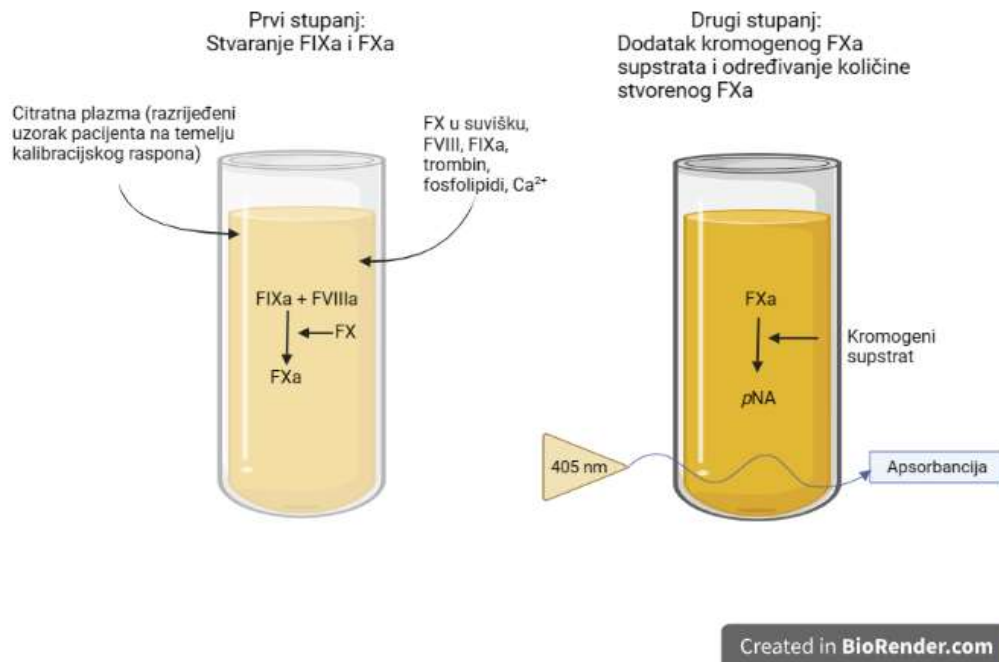


**Slika 4.** Shematski prikaz koagulacijske metode u jednom stupnju

#### 1.7.2.2. Kromogena metoda

Kromogena metoda za određivanje funkcionalne aktivnosti FIX odvija se u dva stupnja. U prvom stupnju uzorak plazme ispitanika dodaje se smjesi odgovarajućih kofaktora (FX, trombina, kalcija (Ca<sup>2+</sup>) i fosfolipida) koja se potom inkubira 2-10 minuta ovisno o preporučenom protokolu proizvođača. U ovoj reakciji dolazi do stvaranja aktiviranog koagulacijskog faktora IX (FIXa) koji dovodi do aktivacije faktora X (FXa). U drugom stupnju, FXa proteolitički cijepa specifični kromogeni supstrat (peptid nitroanilid) pri čemu nastaje obojeni p-nitroanilin koji se može izmjeriti spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na 405 nm. Intenzitet nastalog obojenja razmjernan je količini nastalog FXa, odnosno aktivnosti funkcionalnog FIX u uzorku ispitanika (Slika 5.) (Adcock i sur., 2018).

Prema aktualnim smjernicama WFH trenutno nema dovoljno podataka o ulozi kromogene metode za određivanje FIX u početnoj dijagnostičkoj obradi pacijenata s hemofilijom B (Srivastava i sur., 2020).



**Slika 5.** Shematski prikaz kromogene metode

## 1.8. Terapijski pristupi u liječenju pacijenata s hemofilijom B

Prva terapija hemofilije primijenjena je 1840. godine, a temeljila se na izravnoj transfuziji krvi (Peyvandi i sur., 2016). Tijekom 1950-ih i 1960-ih godina, za liječenje hemofilije B koristila se svježe smrznuta plazma i koncentрати protrombinskog kompleksa, no uslijed smanjene čistoće ovi pripravci su uzrokovali brojne komplikacije uključujući prekomjernu aktivaciju zgrušavanja. Moderna terapija započela je 1965. godine krioprecipitacijom svježe smrznute plazme. Veliki napredak bila je proizvodnja liofiliziranih koncentrata FIX što je omogućilo kućnu terapiju i uvelike poboljšalo kvalitetu života pacijenata. Međutim, svi ovi pripravci bili su proizvedeni od većeg broja plazmi davatelja što sa sobom nosi rizik prijenosa virusa hepatitisa i HIV-a. Dramatična situacija dogodila se 1970-ih i 1980-ih kada se tisuće pacijenata s hemofilijom diljem svijeta zarazilo virusom HIV-a i hepatitisa C preko kontaminiranih krvnih pripravaka. Zahvaljujući napretku u testiranju krvi na infektivne uzročnike i metodama za virusnu inaktivaciju, u današnje vrijeme je proces proizvodnje koncentrata iz plazme puno sigurniji. Međutim, teoretski rizik kontaminacije krvnih pripravaka infektivnim uzročnicima i dalje postoji. To se ponajprije odnosi na parvovirus B19 te varijante Creutzfeldt-Jakobove bolesti uzrokovane prionima (Horava i Peppas, 2017; Peyvandi i sur., 2016).

Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) je 1997. godine odobrila prvi komercijalno dostupni rekombinantni pripravak FIX (rFIX) za liječenje hemofilije B koji je danas poznat pod imenom Benefix®. Iako je njihovom primjenom gotovo potpuno isključena mogućnost prijenosa virusnih patogena, rFIX i pročišćeni koncentraci FIX imaju drugu manu, a to je izrazito kratko vrijeme poluživota koje za FIX iznosi od 18 do 24 sata. Stoga je potrebna češća intravenska primjena ovih nadomjesnih pripravaka, najmanje dva puta tjedno, što predstavlja značajni teret za pacijente te negativno utječe na adherenciju i klinički ishod (Hart i sur., 2022; Horava i Peppas, 2017; Peyvandi i sur., 2016). Međutim, modificiranjem farmakokinetičkih svojstava rFIX moguće je produžiti vrijeme poluživota u plazmi i tako produljiti vrijeme između doziranja (Hart i sur., 2022). Najčešće metode za to su pegiliranje, odnosno kovalentno vezanje polimera polietilen glikola (PEG) na lijek te vezanje lijeka na drugi protein kao što je albumin ili fuzija s Fc fragmentom imunoglobulina G (IgG). Ovim metodama dokazano je produljeno vrijeme poluživota rFIX čak 3 do 6 puta (Peyvandi i sur., 2016). U ožujku 2014. godine, FDA je odobrila prvi rFIX s produljenim poluživotom – Eftrenonacog Alfa (Alprolix®) dobiven fuzijom rFIX s Fc fragmentom ljudskog IgG1. Osim njega danas su dostupna još dva rFIX s produljenim poluživotom, rFIX vezan za albumin [Albutrepenonacog Alfa (Idelvion®)] i pegilirani rFIX [Nonacog Beta Pegol (Refixia®)] (Müller i sur., 2022; Horava i Peppas, 2017).

Danas se u terapiji hemofilije B primjenjuju dva temeljna oblika liječenja: liječenje po potrebi i profilaktičko liječenje. Liječenje po potrebi podrazumijeva intravensku primjenu nadomjesne terapije u slučaju akutnih krvarenja ili prije kirurških zahvata (Castaman, 2018; Horava i Peppas, 2017). S obzirom na to da učestala krvarenja mogu dovesti do nepovratnog oštećenja zglobova te posljedično hemofilične artropatije i invalidnosti, uveden je novi pristup liječenja, a to je profilaktičko, odnosno preventivno liječenje. Profilaktičko liječenje podrazumijeva redovitu primjenu nadomjesne terapije FIX kod pacijenata s teškim oblikom hemofilije, odnosno pacijenata s blagim i umjerenim oblikom koji imaju teški fenotip, kako bi se održavanjem aktivnosti FIX na razini umjerene hemofilije spriječila ili smanjila spontana krvarenja (Hart i sur., 2022; Castaman, 2018). Razlikujemo primarno, sekundarno i tercijarno profilaktičko liječenje. Primarnu profilaksu prvi je put primijenila profesorica Inga Marie Nilsson u ranim 60-im godinama prošlog stoljeća, a podrazumijeva neprekidnu primjenu nadomjesne terapije prije 3. godine života i drugog zabilježenog krvarenja u zglobove. Sekundarna profilaksa uključuje redovnu primjenu nadomjesne terapije nakon pojave krvarenja u dva ili više velikih zglobova dok tercijarna profilaksa podrazumijeva redovitu primjenu

nadomjesne terapije nakon pojave artropatije (Castaman, 2018; Key i sur., 2017). Profilaktičko liječenje pokazalo se učinkovitije u odnosu na liječenje po potrebi, čak i uz kasniji početak primjene. Naime, profilaksa omogućuje značajno smanjenje spontanih krvarenja, prevenciju intrakranijalnog krvarenja, očuvanje strukture zglobova te uvelike poboljšanu kvalitetu života (Horava i Peppas, 2017; Key i sur., 2017). Stoga je primarna profilaksa nadomjesnim pripravcima FIX preporučena kao prva linija liječenja pacijenata s teškim oblikom hemofilije B uz što raniji početak primjene kako bi se izbjegla prekomjerna krvarenja i progresija u hemofiličnu artropatiju (Hart i sur., 2022).

Medicinsko i znanstveno vijeće Nacionalne zaklade hemofilije (engl. *National Hemophilia Foundation Medical and Scientific Advisory Council*) je 2007. godine preporučilo profilaktičko liječenje kao primarnu terapiju za djecu s teškim oblikom hemofilije B (Horava i Peppas, 2017). Međutim, unatoč smjernicama i preporukama primjena profilakse u hemofiliji B manje je zastupljena nego kod hemofilije A. U SAD-u, prema podacima 138 centara za liječenje hemofilije iz 2017. godine, profilaksu je primilo 75 % pacijenata s teškim i 20 % pacijenata s umjerenim oblikom hemofilije B, u odnosu na 81 % teških i 36 % umjerenih pacijenata s hemofilijom A. S druge strane, prema retrospektivnom istraživanju 11 centara za liječenja hemofilije, u Europi je profilaksu primilo 49 % pacijenata s teškim ili umjerenim oblikom hemofilije B, u odnosu na 66 % pacijenata s hemofilijom A. Slični podaci zabilježeni su i u Australiji (Castaman, 2018).

Prije primjene nadomjesne terapije FIX kod akutnog krvarenja potrebno je izračunati optimalnu dozu. Farmakokinetičke studije pokazuju da 1 U FIX/kg tjelesne mase povećava aktivnost FIX za 0,01 kIU/L (1%). Najčešća jednadžba koja se koristi za izračun doze je sljedeća:  $FIX (U) = (\text{željena aktivnost FIX} - \text{aktualna aktivnost FIX}) \times \text{tjelesna masa u kg}$ . U slučaju primjene rFIX potrebno je rezultat pomnožiti s 1,4 (Key i sur., 2017). Međutim, prema posljednjim preporukama Internacionalnog konsenzusa, izračun doze i učestalosti profilaktičke terapije ne bi se trebao temeljiti samo na željenoj aktivnosti FIX, već bi se trebao prilagoditi kliničkom fenotipu i životnom stilu pacijenta (Hart i sur., 2022).

Unatoč brojnim prednostima profilaktičke terapije i primjene rFIX s produljenim vremenom poluzivota, zabilježeni su slučajevi pacijenata koji su razvili subklinička krvarenja i oštećenje zglobova unatoč redovitoj primjeni profilakse, a određeni pacijenti razviju inhibitore i tešku alergijsku reakciju na nadomjesnu terapiju FIX (Hart i sur., 2022). Inhibitori u hemofiliji B su IgG aloantitijela usmjerena na egzogeni koagulacijski faktor IX koja neutraliziraju funkciju primijenjenih koncentrata FIX. Inhibitori se smatraju najozbiljnijom komplikacijom liječenja

hemofilije B, ne samo zbog nedjelotvornosti nadomjesne terapije, već i zbog povezanosti s rizikom od razvoja anafilaksije i nefrotskog sindroma (Srivastava i sur., 2020). Veći rizik razvoja inhibitora i teških alergijskih reakcija imaju pacijenti s određenim mutacijama (velike delecije i mutacije pogrešnog smisla u genu za FIX) te pacijenti s teškim oblikom hemofilije B. Naime, incidencija pojave inhibitora kod teškog oblika hemofilije B je 4,9 %, kod umjerenog oblika 0,5 % dok je kod blagog oblika hemofilije B incidencija 0,1 %. Također, povećani rizik za razvoj inhibitora u hemofiliji B imaju pacijenti mlađe životne dobi i crne rase. Za pacijente s hemofilijom B koji su razvili inhibitore danas su dostupne dvije terapijske opcije: aktivirani koncentrat protrombinskog kompleksa (engl. *activated prothrombin complex concentrates*, aPCC) i aktivirani rekombinantni faktor VII (rFVIIa). Ovi oblici terapije premošćuju funkcionalnu aktivnost FIX uz dokazanu učinkovitost i prihvatljivu sigurnost u liječenju akutnih krvarenja pacijenata s kroničnim inhibitorima u hemofiliji B (Hart i sur., 2022). Aktualne smjernice WFH u slučaju akutnih krvarenja kod pacijenata s inhibitorima i anafilaktičkom reakcijom na terapiju FIX preporučuju rFVIIa kao terapiju izbora s obzirom na to da aPCC sadrži FIX koji bi mogao uzrokovati ili pogoršati alergijsku reakciju (Srivastava i sur., 2020).

Liječenje hemofilije B i dalje se razvija, uključujući ispitivanja nadomjesne terapije koja ne uključuje koagulacijski faktor te najnoviju gensku terapiju koja bi samo jednom dozom smanjila ili u potpunosti ukinula potrebu primjene egzogenog FIX na duži vremenski period. U fokusu istraživanja genske terapije je rekombinantni adeno-asocirani virusni vektor serotip 8 (AAV) u koji je ugrađen funkcionalni gen za FIX (Hart i sur., 2022; Peyvandi i sur., 2016). AAV se usmjerava u jetru gdje potiče endogenu ekspresiju funkcionalnog FIX koji potom nadomješta manjak ili zamjenjuje mutirani FIX. U najnovijim kliničkim ispitivanjima kod pacijenata s teškim i umjereno teškim oblikom hemofilije B ( $< 0,02$  kIU/L FIX) nisu zabilježena krvarenja u 39 od 54 pacijenata 26 tjedana nakon jedne doze etranacogene dezaparoveca (UniQure). U drugoj fazi kliničkih ispitivanja nacogene elaparoveca (Pfizer) kod 12 od 15 pacijenata nisu zabilježena krvarenja više od godine dana nakon primjene jedne doze (Hart i sur., 2022). Također, kod pacijenata je primijećen i porast aktivnosti FIX za 5-7 %. Značajnije nuspojave zasad nisu zabilježene uz iznimku povišenih jetrenih enzima kod četiri pacijenta koji su primili visoku dozu AAV (Peyvandi i sur., 2016). Iako su istraživanja genske terapije u tijeku, dosadašnji podatci iz kliničkih ispitivanja upućuju kako bi se genska AAV terapija hemofilije B trebala razmotriti kao buduća terapijska opcija kod odraslih pacijenata s teškim oblikom hemofilije B (Hart i sur., 2022).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Hemofilija B je rijetki X-vezani recesivni nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi uzrokovan potpunim ili djelomičnim manjkom aktivnosti koagulacijskog faktora IX što rezultira povećanom sklonosti krvarenjima. Postavljanje dijagnoze hemofilije B temelji se uz karakterističnu kliničku sliku i/ili obiteljsku anamnezu na rezultatima koagulacijskih laboratorijskih nalaza, a to su snižena aktivnost FIX uz patološko produljeno APTV. Težina kliničke slike, odnosno intenzitet i učestalost krvarenja najčešće ovise o stupnju manjka aktivnosti FIX, te se stoga hemofilija B s obzirom na izmjerenu ostatnu aktivnost FIX, dijeli na teški ( $<0,01$  kIU/L), umjereni ( $0,01-0,05$  kIU/L) i blagi ( $>0,05-0,40$  kIU/L) oblik. Pravilna klasifikacija nužna je za odluku o terapiji i pružanje odgovarajuće primjerene skrbi pacijentu.

Točno, precizno i pouzdano određivanje aktivnosti FIX ključno je dakle za postavljanje dijagnoze, klasifikaciju, ali i praćenje nadomjesne terapije te dokazivanje i kvantifikaciju inhibitora na FIX koji mogu uvelike utjecati na učinkovitost primijenjene terapije ili dovesti do teških nuspojava poput anafilaktičke reakcije.

Tradicionalna laboratorijska metoda za određivanje aktivnosti koagulacijskog faktora IX je koagulacijska metoda u jednom stupnju, iako se u današnje vrijeme sve više počela primjenjivati puno osjetljivija kromogena metoda. Iako se koagulacijska metoda danas najčešće koristi za mjerenje aktivnosti faktora, primjena kromogene metode nužna je u laboratorijskoj dijagnostici pacijenata s blagim oblicima hemofilije koji bi u slučaju primjene isključivo koagulacijske metode mogli ostati neprepoznati. Također, dosadašnja istraživanja ukazuju na značajne razlike u rezultatima određivanja aktivnosti FIX koagulacijskom i kromogenom metodom koje mogu utjecati na klasifikaciju pacijenata s hemofilijom B. Naime, klasifikacija hemofilije B na teški, umjereni i blagi oblik, danas se temelji na ostatnoj aktivnosti FIX izmjerenoj koagulacijskom metodom. S obzirom na to da je ispravna klasifikacija ključna za odluku o terapiji i pružanje pravilne skrbi pacijentima s hemofilijom, jedan od osnovnih ciljeva ovog rada bio je ispitati utjecaj određivanja aktivnosti FIX kromogenom metodom na klasifikaciju pacijenata s hemofilijom B te utvrditi postoje li značajne promjene u klasifikaciji s obzirom na primijenjenu metodu određivanja aktivnosti FIX.

Veliki izazov u laboratorijskoj dijagnostici hemofilije predstavlja i pojava novih lijekova na tržištu, kao što su lijekovi s produljenim djelovanjem kod kojih je intervencijom u molekularnoj strukturi došlo do produljenja vremena poluživota u cirkulaciji omogućujući primjenu lijeka u širim vremenskim intervalima. Prema literaturnim podacima, kod terapijskog praćenja ovih

lijekova uočena su odstupanja u rezultatima između koagulacijske i kromogene metode. Odabir odgovarajuće metode ključan je za točno mjerenje izrazito niskih aktivnosti FIX što je od izuzetne važnosti za pravilno i pravodobno liječenje pacijenata s hemofilijom B. Naime, korištenje metode koja značajno podcjenjuje aktivnosti FIX može rezultirati povećanjem doze lijeka što sa sobom nosi rizik pojave tromboze, ali i predstavlja veće financijsko opterećenje zdravstvenog sustava. S druge strane, ukoliko metoda precjenjuje aktivnosti FIX dolazi do potencijalnog smanjenja doze lijeka i posljedično veće sklonosti krvarenjima koja mogu biti životno ugrožavajuća, posebno u pacijenata s teškim oblikom bolesti. Kako je jedan od preduvjeta uspješnog liječenja, a samim time i poboljšanja kvalitete života pacijenata s hemofilijom B, praćenje terapije određivanjem aktivnosti FIX, cilj ovog rada bio je ispitati razlike u rezultatima terapijskog praćenja pacijenata koagulacijskom i kromogenom metodom te utvrditi koja metoda bi bila prikladnija za praćenje učinkovitosti lijekova za hemofiliju B dostupnih na hrvatskom tržištu.

Hemofilija A je značajno više istražena u odnosu na hemofiliju B i unatoč sličnostima između ove dvije bolesti, već strukturne razlike između koagulacijskih faktora VIII i IX upućuju kako se podatci i saznanja o hemofiliji A ne mogu jednostavno preslikati na hemofiliju B. Relativno niska incidencija hemofilije B i posljedični manjak istraživanja koje uključuju veći broj pacijenata dodatno ističu potrebu za istraživanjem utjecaja dijagnostičkih metoda i terapije na cjelokupnu skrb pacijenata s hemofilijom B. S obzirom na to, rezultati ovog istraživanja pružit će korisne spoznaje o važnosti potencijalne primjene kromogene metode za određivanje aktivnosti FIX u dijagnostici, klasifikaciji i praćenju nadomjesne terapije kod pacijenata s hemofilijom B.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitanici i uzorci

U ispitivanje je bilo uključeno 40 ispitanika kojima je na temelju prethodne anamneze, kliničke i laboratorijske obrade postavljena dijagnoza hemofilije B. Uključeni ispitanici su bili pedijatrijski i odrasli pacijenti muškog spola neovisno o dobi, vremenu kada im je postavljena dijagnoza i načinu liječenja. Za ispitanike su prikupljeni i klinički podaci o dobi prvog krvarenja u životu. Također, u ispitivanje je bilo uključeno i 5 pacijenata muškog spola koji su u trenutku ispitivanja primali nadomjesnu terapiju. Za te ispitanike dodatno su prikupljeni podaci o nazivu, vrsti i vremenu početka nadomjesne terapije.

Kontrolna skupina sastojala se od 40 zdravih muških ispitanika, sparenih po dobi ispitanika od kojih je 26 pripadalo odrasloj, a 14 pedijatrijskoj populaciji.

Kao uzorak korištena je periferna venska krv uzorkovana na standardiziran način venepunkcijom u sjedećem položaju iz antekubitalne vene nakon kompresije trajanja manje od 1 minute, ujutro natašte (12 sati nakon zadnjeg obroka) te mirovanja ispitanika 15 do 30 minuta prije uzorkovanja kako bi se minimizirale predanalitičke varijacije.

Svakom ispitaniku uzorkovane su dvije epruvete krvi s antikoagulansom 3,2 %-tnim trinatrijevim citratom (0,105-0,109 M) volumena 2,7 mL ili 4,5 mL. Za potrebe laboratorijskih analiza krv je odmah centrifugirana 2 puta po 15 minuta na 4000 okretaja/min na sobnoj temperaturi kako bi se dobila plazma siromašna trombocitima. Mjerenje aktivnosti FIX koagulacijskom metodom te određivanje APTV-a provedeno je u svježim uzorcima plazmi. Za pretrage koje nisu provedene u istom danu uzorci plazme su alikvotirani te pohranjeni na -80 °C do analize. Prije samog početka analize pohranjeni alikvoti uzoraka plazmi odmrznuti su u vodenoj kupelji na temperaturi od 37 °C i lagano promiješani. Sve laboratorijske analize provedene su na Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Svi su ispitanici prije sudjelovanja u ispitivanju potpisali informirani pristanak. Ispitivanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb (klasa: 1-16/75-2; broj: 02/21 AG) te Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa: 643-02/19-01/02; ur.broj: 251-62-03-19-38).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Određivanje APTV-a

APTV je određen u uzorcima plazme siromašne trombocitima koagulometrijskom metodom na automatiziranom koagulacijskom analizatoru s optičkom detekcijom Atellica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). Metoda se temelji na aktivaciji faktora unutarnjeg puta zgrušavanja nakon inkubacije citratne plazme optimalnom količinom fosfolipida kao zamjenom za trombocite i površinskim aktivatorom (elaginskom kiselinom). Nakon 3 minute inkubacije dodaje se otopina  $\text{CaCl}_2$  što pokreće reakciju stvaranja fibrinskog ugruška, odnosno pretvaranje fibrinogena u fibrin (Ignjatović, 2013). Stvaranje fibrinskog ugruška dovodi do promjene transmisije svjetlosti u reakcijskoj kivetu što se može pratiti na reakcijskoj krivulji APTV-a. Analizator definira vrijeme zgrušavanja na početku porasta signala, odnosno u trenutku kada je postignuta unaprijed određena promjena optičke gustoće. Definirano vrijeme potrebno za stvaranje stabilnog ugruška izražava se u sekundama te predstavlja APTV.

Za određivanje APTV-a korišteni su sljedeći reagensi:

- **Dade Actin FS Activated PTT Reagent** koji sadrži pročišćene fosfolipide soje u  $1,0 \times 10^{-4}$  M elaginskoj kiselinu uz pufer, stabilizator i konzervans (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). Reagens je spreman za upotrebu.
- **Otopina  $\text{CaCl}_2$  25 mM** (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). Reagens je spreman za upotrebu.
- Komercijalno dostupne kontrolne plazme za provedbu unutarnje kontrole kvalitete:  
**Control Plasma N** – liofilizirani pripravak *poola* citratnih plazmi zdravih davatelja, stabiliziran puferom HEPES (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka)  
**Kontrolni uzorak Ci-Trol 2** – liofilizirani pripravak *poola* citratnih plazmi s patološkim vrijednostima (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka)

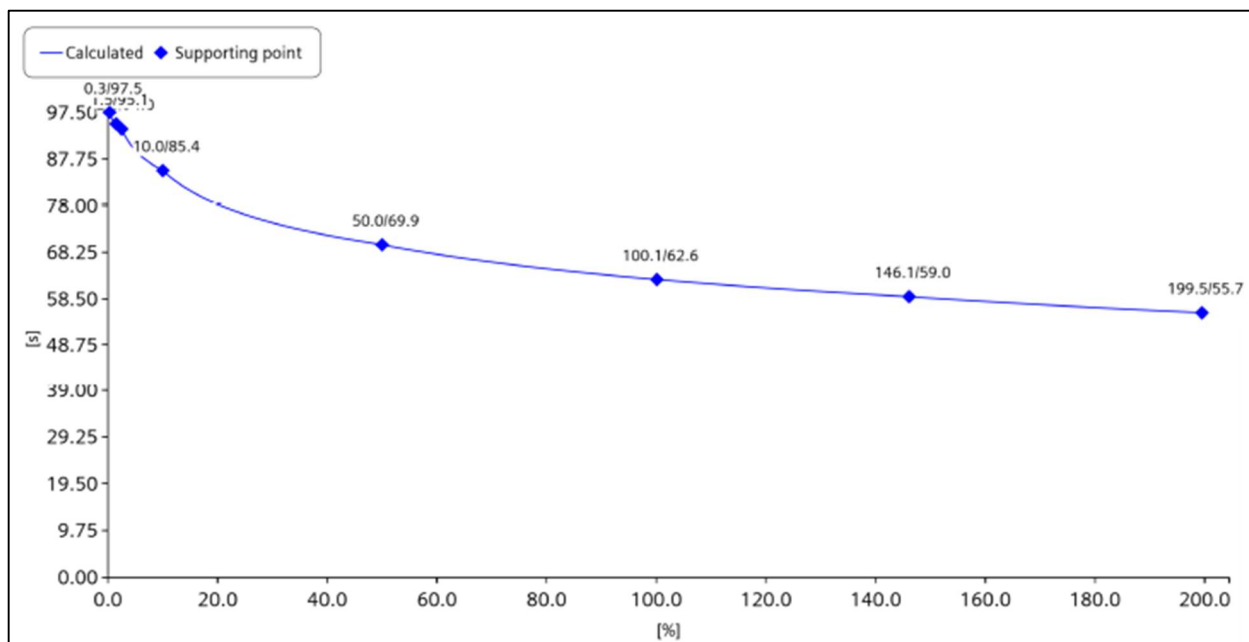
### 3.2.2. Određivanje aktivnosti koagulacijskog faktora IX

#### 3.2.2.1. Koagulacijska metoda

Aktivnost FIX određena je koagulacijskom metodom u jednom stupnju na automatiziranom koagulacijskom analizatoru Atellica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka).

Metoda se temelji na sposobnosti razrijeđene citratne plazme bolesnika da korigira, odnosno skрати APTV deficijentne plazme za FIX koja sadrži  $<0,01$  kIU/L aktivnosti FIX. Dakle, radi se o modifikaciji metode za određivanje APTV-a gdje se u serijska razrjeđenja uzorka citratne plazme bolesnika dodaju istovjetni volumeni FIX deficijentne plazme te se u toj mješavini odredi APTV u sekundama. Budući da FIX-deficijentna plazma sadrži sve faktore zgrušavanja u suvišku osim FIX ( $< 0,01$  kIU/L), vrijeme nastanka ugruška ovisit će isključivo o aktivnosti FIX u uzorku bolesnika (Adcock i sur.,2018).

Analizator automatski očitava aktivnost FIX (%) u ispitivanom uzorku na temelju prethodno izrađene kalibracijske krivulje koja predstavlja odnos izmjerenog vremena zgrušavanja u sekundama (s) i pripadajućih aktivnosti FIX (%) u razrjeđenjima referentne plazme. S obzirom na to da analizator izdaje vrijednosti FIX u postocima, očitane se vrijednosti podijele sa 100 kako bi se dobile aktivnosti FIX u kIU/L. Za potrebe određivanja aktivnosti FIX priređena je kalibracijska krivulja u 8 točaka automatskim razrjeđivanjem kalibracijskog materijala Standardne humane plazme s puferskom otopinom OVB prema programu definiranom od strane proizvođača i pohranjenom u analizatoru (Slika 6.). Preporuka je da se kod hemofiličara svako mjerenje aktivnosti FIX koagulacijskom metodom provede u najmanje tri različita razrjeđenja ispitivanog uzorka plazme (Adcock i sur.,2018).



**Slika 6.** Kalibracijska krivulja za određivanje aktivnosti FIX koagulacijskom metodom u jednom stupnju na analizatoru Atellica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka)

Za određivanje aktivnosti FIX koagulacijskom metodom korišteni su sljedeći reagensi:

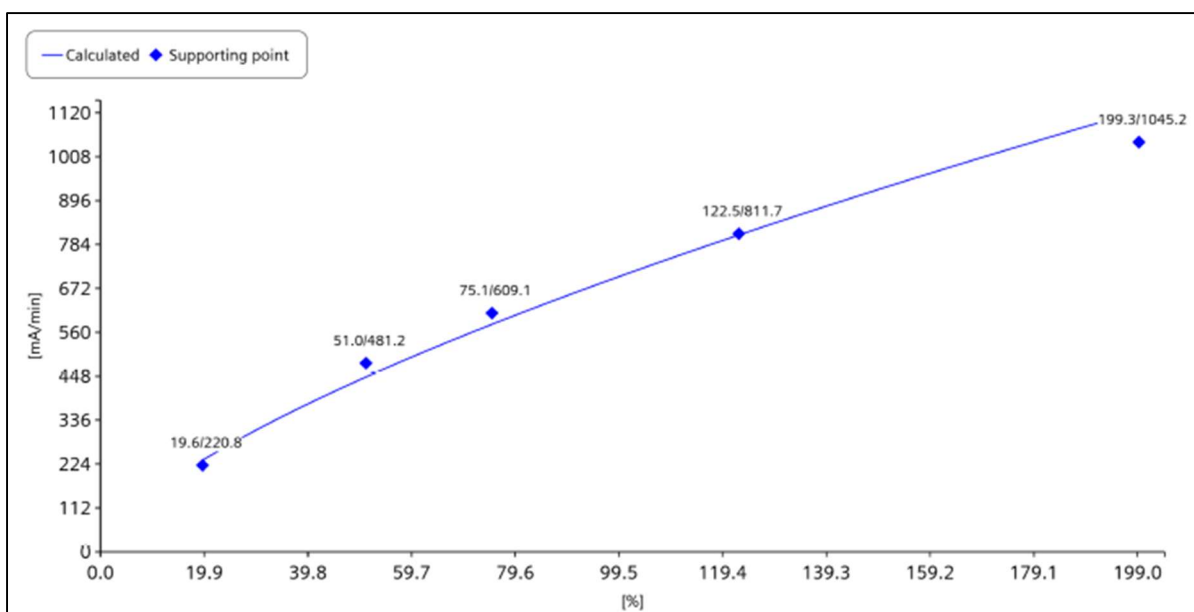
- **Factor IX Deficient Plasma** liofilizirani pripravak ljudske citratne plazme iz koje je FIX uklonjen selektivnom imunoadsorpcijom, ostatna aktivnost FIX u plazmi iznosi <1 % (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). Deficijentna se plazma otopi u 1 mL destilirane vode i ostavi stajati 15 minuta na sobnoj temperaturi prije uporabe.
- **Dade Actin FS Activated PTT Reagent** koji sadrži pročišćene fofoslipide soje u  $1,0 \times 10^{-4}$  M elaginskoj kiselini uz pufer, stabilizator i konzervans (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). Reagens je spreman za upotrebu.
- **Otopina CaCl<sub>2</sub> 25 mM** (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). Reagens je spreman za uporabu.
- **Standard Human Plasma** kalibracijski materijal, liofilizirani pripravak *poola* citratnih plazmi zdravih davatelja u puferskoj otopini HEPES (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). Kalibracijski materijal otopi se u 1 mL destilirane vode, lagano promiješa i ostavi stajati 15 minuta na sobnoj temperaturi prije uporabe.
- Komercijalno dostupni kontrolni uzorci za provedbu unutarnje kontrole kvalitete:  
**Control Plasma N** liofilizirani pripravak *poola* citratnih plazmi zdravih davatelja, stabiliziran puferom HEPES (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka)  
**Control Plasma P** liofilizirani pripravak *poola* citratnih plazmi s patološkim vrijednostima (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka)
- **Puferska otopina Dade Owren's Veronal Buffer (OVB)** (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka)

#### 3.2.2.2. *Kromogena metoda*

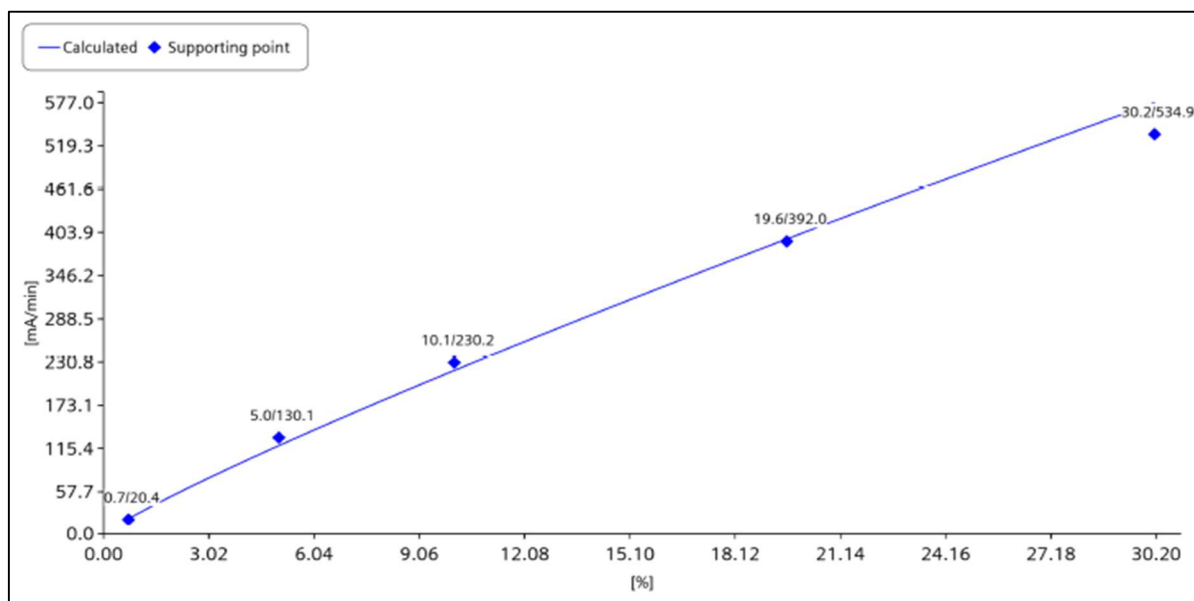
Za određivanje aktivnosti FIX na automatiziranom koagulacijskom analizatoru Atellica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka) korištena je i kromogena metoda upotrebom *BIOPHEN*<sup>TM</sup> FIX komercijalnog testa (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, Francuska). Kromogena metoda odvija se u dva stupnja. U prvom stupnju dolazi do aktivacije FIX iz uzorka u aktivirani oblik FIXa djelovanjem aktiviranog FXIa u prisutnosti fosfolipida i kalcijevih iona. Nastali aktivirani FIXa potom stvara enzimski kompleks s FVIIIa aktiviranim

trombinom te ubrzava aktivaciju FX u aktivirani oblik FXa. U drugom stupnju nastali aktivirani FXa hidrolizira specifični kromogeni supstrat pri čemu nastaje boja p-nitroanilin čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski na 405 nm. Intenzitet nastale boje p-nitroanilina izravno je razmjeran količini FXa, odnosno aktivnosti FIX u uzorku ispitivane plazme (Adcock i sur., 2018).

Analizator automatski očitava aktivnost FIX (%) u ispitivanom uzorku temeljem prethodno izrađene kalibracijske krivulje odnosa intenziteta boje (mA/min) i aktivnosti FIX (%) u razrjeđenjima referentne plazme (Slika 7.). Budući da analizator izdaje izvorne rezultate aktivnosti FIX u postocima, očitane se vrijednosti podijele sa 100 kako bi se dobile aktivnosti FIX u kIU/L. S obzirom na važnost točnog određivanja niskih vrijednosti FIX, uz standardnu kalibracijsku krivulju u normalnom području, s najnižom kalibracijskom točkom 0,20 kIU/L (20 %), priređena je i zasebna kalibracijska krivulja u niskom području gdje je najniža kalibracijska točka iznosila 0,007 kIU/L (0,7 %). Obje kalibracijske krivulje izrađene su u 5 točaka automatskim razrjeđivanjem kalibracijskog materijala s reakcijskim puferom Tris-BSA (BIOPHEN Factor IX R4) prema izvornom programu definiranom od strane proizvođača metodom linearne regresije. „Niska“ kalibracijska krivulja pripremljena je pomoću kalibratora razrijeđenog s FIX deficijntnom plazmom u omjeru 1:10, a korištena je za uzorke čija je aktivnost FIX iznosila  $\leq 0,28$  kIU/L ( $\leq 28$  %) (Slika 8.).



**Slika 7.** Osnovna kalibracijska krivulja u normalnom području za određivanje aktivnosti FIX kromogenom metodom na analizatoru Atellica COAG 360 (Siemens Healthcare,



**Slika 8.** „Niska“ kalibracijska krivulja za određivanje aktivnosti FIX kromogenom metodom na analizatoru Atellica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka)

Za određivanje aktivnosti FIX kromogenom metodom korišten je komercijalno dostupni test *BIOPHEN<sup>TM</sup>* FIX (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, Francuska) koji sadrži sljedeće reagense:

- **Reagens R1:** liofilizirani reagens koji sadrži ljudski faktor X i liofilizirani FVIII aktiviran trombinom. Također sadrži i kalcij klorid dihidrat, bakrov sulfat, inhibitor polimerizacije fibrina i stabilizirajuće tvari (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, Francuska)
- **Reagens R2:** reagens aktivator u liofiliziranom obliku koji sadrži optimalnu količinu ljudskog FXIa, ljudskog trombina, kalcij klorid dihidrata, imidazola, sintetskih fosfolipida i stabilizirajućih tvari (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, Francuska)
- **Reagens R3:** reagens koji sadrži faktor XIa i liofilizirani kromogeni supstrat specifičan za FXa (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, Francuska)
- **Reagens R4:** reakcijski pufer Tris-BSA koji sadrži 1% BSA, PEG, FVIII:C stabilizirajuće tvari i 0,9 g/L natrij azida kao konzervans (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, Francuska). Reagens je spreman za upotrebu.
- **Plasma Calibrator:** liofilizirani pripravak *poola* citratnih plazmi zdravih davatelja (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, Francuska)

- **Plasma Calibrator 1:10:** liofilizirani pripravak *poola* citratnih plazmi zdravih davatelja pomiješan s FIX deficijentnom plazmom u omjeru 1:10 (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, Francuska)
- **Factor IX Deficient Plasma:** liofilizirani pripravak ljudske citratne plazme iz koje je uklonjen FIX selektivnom imunoadsorpcijom: ostatna aktivnost FIX u plazmi iznosi <1 % (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka).
- Komercijalno dostupni kontrolni uzorci za provedbu unutarnje kontrole kvalitete:
  - Normal Control Plasma** liofilizirani pripravak *poola* citratnih plazmi zdravih davatelja, stabiliziran puferom HEPES (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, Francuska)
  - Abnormal Control Plasma** liofilizirani pripravak *poola* citratnih plazmi s patološkim vrijednostima (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, Francuska). Za kontrolu kvalitete „niske“ krivulje navedeni kontrolni uzorci razrijeđeni su s FIX deficijentnom plazmom u omjeru 1:10.

S obzirom na to da reagensi R1, R2 i R3 dolaze u liofiliziranom obliku, prije upotrebe ih je potrebno otopiti u po 2,5 mL destilirane vode te ostaviti stajati na sobnoj temperaturi 30 minuta kako bi se stabilizirali. Kalibracijski materijali kao i deficijentna plazma također dolaze u liofiliziranom obliku pa ih je potrebno otopiti u po 1 mL destilirane vode i ostaviti stajati 15 minuta na sobnoj temperaturi prije upotrebe.

### 3.3. Statistička analiza podataka

Za statističku obradu podataka korišten je statistički program MedCalc, verzija 20.305 (MedCalc, Ostend, Belgija). Ispitivanje normalnosti raspodjele kvantitativnih podataka poput dobi i rezultata laboratorijskih testova provedeno je Shapiro-Wilk testom te su podatci prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom (engl. *interquartile range*, IQR) u slučaju neparametrijske razdiobe, odnosno srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom u slučaju parametrijske razdiobe. Statistički značajna razlika u vrijednostima kvantitativnih podataka, odnosno ispitivanih parametara, između skupina ispitana je Mann-Whitney testom za nezavisne uzorke i Kruskal-Wallisovim testom za nezavisne uzorke. Ovisno o tipu razdiobe, korelacija između dobivenih rezultata ispitana je računanjem Spearmanove korelacije ranga ili Pearsonovog korelacijskog koeficijenta. Za usporedbu ispitivanih metoda provedena je regresijska analiza po Passing-Babloku te Bland-Altmanova analiza kao grafički prikaz razlike između uparenih vrijednosti dviju metoda. Kako bi zadovoljili uvjete statističkog testa, za potrebe statističke analize rezultata koagulacijskih pretraga, rezultatima koji su bili niži od donje granice mjernog područja dodijeljene su vrijednosti donje granice mjernog raspona, što je iznosilo 0,006 kIU/L za vrijednosti FIX dobivene kromogenom metodom, odnosno 0,005 kIU/L za vrijednosti dobivene koagulacijskom metodom u jednom stupnju. Statistički značajnim rezultatima u svim provedenim statističkim analizama smatrani su rezultati kod kojih je  $P < 0,05$ .



## 4. REZULTATI

### 4.1. Opće karakteristike ispitanika

U ispitivanje je bilo uključeno 45 ispitanika muškog spola koji boluju od hemofilije B. Od ukupnog broja ispitanika u trenutku ispitivanja pet ih je primalo nadomjesnu terapiju te su oni promatrani kao zasebna skupina prilikom statističke obrade rezultata. Rezultati analiza i parametara unutar te skupine označeni su slovom „t“. Ukupno je bilo 33 odraslih te 12 pedijatrijskih ispitanika ( $P < 0,001$ ). Medijan starosne dobi ispitanika iznosio je 25 godina s rasponom od 6 do 88 godina. Opće karakteristike ispitanika koji su bili uključeni u istraživanje prikazane su u Tablici 2.

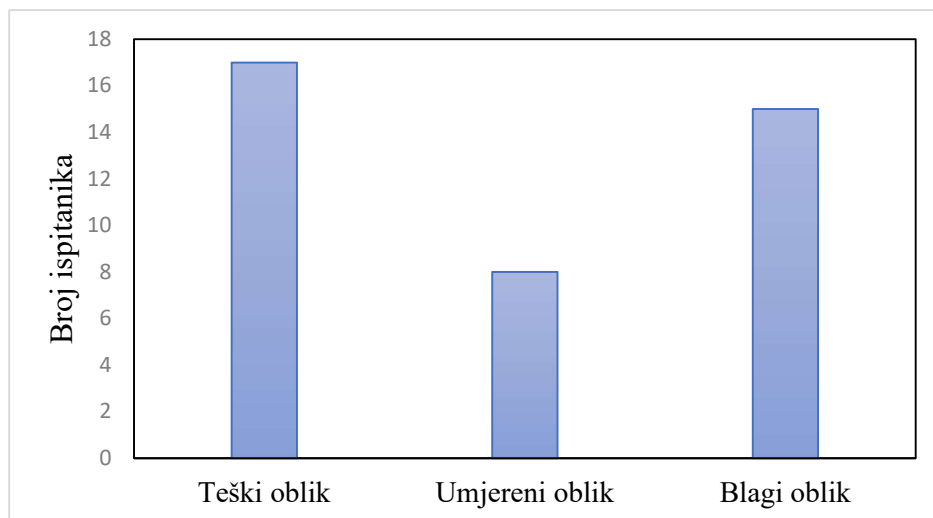
**Tablica 2.** Opće karakteristike ispitanika

<b>Ispitanici, N</b>	45
➤ Odrasli, N (%)	33 (72)
➤ Pedijatrijski, N (%)	12 (27)
<b>Dob ispitanika, medijan godina (raspon)</b>	25 (6-88)
➤ Odrasli, medijan (raspon)	28 (20-88)
➤ Pedijatrijski, medijan (raspon)	11 (6-17)

### 4.2. Klasifikacija ispitanika na temelju aktivnosti FIX izmjerenih koagulacijskom metodom u jednom stupnju

Kako bi se izbjegao utjecaj nadomjesne terapije na dobivene rezultate i osiguralo da izmjerena aktivnost FIX u krvi pacijenata odgovara stvarnoj endogenoj aktivnosti FIX, u klasifikaciju su uključeni samo pacijenti koji u trenutku ispitivanja nisu bili na nadomjesnoj terapiji (dobivena je skupina od 40 pacijenata). Na temelju izmjerenih aktivnosti FIX koagulacijskom metodom u jednom stupnju, od 40 pacijenata uključenih u ispitivanje koji nisu bili na nadomjesnoj terapiji, 17 pacijenata (43 %) klasificirano je kao teški oblik hemofilije B, 8 pacijenata (20 %) kao umjereni oblik hemofilije B i 15 pacijenata (38 %) kao blagi oblik

hemofilije B. Klasifikacija pacijenata na temelju aktivnosti FIX izmjerenih koagulacijskom metodom u jednom stupnju prikazana je na Slici 9.



**Slika 9.** Klasifikacija pacijenata s hemofilijom B s obzirom na težinu bolesti

#### 4.3. Demografski i klinički podatci pacijenata s hemofilijom B

Pregledom medicinske dokumentacije prikupljeni su demografski i klinički podatci o pacijentima klasificiranim prema težini bolesti na temelju vrijednosti FIX dobivenih koagulacijskom metodom u jednom stupnju (Tablica 3.).

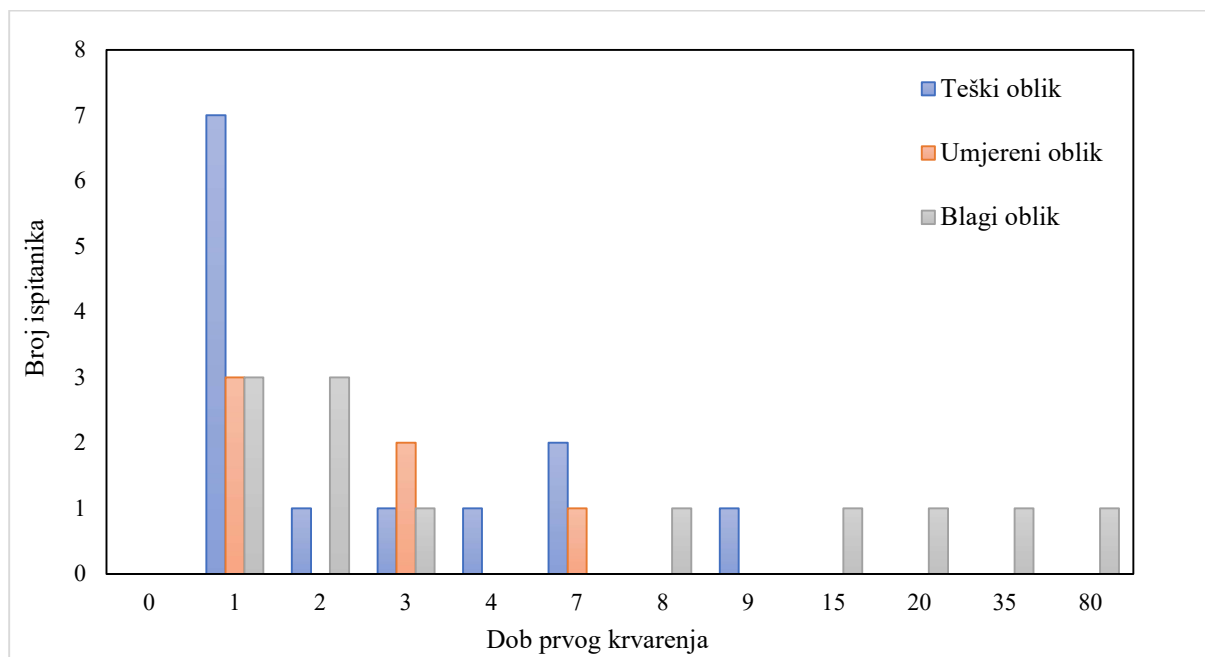
**Tablica 3.** Demografski i klinički podatci pacijenata s hemofilijom B

	HEMOFILIJA B				P*
	Ukupno (N=40)	Blagi oblik (N=15)	Umjereni oblik (N=8)	Teški oblik (N=17)	
<b>Dob ispitanika</b>					
X±SD godina	26,83 ± 16,87	24,80 ± 19,91	21,14 ± 8,23	29,24 ± 15,61	0,582
Medijan godina (raspon)	24 (6-88)	21 (6-88)	22 (9-33)	26 (6-60)	
<b>Pedijatrijski ispitanici</b>					
N (%)	12 (30)	6 (37,5)	2 (28,6)	4 (23,5)	0,984
X±SD godina	10,9 ± 3,8	11,0 ± 3,7	11,0 ± 2,8	10,75 ± 5,19	
Medijan godina (raspon)	11,0 (6-17)	11,0 (6-16)	11,0 (9-13)	10,0 (6-17)	
<b>Odrasli ispitanici</b>					
N (%)	28 (70)	9 (60)	6 (75)	13 (76,5)	0,414
X±SD godina			20,3 ± 13,4		
Medijan godina (raspon)	27,5 (20-88)	27 (21-88)	23 (20-33)	28 (24-60)	
<b>Dob prvog krvarenja</b>					
N	31	12	6	13	0,212
Medijan godina (raspon)	1,5 (0,1-77)	2,3 (0,11-77)	1,5 (0,1-7)	1 (0,3-9)	

\*Kruskal-Wallis test, P<0,05 smatrao se statistički značajnim

Podatci razdijeljeni po normalnoj razdiobi prikazani su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom dok su u slučaju neparametrijske razdiobe prikazani kao medijan s rasponom vrijednosti (minimalna i maksimalna vrijednost).

Na Slici 10. prikazana je raspodjela ispitanika s teškim, umjerenim i blagim oblikom hemofilije B s obzirom na dob pojave prvog krvarenja u životu.



**Slika 10.** Dob prvog krvarenja u pacijenata s teškim, umjerenim i blagim oblikom hemofilije B

#### 4.4. Usporedba rezultata koagulacijskih pretraga

U Tablici 4. prikazani su rezultati određivanja APTV-a te aktivnosti FIX određenih kromogenom metodom (FIXkr) i koagulacijskom metodom u jednom stupnju (FIXkgl) u bolesnika s hemofilijom B i kontrolnoj skupini. Statističkom analizom utvrđene su statistički značajno više vrijednosti APTV-a te niže aktivnosti FIXkgl i FIXkr u skupini bolesnika s hemofilijom B u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,001$ ).

**Tablica 4.** Rezultati mjerenja APTV-a, FIXkgl i FIXkr u bolesnika s hemofilijom B i u kontrolnoj skupini

	<b>Hemofilija B (N=40)</b>	<b>Kontrolna skupina (N=40)</b>	<b>P*</b>
<b>APTV (s)</b>	45,3 (36,6-53,8)†	25,8 (24,6-29,1)†	<b>&lt;0,001</b>
<b>FIXkgl (kIU/L)</b>	0,03 (0,005-0,10)†	0,94 ± 0,18§	<b>&lt;0,001</b>
<b>FIXkr (kIU/L)</b>	0,03 (0,006-0,08)†	0,86 ± 0,17§	<b>&lt;0,001</b>

§ Rezultati prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

† Rezultati prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

\*Mann-Whitney test za parne uzorke, P<0,05 smatrao se statistički značajnim

Rezultati određivanja APTV-a te aktivnosti FIX određenih kromogenom metodom (FIXkr) i koagulacijskom metodom u jednom stupnju (FIXkgl) u tri skupine bolesnika s hemofilijom B s obzirom na težinu bolesti (blagi, umjereni i teški oblik) prikazani su u Tablici 5. Statističkom analizom utvrđene su statistički značajno više vrijednosti APTV-a te niže vrijednosti FIXkgl u bolesnika s težim oblikom u odnosu na bolesnike s blagim i umjerenim oblikom hemofilije B (P<0,001). Statistički značajna razlika je uočena i kod aktivnosti FIX određenih kromogenom metodom između svih skupina ispitanika (P<0,001).

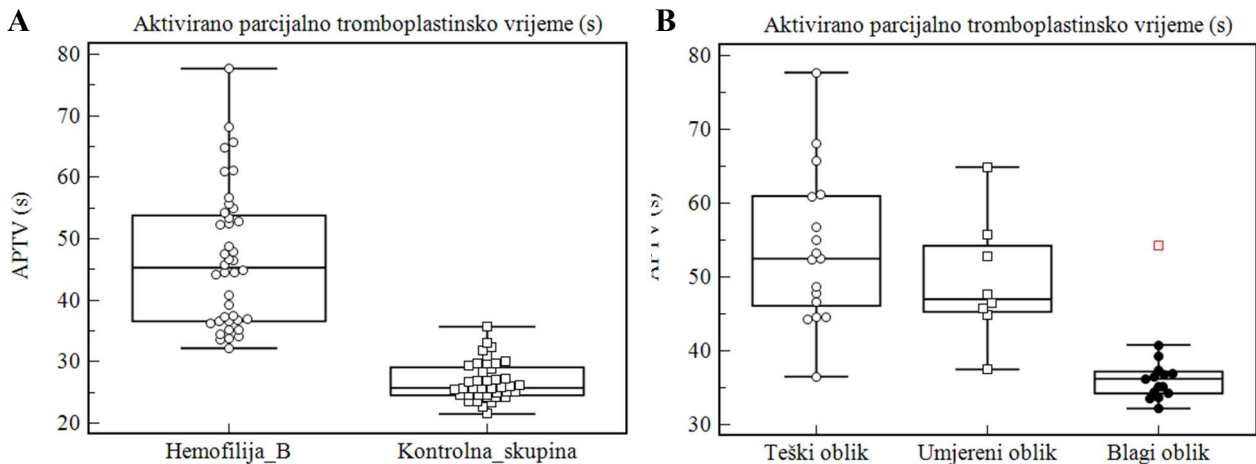
**Tablica 5.** Rezultati mjerenja APTV-a, FIXkgl i FIXkr u bolesnika s hemofilijom B podijeljenih u skupine s obzirom na težinu bolesti

	<b>HEMOFILIJA B</b>			<b>P*</b>
	<b>Blagi oblik (N=15)</b>	<b>Umjereni oblik (N=8)</b>	<b>Teški oblik (N=17)</b>	
<b>APTV (s)</b>	36,2 (34,3-37,2) †	47,0 (45,3-54,2) †	52,5 (46,1-61,0) †	<b>&lt;0,001</b>
<b>FIXkgl (kIU/L)</b>	0,12 (0,08-0,17) †	0,03 (0,02-0,04) †	0,005 (0,005-0,005) †	<b>&lt;0,001</b>
<b>FIXkr (kIU/L)</b>	0,10 (0,06-0,15) †	0,008 (0,006-0,035) †	0,01 (0,006-0,02) †	<b>&lt;0,001</b>

† Rezultati prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

\*Kruskal-Wallis test, P<0,05 smatrao se statistički značajnim

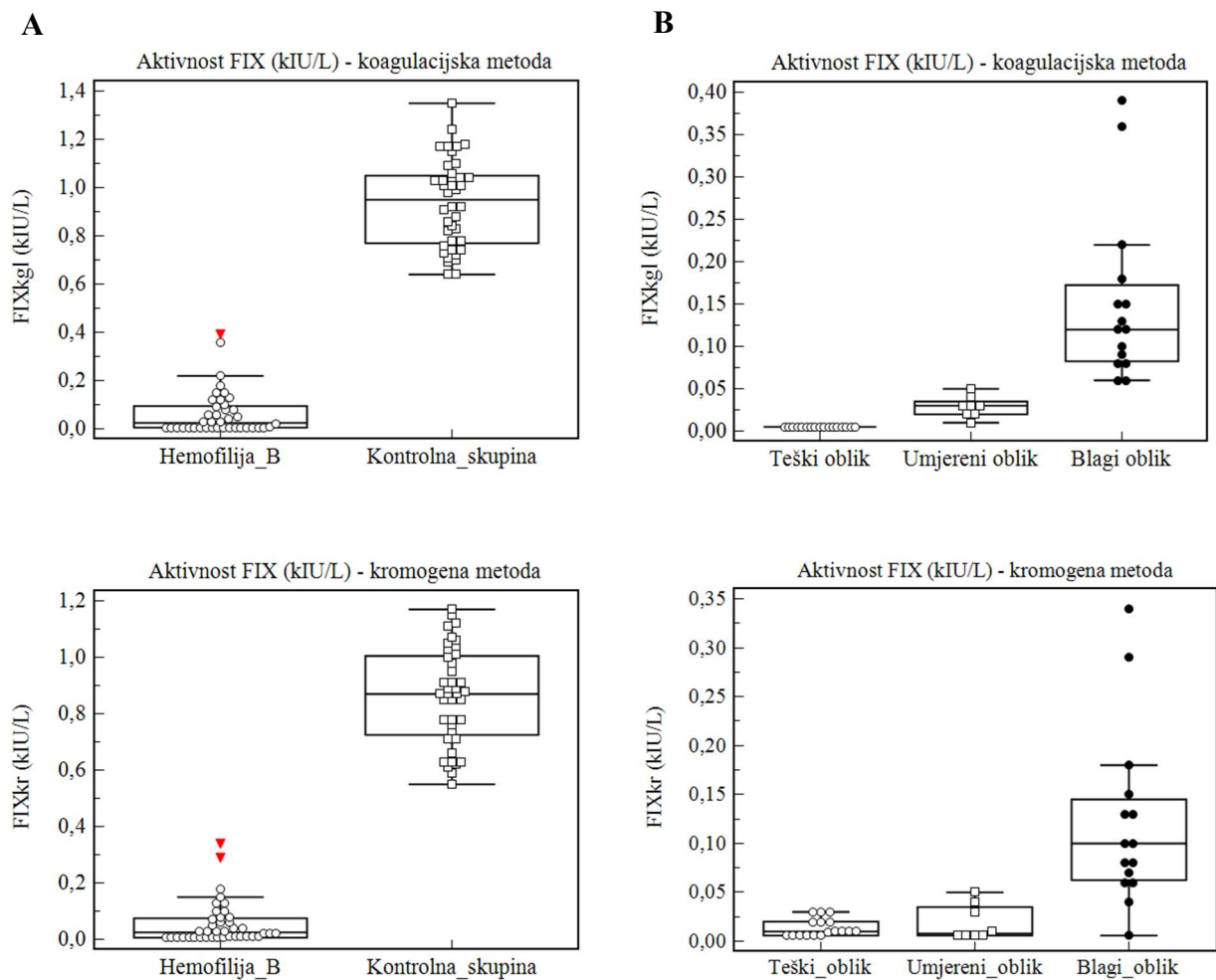
Grafički prikaz usporedbe rezultata APTV-a između svih pacijenata s hemofilijom B i kontrolne skupine (A) te pojedinih skupina pacijenata s blagim, umjerenim i teškim oblikom hemofilije B (B) prikazan je na Slici 11.



**Slika 11.** Grafički prikaz usporedbe rezultata mjerenja APTV-a u skupini pacijenata s hemofilijom B i kontrolnoj skupini (A) te skupini pacijenata s teškim, umjerenim i blagim oblikom hemofilije B (B)

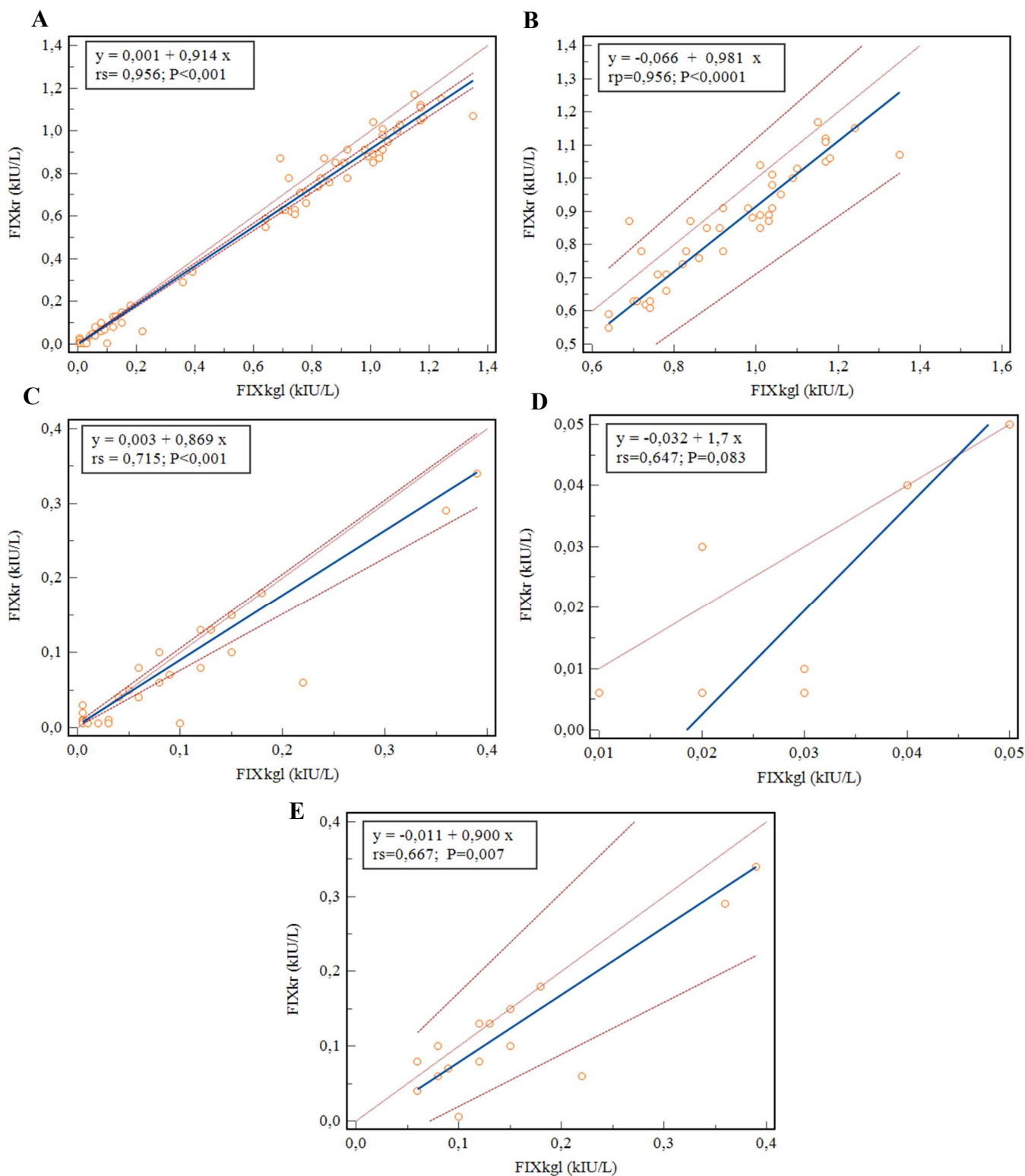
#### 4.5. Usporedba određivanja aktivnosti FIX koagulacijskom i kromogenom metodom

Rezultati usporedbe određivanja FIX koagulacijskom i kromogenom metodom (FIXkgl i FIXkr) prikazani su u Tablicama 4. i 5. dok je grafička usporedba prikazana na Slici 12. Statistički značajna razlika u vrijednostima FIXkgl i FIXkr utvrđena je između skupine svih bolesnika s hemofilijom B i kontrolne skupine (A) te pojedinih skupina pacijenata s težim, umjerenim i blagim oblikom hemofilije B (B) ( $P < 0,001$ ).

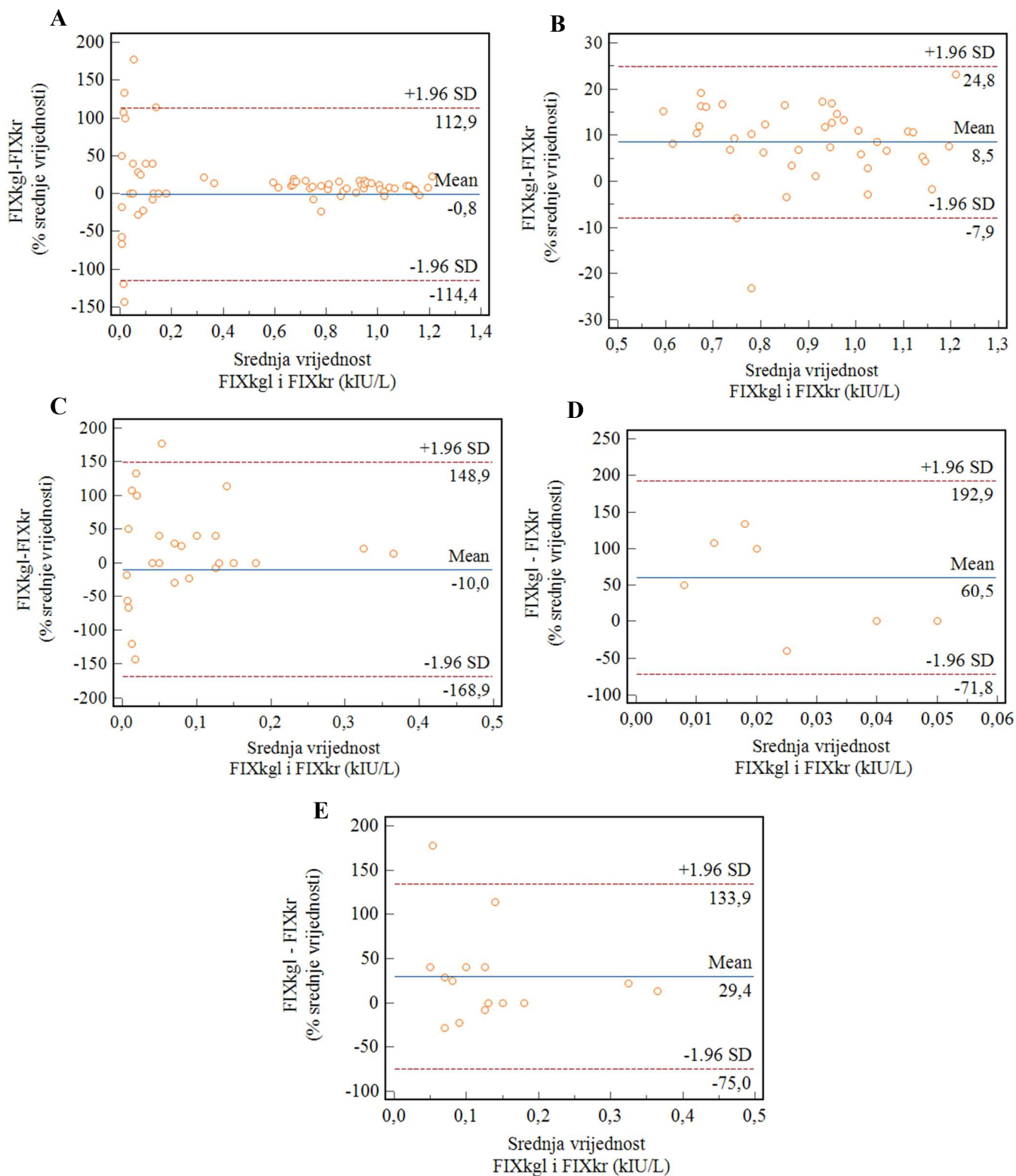


**Slika 12.** Grafički prikaz usporedbe rezultata određivanja FIX koagulacijskom (FIXkgl) i kromogenom metodom (FIXkr) u skupini pacijenata s hemofilijom B i kontrolnoj skupini (A) te skupini pacijenata s teškim, umjerenim i blagim oblikom hemofilije B (B)

Regresijska analiza po Passing-Babloku i korelacija dobivenih rezultata određivanja FIX koagulacijskom i kromogenom metodom u ukupnom broju uzoraka te pojedinim skupinama pacijenata prikazana je na Slici 13. Za skupinu pacijenata s teškim oblikom hemofilije B nije bilo moguće napraviti Passing-Bablok analizu, stoga je prikazana usporedba i korelacija metoda samo za skupine pacijenata s umjerenim i blagim oblikom hemofilije B. Grafički prikaz usporedbe dviju metoda prema Bland-Altmanu u ukupnom broju uzoraka i pojedinim skupinama pacijenata prikazan je na Slici 14.



**Slika 13.** Regresijska analiza po Passing-Babloku dviju metoda za određivanje aktivnosti FIX za: (A) ukupni broj uzoraka; (B) kontrolnu skupinu; (C) skupinu pacijenata s hemofilijom B; (D) skupinu pacijenata s umjerenim oblikom hemofilije B; (E) skupinu pacijenata s blagim oblikom hemofilije B ( $r_s$  – Spearmanov koeficijent korelacije,  $r_p$  – Pearsonov koeficijent korelacije)



**Slika 14.** Grafički prikaz Bland-Altman analize za usporedbu dviju metoda za određivanje aktivnosti FIX za: (A) ukupni broj uzoraka; (B) kontrolnu skupinu; (C) skupinu svih pacijenata s hemofilijom B; (D) skupinu pacijenata s umjerenim oblikom hemofilije B; (E) skupinu pacijenata s blagim oblikom hemofilije B



Statistički značajna razlika između FIXkgl i FIXkr utvrđena je Wilcoxonovim testom za parne uzorke u ukupnom broju uzoraka i kontrolnoj skupini ( $P < 0,001$ ), skupini pacijenata s blagim oblikom hemofilije B ( $P = 0,018$ ) te skupini pacijenata s teškim oblikom hemofilije B ( $P < 0,001$ ). Statistički značajna razlika nije utvrđena u skupini svih pacijenata s hemofilijom B ( $P = 0,594$ ) te skupini s umjerenim oblikom hemofilije B ( $P = 0,074$ ). Napravljena je i korelacija rezultata APTV-a, FIXkgl i FIXkr s dobi prvog krvarenja u ukupnom broju kao i pojedinim skupinama pacijenata s hemofilijom B, a rezultati su prikazani u Tablici 6.

**Tablica 6.** Korelacija rezultata APTV-a, FIXkgl i FIXkr s dobi prvog krvarenja u pacijenata s hemofilijom B

	N	APTV (s) r (P)	FIXkgl (kIU/L) r (P)	FIXkr (kIU/L) r (P)
<b>Hemofilija B ukupno</b>				
<b>Dob prvog krvarenja</b>	31	-0,268 (0,145)†	0,313 (0,086)†	0,322 (0,077)†
<b>Hemofilija B blagi oblik</b>				
<b>Dob prvog krvarenja</b>	12	-0,459 (0,134)†	<b>0,716 (0,009)†</b>	0,406 (0,190)†
<b>Hemofilija B umjereni oblik</b>				
<b>Dob prvog krvarenja</b>	5	0,429 (0,397) † 0,541 (0,268)*‡	-0,390 (0,445)†	0,091 (0,864) †
<b>Hemofilija B teški oblik</b>				
<b>Dob prvog krvarenja</b>	13	-0,201 (0,510) † -0,278 (0,359)*‡	0 (1,00)*‡	0,041 (0,895)† 0,051 (0,868)*‡

r-koeficijent korelacije; P-statistička značajnost, ‡Pearsonov koeficijent korelacije; † Spearmanov koeficijent korelacije; \*Logaritamska transformacija podataka

U Tablici 6. prikazani su koeficijenti korelacije u ukupnom broju pacijenata s hemofilijom B te pojedinim skupinama pacijenata. U slučaju bolje povezanosti dobivene logaritamskom transformacijom podataka, dodatno su prikazani i koeficijenti korelacije nakon logaritamske transformacije. Uočena je dobra povezanost rezultata FIXkgl s dobi prvog krvarenja kod pacijenata s blagim oblikom bolesti dok u ukupnom broju pacijenata te skupini pacijenata s teškim i umjerenim oblikom bolesti statistički značajna povezanost nije uočena. Rezultati APTV-a i FIXkr nisu pokazali statistički značajnu povezanost s kliničkim pokazateljem ni u jednoj skupini pacijenata s hemofilijom B. Također, napravljena je i korelacija rezultata

APTV-a, FIXkgl i FIXkr s dobi prvog krvarenja u skupinama pedijatrijskih i odraslih pacijenata s hemofilijom B te su rezultati prikazani u Tablici 7. Nije uočena statistički značajna povezanost rezultata APTV-a i FIXkr s dobi prvog krvarenja ni u jednoj skupini pacijenata. Međutim, uočena je dobra povezanost rezultata FIXkgl s dobi prvog krvarenja u skupini odraslih ispitanika s hemofilijom B.

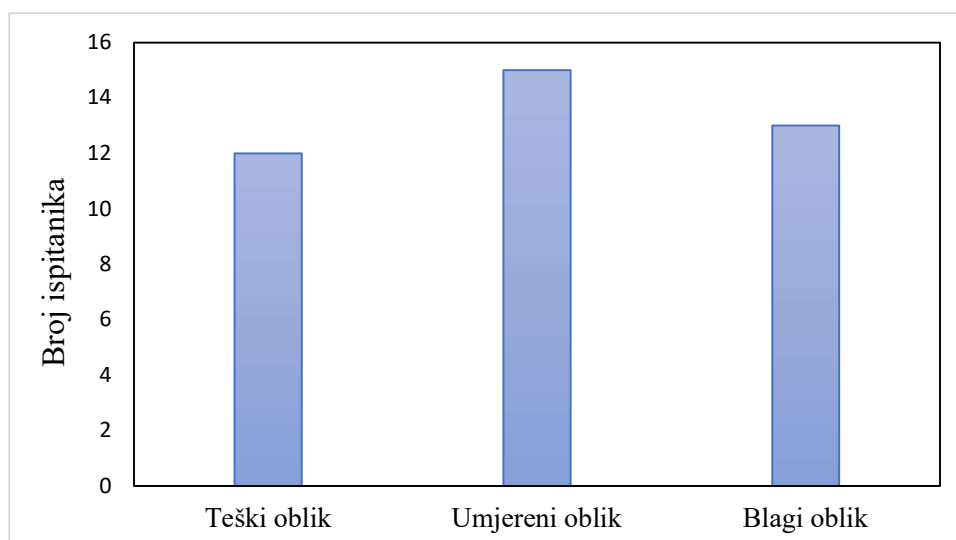
**Tablica 7.** Korelacija rezultata APTV-a, FIXkgl i FIXkr s dobi prvog krvarenja u skupinama pedijatrijskih i odraslih pacijenata s hemofilijom B

	N	APTV (s) r (P)	FIXkgl (kIU/L) r (P)	FIXkr (kIU/L) r (P)
<b>Hemofilija B ukupno</b>				
<b>Dob prvog krvarenja</b>	31	-0,268 (0,145) †	0,313 (0,086)†	0,322 (0,077)†
<b>Hemofilija B pedijatrijski ispitanici</b>				
<b>Dob prvog krvarenja</b>	11	-0,223 (0,509) † -0,2877 (0,391)‡*	0,258 (0,444)†	0,455 (0,160)†
<b>Hemofilija B odrasli ispitanici</b>				
<b>Dob prvog krvarenja</b>	20	-0,432 (0,057)†	<b>0,468 (0,037)†</b>	0,387 (0,092)†

r-koeficijent korelacije; P-statistička značajnost, ‡Pearsonov koeficijent korelacije; † Spearmanov koeficijent korelacije; \*Logaritamska transformacija podataka

#### 4.6. Klasifikacija ispitanika na temelju aktivnosti FIX izmjerenih kromogenom metodom

Kako bi se izbjegao utjecaj nadomjesne terapije na dobivene rezultate i osiguralo da izmjerena aktivnost FIX u krvi pacijenata odgovara stvarnoj endogenoj aktivnosti FIX, kao i u slučaju klasifikacije koagulacijskom metodom uključeni su samo pacijenti koji nisu bili na nadomjesnoj terapiji (dobivena je skupina od 40 pacijenata). Na temelju izmjerenih aktivnosti FIX kromogenom metodom, od 40 pacijenata uključenih u ispitivanje koji nisu bili na nadomjesnoj terapiji, 12 pacijenata (30 %) klasificirano je kao teški oblik hemofilije B, 15 pacijenata (38 %) kao umjereni oblik hemofilije B te 13 pacijenata (33 %) kao blagi oblik hemofilije B. Klasifikacija pacijenata na temelju aktivnosti FIX izmjerenih kromogenom metodom prikazana je na Slici 15.



**Slika 15.** Klasifikacija pacijenata s hemofilijom B kromogenom metodom u skupine s obzirom na težinu bolesti

#### 4.6.1. Demografski i klinički podatci

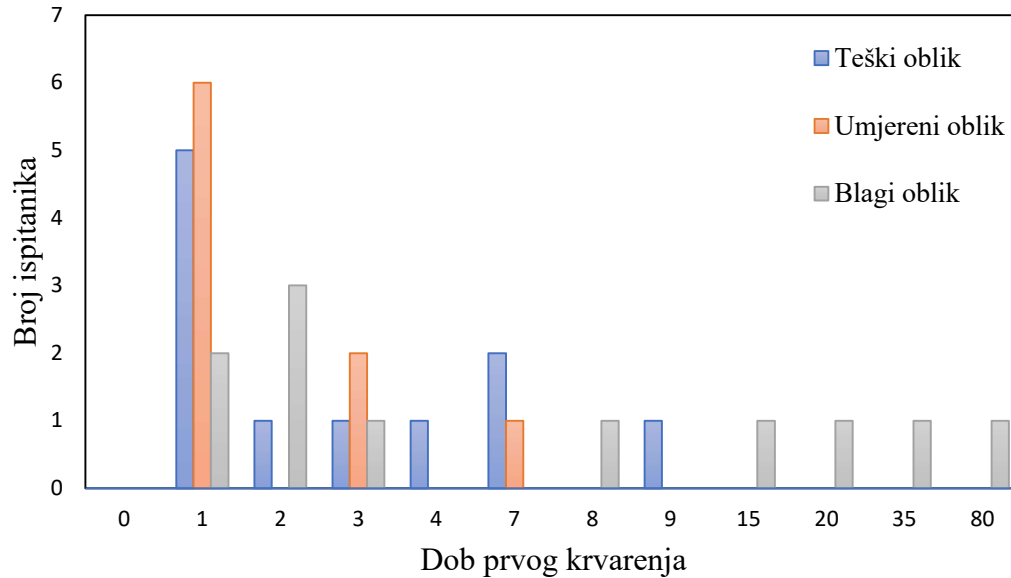
Demografski i klinički podatci o pacijentima prikupljeni su pregledom medicinske dokumentacije (Tablica 8.). Podatci razdijeljeni po normalnoj razdiobi prikazani su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom dok su u slučaju neparametrijske razdiobe prikazani kao medijan s rasponom vrijednosti (minimalna i maksimalna vrijednost).

**Tablica 8.** Demografski i klinički podatci pacijenata s hemofilijom B klasificiranih u skupine kromogenom metodom

	HEMOFILIJA B				P*
	Ukupno (N=40)	Blagi oblik (N=13)	Umjereni oblik (N=15)	Teški oblik (N=12)	
<b>Dob ispitanika</b>					<b>0,025</b>
X±SD godina	26,83 ± 16,87	25,92 ± 20,91	33,67 ± 16,53	19,25 ± 7,50	
Medijan godina (raspon)	24 (6-88)	21 (6-88)	32 (7-60)	22,5 (6-27)	
<b>Pedijatrijski ispitanici</b>					0,826
N (%)	12 (30)	5 (35,7)	3 (21,4)	4 (33,3)	
X±SD godina	10,9 ± 3,8	11,6 ± 3,8	11,00 ± 3,46	10,00 ± 4,83	
Medijan godina (raspon)		12 (6-16)	13 (7-13)	8,5 (6-17)	
<b>Odrasli ispitanici</b>					<b>0,005</b>
N (%)	28 (70)	8 (61,5)	12 (80)	8 (66,6)	
X±SD godina				23,9 ± 2,2	
Medijan godina (raspon)	27,5 (20-88)	26,5 (21-88)	33 (26-60)	24 (20-27)	
<b>Dob prvog krvarenja</b>					0,140
N	31	11	9	11	
Medijan godina (raspon)	1,5 (0,1-77)	3 (0,11-77)	1 (0,11-7)	2 (0,1-9)	

\*Kruskal-Wallis test, P<0,05 smatrao se statistički značajnim

Na Slici 16. prikazana je raspodjela ispitanika s teškim, umjerenim i blagim oblikom hemofilije B s obzirom na dob pojave prvog krvarenja u životu.



**Slika 16.** Dob prvog krvarenja (A) u pacijenata s teškim, umjerenim i blagim oblikom hemofilije B (klasifikacija kromogenom metodom)

#### 4.6.2. Usporedba rezultata koagulacijskih pretraga

Rezultati određivanja APTV-a te aktivnosti FIX određenih kromogenom metodom (FIXkr) i koagulacijskom metodom u jednom stupnju (FIXkgl) u tri skupine bolesnika s hemofilijom B (blagi, umjereni i teški oblik) prikazani su u Tablici 9. Podjela ispitanika u skupine s obzirom na težinu bolesti napravljena je na temelju vrijednosti FIX dobivenih kromogenom metodom. Statističkom analizom utvrđene su statistički značajno više vrijednosti APTV-a te niže vrijednosti FIXkgl i FIXkr kod bolesnika s težim oblikom u odnosu na bolesnike s blagim i umjerenim oblikom hemofilije B ( $P < 0,001$ ). Također, u skupini pacijenata s teškim oblikom hemofilije B, aktivnosti FIX određene kromogenom metodom bile su više u odnosu na aktivnosti određene koagulacijskom metodom u jednom stupnju.

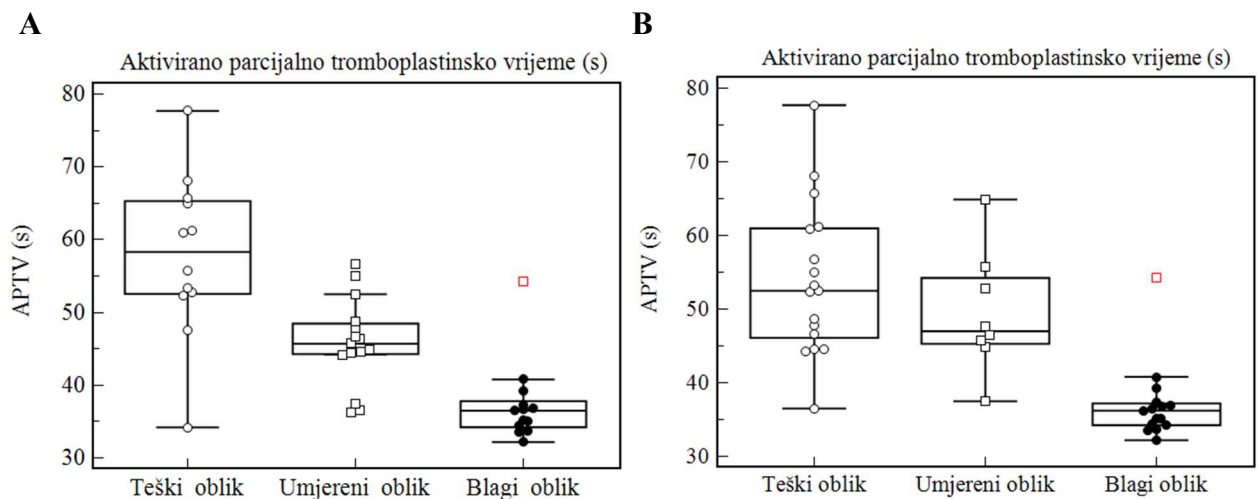
**Tablica 9.** Rezultati mjerenja APTV-a, FIXkgl i FIXkr u bolesnika s hemofilijom B klasificiranih u skupine kromogenom metodom

	HEMOFILIJA B			P*
	Blagi oblik (N=13)	Umjereni oblik (N=15)	Teški oblik (N=12)	
APTV (s)	36,5 (34,2-37,8) †	45,7 (44,3-48,5) †	58,3 (52,6-65,3) †	<0,001
FIXkgl (kIU/L)	0,13 (0,09-0,19) †	0,005 (0,005-0,03) †	0,005 (0,005-0,025) †	<0,001
FIXkr (kIU/L)	0,1 (0,08-0,16) †	0,02 (0,01-0,03) †	0,006 (0,006-0,006) †	<0,001

† Rezultati prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

\*Kruskal-Wallis test, P<0,05 smatrao se statistički značajnim

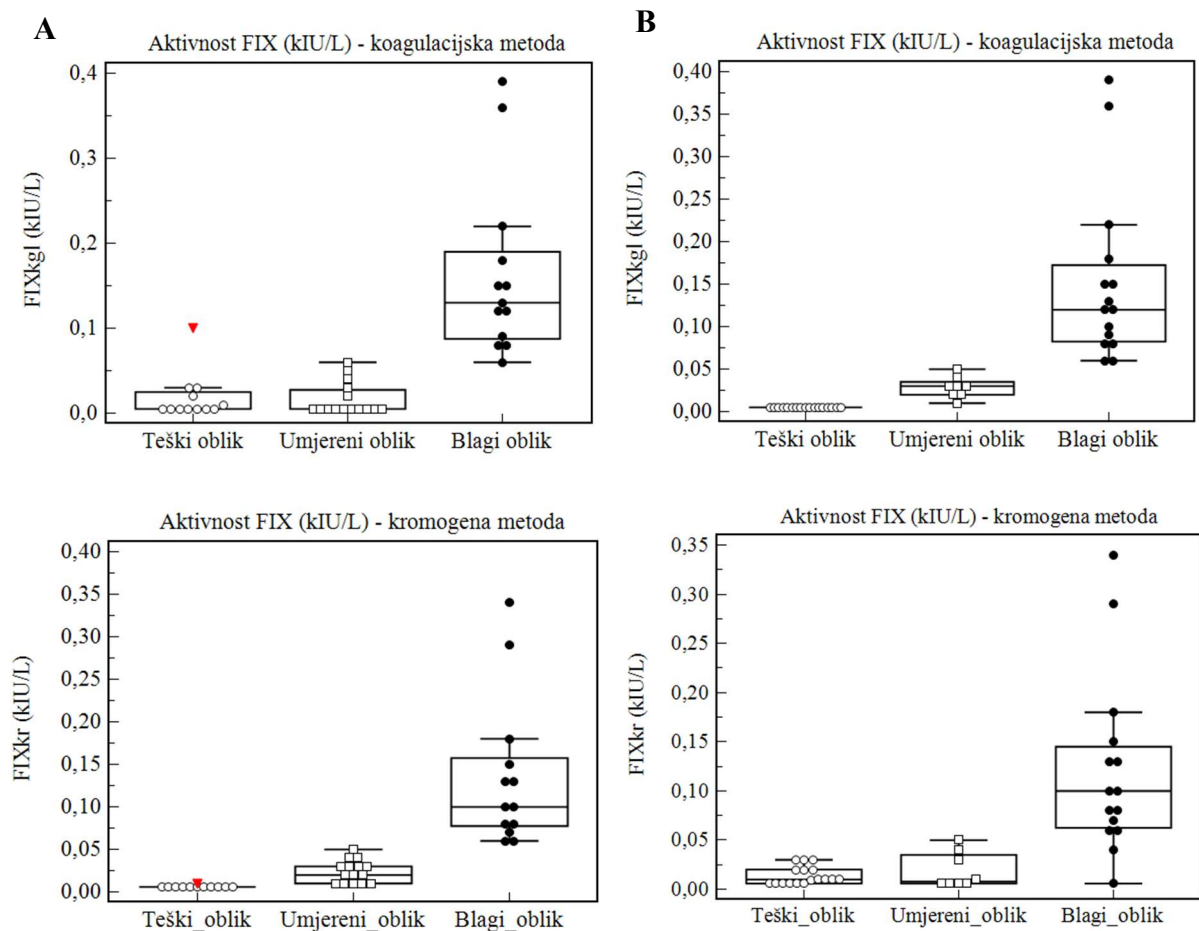
Na Slici 17. grafički je prikazana usporedba rezultata APTV-a u skupinama pacijenata s blagim, umjerenim i teškim oblikom hemofilije B kada je klasifikacija u skupine napravljena na temelju aktivnosti FIX dobivenih kromogenom metodom (A) i koagulacijskom metodom (B).



**Slika 17.** Grafički prikaz usporedbe rezultata mjerenja APTV-a u pacijenata s hemofilijom B podijeljenih u skupine na temelju klasifikacije: (A) kromogenom metodom; (B) koagulacijskom metodom

### 4.6.3. Usporedba određivanja aktivnosti FIX koagulacijskom i kromogenom metodom

Rezultati usporedbe određivanja FIX koagulacijskom i kromogenom metodom (FIXkgl i FIXkr) prikazani su u Tablici 9. dok je grafička usporedba prikazana na Slici 18. (A). Utvrđena je statistički značajna razlika u vrijednostima FIXkgl i FIXkr između pojedinih skupina pacijenata s teškim, umjerenim i blagim oblikom hemofilije B ( $P < 0,001$ ). Također, na Slici 18. prikazana je i usporedba aktivnosti FIX određenih s obje metode u pacijenata s hemofilijom B podijeljenih u skupine na temelju klasifikacije koagulacijskom metodom (B).



**Slika 18.** Grafički prikaz usporedbe određivanja aktivnosti FIX koagulacijskom i kromogenom metodom u pacijenata s hemofilijom B podijeljenih u skupine na temelju klasifikacije: (A) kromogenom metodom; (B) koagulacijskom metodom

#### 4.6.4. Korelacija rezultata APTV-a, FIXkgl i FIXkr s dobi prvog krvarenja

Napravljena je i korelacija rezultata koagulacijskih pretraga s dobi prvog krvarenja u ukupnom broju pacijenata s hemofilijom B kao i u pojedinim skupinama pacijenata klasificiranih kromogenom metodom, a rezultati su prikazani u Tablici 10.

**Tablica 10.** Korelacija rezultata APTV-a, FIXkgl i FIXkr s dobi prvog krvarenja u pacijenata s hemofilijom B klasificiranih u skupine prema rezultatima dobivenim kromogenom metodom

	N	APTV (s) r (P)	FIXkgl (kIU/L) r (P)	FIXkr (kIU/L) r (P)
<b>Hemofilija B ukupno</b>				
<b>Dob prvog krvarenja</b>	31	-0,268 (0,145)†	0,313 (0,086)†	0,322 (0,077)†
<b>Hemofilija B blagi oblik</b>				
<b>Dob prvog krvarenja</b>	11	-0,600 (0,051)†	<b>0,715 (0,013)†</b>	0,288 (0,391)†
<b>Hemofilija B umjereni oblik</b>				
<b>Dob prvog krvarenja</b>	9	0,358 (0,343)† 0,599 (0,089)*‡	-0,306 (0,423) † -0,363 (0,337) *‡	-0,11 (0,80)†
<b>Hemofilija B teški oblik</b>				
<b>Dob prvog krvarenja</b>	11	-0,187 (0,582)†	-0,227 (0,501)† -0,323 (0,333)*‡	0,352 (0,289)†

r-koeficijent korelacije; P-statistička značajnost, ‡Pearsonov koeficijent korelacije; † Spearmanov koeficijent korelacije; \*Logaritamska transformacija podataka

U Tablici 10. prikazani su koeficijenti korelacije u ukupnom broju pacijenata s hemofilijom B te pojedinim skupinama pacijenata klasificiranih kromogenom metodom. U slučaju bolje povezanosti dobivene logaritamskom transformacijom podataka, dodatno su prikazani i koeficijenti korelacije nakon logaritamske transformacije. Uočena je dobra povezanost rezultata FIXkgl s dobi prvog krvarenja u pacijenata s blagim oblikom hemofilije B dok u ukupnom broju pacijenata te skupini pacijenata s teškim i umjerenim oblikom bolesti statistički značajna povezanost nije uočena. Rezultati APTV-a i FIXkr nisu pokazali statistički značajnu povezanost s kliničkim pokazateljem ni u jednoj skupini pacijenata s hemofilijom B.

#### 4.7. Prikaz nepodudarnih rezultata klasifikacije kromogenom metodom i koagulacijskom metodom u jednom stupnju

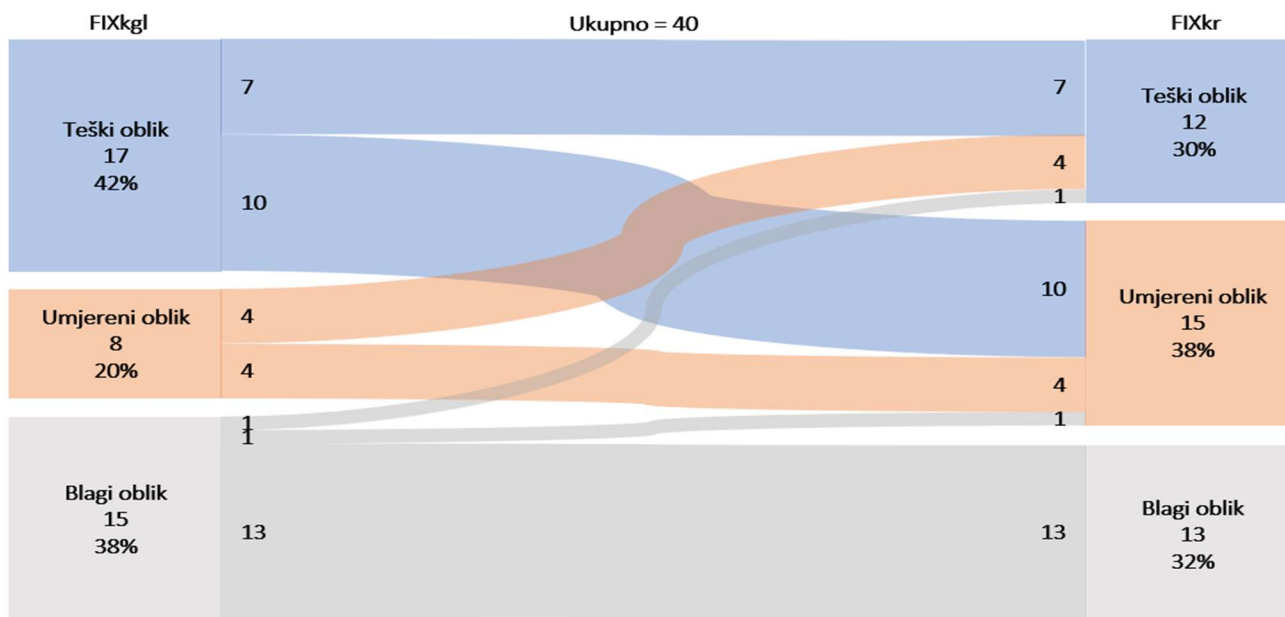
U Tablici 11. prikazana je klasifikacija pacijenata s hemofilijom B na temelju aktivnosti FIX dobivenih kromogenom metodom i koagulacijskom metodom u jednom stupnju, odnosno prikazano je koliko je pacijenata zadržalo istu klasifikaciju s obzirom na korištenu metodu, a koliko ih je bilo nepodudarnih. Najviše je odstupanja u klasifikaciji s obje metode uočeno kod teškog i umjerenog oblika hemofilije B. Za razliku od toga u pacijenata s blagim oblikom hemofilije B klasificiranih kromogenom metodom nisu uočena odstupanja u odnosu na klasifikaciju koagulacijskom metodom. U svrhu jasnijeg pregleda odstupanja u klasifikaciji s obzirom na primijenjenu metodu napravljen je i grafički prikaz koji je prikazan na Slici 19.

**Tablica 11.** Prikaz odstupanja u klasifikaciji pacijenata s hemofilijom B

	Klasifikacija prema FIXkgl		Klasifikacija prema FIXkr	
	N (FIXkgl)	N (FIXkr)	N (FIXkr)	N (FIXkgl)
Teški oblik	17	teški oblik - 7 umjereni oblik - 10	12	teški oblik - 7 umjereni oblik - 4 blagi oblik - 1
Umjereni oblik	8	umjereni oblik - 4 teški oblik - 4	15	umjereni oblik - 4 teški oblik - 10 blagi oblik - 1
Blagi oblik	15	blagi oblik - 13 umjereni oblik - 1 teški oblik - 1	13	blagi oblik - 13

N-broj pacijenata





Slika 19. Usporedba klasifikacija pacijenata s hemofilijom B prema FIXkgl i FIXkr

#### 4.8. Rezultati ispitivanja na nadomjesnoj terapiji

Kako bi se izbjegao utjecaj nadomjesne terapije na dobivene rezultate, skupina pacijenata koji su u trenutku ispitivanja primali nadomjesnu terapiju statistički je zasebno obrađena. Skupinu pacijenata na nadomjesnoj terapiji činilo je 5 (13 %) muških ispitanika raspona starosne dobi od 21 do 67 godina.

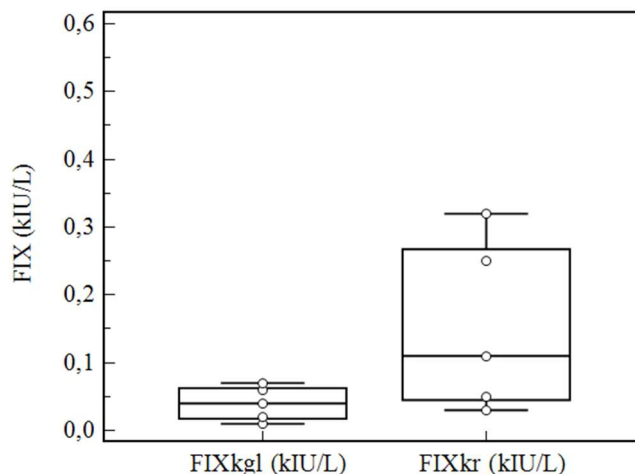
Rezultati usporedbe određivanja FIX kromogenom i koagulacijskom metodom prikazani su u Tablici 12., a grafička je usporedba prikazana na Slici 20. Statističkom analizom Wilcoxonovim testom za parne uzorke nije uočena statistički značajna razlika u vrijednostima FIX određene kromogenom metodom u odnosu na vrijednosti određene koagulacijskom metodom ( $P=0,063$ ).

Tablica 12. Rezultati određivanja FIX koagulacijskom i kromogenom metodom u pacijenata s hemofilijom B na nadomjesnoj terapiji

	FIXkgl - t (kIU/L)	FIXkr - t (kIU/L)	P*
Ispitanici na nadomjesnoj terapiji N=5	0,04 (0,02-0,06) †	0,11 (0,05-0,27) †	0,063

† Rezultati prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

\*Wilcoxon test za parne uzorke,  $P<0,05$  smatrao se statistički značajnim



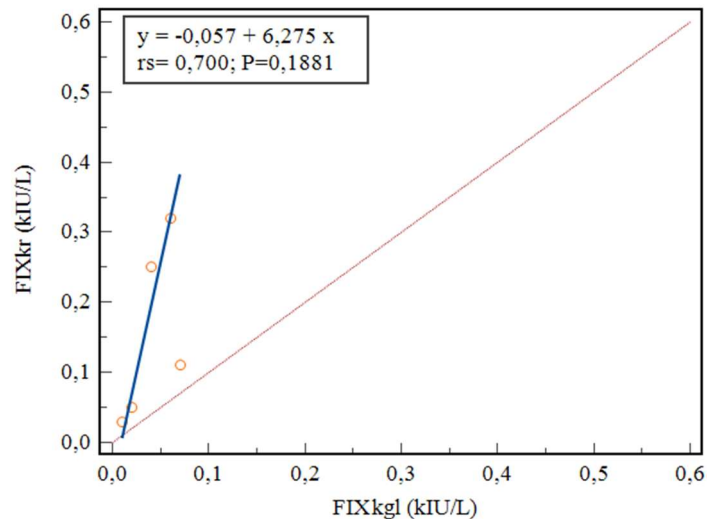
**Slika 20.** Grafički prikaz usporedbe rezultata određivanja FIX koagulacijskom i kromogenom metodom u pacijenata na nadomjesnoj terapiji

S obzirom na to da je svaki pacijent u trenutnu provedbe istraživanja primao različitu nadomjesnu terapiju, u Tablici 13. prikazano je koju je terapiju pojedini pacijent primao, a prikazane su i izmjerene aktivnosti FIX koagulacijskom i kromogenom metodom za svakog pacijenta.

**Tablica 13.** Prikaz nadomjesne terapije i izmjerenih aktivnosti FIX koagulacijskom i kromogenom metodom

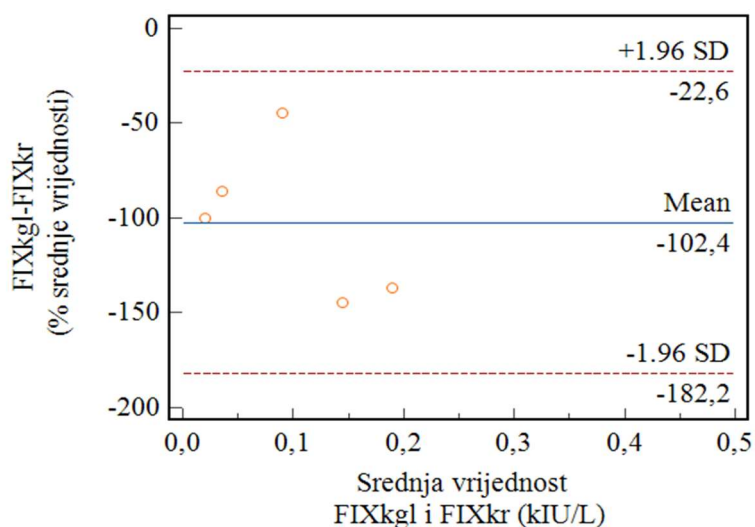
Pacijent	FIXkgl (kIU/L)	FIXkr (kIU/L)	Generičko ime lijeka	Proizvođač	Zaštićeno ime lijeka
1	0,01	0,03	koagulacijski faktor IX	Octapharma	Octanine F
2	0,02	0,05	rekombinantni faktor IXFc (eftrenakog alfa)	Biogen Inc.	Alprolix
3	0,06	0,32	rekombinantni ljudski faktor IX (nonakog beta pegol)	Novo Nordisk	Refixia
4	0,04	0,25	rekombinantni ljudski faktor IX (nonakog beta pegol)	Novo Nordisk	Refixia
5	0,07	0,11	rekombinantni faktor IXFc (eftrenakog alfa)	Biogen Inc.	Alprolix

U svrhu usporedbe dviju metoda napravljena je i regresijska analiza po Passing-Babloku kao i korelacija dobivenih rezultata određivanja FIX koagulacijskom i kromogenom metodom u skupini pacijenata na nadomjesnoj terapiji, a rezultati su prikazani na Slici 21. Statističkom analizom nije uočena značajna povezanost između dviju metoda ( $P=0,188$ ). Grafički prikaz usporedbe dviju metoda prema Bland-Altmanu u skupini pacijenata na terapiji prikazan je na Slici 22.



**Slika 21.** Regresijska analiza po Passing-Babloku dviju metoda za određivanje FIX u pacijenata na nadomjesnoj terapiji

( $r_s$  – Spearmanov koeficijent korelacije)



**Slika 22.** Grafički prikaz Bland-Altman analize za usporedbu dviju metoda za određivanje FIX u pacijenata na nadomjesnoj terapiji

## 5. RASPRAVA

Hemofilija B je rijetki nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi uzrokovan potpunim ili djelomičnim manjkom aktivnosti koagulacijskog faktora IX što rezultira povećanom sklonosti krvarenjima. S obzirom na to da ostatna aktivnost FIX u većini slučajeva dobro korelira s kliničkom slikom, pacijenti s hemofilijom B klasificiraju se kao teški, umjereni ili blagi oblik na temelju aktivnosti FIX izmjerenih koagulacijskom metodom. Međutim, u određenim slučajevima uočen je nesklad između kliničkog fenotipa i izmjerene aktivnosti FIX, odnosno klasifikacije pacijenata što upućuje na potencijalnu pogrešnu klasifikaciju na temelju izmjerenih vrijednosti FIX koagulacijskom metodom. S obzirom na sve veću primjenu kromogene metode u dijagnostici hemofilije i njezinih prednosti u odnosu na koagulacijsku metodu, ovim istraživanjem nastojalo se ispitati kakav utjecaj određivanje aktivnosti FIX kromogenom metodom ima na klasifikaciju pacijenata s hemofilijom B, odnosno može li kromogena metoda pružiti ispravniju klasifikaciju koja bi bolje korelirala s kliničkim fenotipom, a samim time doprinijela boljoj skrbi i liječenju pacijenata s hemofilijom B.

Budući da je hemofilija B X-vezani recesivni nasljedni poremećaj od kojeg obolijevaju muškarci, a žene su uglavnom zdrave prenositeljice, u istraživanje je bilo uključeno 45 ispitanika muškog spola koji boluju od hemofilije B. Raspon starosne dobi ispitanika iznosio je od 6 do 88 godina, pri čemu je bilo statistički značajno više odraslih (N=33) u odnosu na pedijatrijske ispitanike (N=12) što se može objasniti niskom incidencijom hemofilije B koja iznosi 1 na 30 000 muške novorođenčadi (Shen i sur., 2022).

Kako bi se ispitao utjecaj klasifikacije pojedinom metodom na rezultate koagulacijskih pretraga i korelacija s kliničkim pokazateljima, u ovome su radu napravljene zasebne klasifikacije pacijenata s hemofilijom B na temelju aktivnosti FIX izmjerenih koagulacijskom, odnosno kromogenom metodom. Na temelju izmjerenih aktivnosti FIX koagulacijskom metodom u jednom stupnju, 17 pacijenata (43 %) klasificirano je kao teški oblik, 8 pacijenata (20 %) kao umjereni oblik i 15 pacijenata (38 %) kao blagi oblik hemofilije B. Statističkom analizom nije uočena značajna razlika u starosnoj dobi te dobi prvog krvarenja ni u jednoj skupini bolesnika. Međutim, iz grafičkog prikaza je uočljivo da pacijenti s teškim oblikom bolesti imaju nižu dob prvog krvarenja u odnosu na pacijente s umjerenim i blagim oblikom hemofilije B što je u skladu s literaturnim podacima. Naime, prema Benson i sur. (2018) uočena je značajno starija dob prvog krvarenja kod pacijenata s blagim oblikom hemofilije (medijan

6,5 godina) u usporedbi s pacijentima s umjerenim (medijan 4 godine) i teškim (medijan 1 godina) oblikom hemofilije.

Usporedbom rezultata određivanja APTV-a te aktivnosti FIX određenih koagulacijskom (FIXkgl) i kromogenom metodom (FIXkr) kod bolesnika s hemofilijom B i kontrolne skupine utvrđene su statistički značajno više vrijednosti APTV-a te niže aktivnosti FIXkgl i FIXkr u skupini pacijenata s hemofilijom B u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,001$ ). Analizom ovih rezultata mogu se definirati dvije glavne karakteristike koje izdvajaju skupinu pacijenata s hemofilijom B u odnosu na zdravu populaciju: produljeno APTV kao posljedica snižene aktivnosti FIX koji sudjeluje u unutarnjem putu zgrušavanja čiju funkciju pratimo APTV-om te niska aktivnosti FIX koja se javlja uslijed mutacije u genu za FIX i dovodi do djelomičnog ili potpunog manjka FIX i posljedično pojave hemofilije.

Također, napravljena je usporedba rezultata određivanja APTV-a te FIXkr i FIXkgl u tri skupine bolesnika s hemofilijom B s obzirom na težinu bolesti (blagi, umjereni i teški oblik). Statističkom analizom utvrđene su statistički značajno niže vrijednosti APTV-a te više vrijednosti FIXkgl kod bolesnika s blagim oblikom u odnosu na bolesnike s teškim i umjerenim oblikom hemofilije B ( $P < 0,001$ ). Ovi su rezultati u skladu s rezultatima Pouplard i sur. (2009) koji su također zabilježili više vrijednosti FIX koagulacijskom metodom u pacijenata s blagim oblikom hemofilije uz korištenje reagensa za APTV Actin FS. S obzirom na veliki broj dostupnih reagensa za APTV koji se razlikuju u sadržaju aktivatora i fosfolipida ovisno o proizvođaču, kod korištenja koagulacijske metode uvijek je bitno naglasiti koji je reagens korišten kako bi se uzele u obzir varijabilnosti u izmjerenoj aktivnosti FIX (Hart i sur., 2022). Statistički značajna razlika uočena je i kod aktivnosti FIX određenih kromogenom metodom između svih skupina ispitanika ( $P < 0,001$ ). Međutim, za razliku od koagulacijske metode, u literaturi su zabilježene manje varijabilnosti u izmjerenoj aktivnosti FIX s obzirom na korišteni reagens za APTV (Hart i sur., 2022).

Usporedba metoda određivanja aktivnosti FIX u ovome je radu potvrdila literaturne navode o razlikama u rezultatima između koagulacijske i kromogene metode pri čemu su veće razlike uočene u skupinama s blagim i umjerenim oblikom hemofilije B (Kloosterman i sur., 2020; Bowyer i sur., 2018; Kershaw i sur., 2018; Kihlberg i sur., 2017; Peyvandi i sur., 2016). U odnosu na aktivnosti FIX određenih kromogenom metodom, aktivnosti FIX određenih koagulacijskom metodom bile su značajno više u pacijenata s blagim i umjerenim oblikom hemofilije B uz iznimku teškog oblika gdje su primijećene više vrijednosti FIX izmjerenih kromogenom metodom. Kihlberg i sur. (2017) zabilježili su u trećini ispitanika s blažim

oblicima hemofilije B dvostruku ili veću razliku u rezultatima između ovih dviju metoda pri čemu su vrijednosti FIX dobivene kromogenom metodom bile više u odnosu na vrijednosti dobivene koagulacijskom metodom dok u skupini pacijenata s teškim oblikom uopće nisu uočene razlike u rezultatima između dviju metoda. Ovakvi rezultati mogli bi biti povezani s određenim mutacijama u genu za FIX kao što je to uočeno u pacijenata s hemofilijom A (Peyvandi i sur., 2016). S druge strane, Kloosterman i sur. (2020) su uočili odstupanje između metoda u 17 % pacijenata s blažim oblicima hemofilije B, pri čemu su više vrijednosti FIX izmjerene koagulacijskom metodom što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu. Značajno više vrijednosti FIX izmjerenih koagulacijskom metodom u pacijenata s blažim oblicima hemofilije B zabilježili su i Bowyer i sur. (2018) kao i Kershaw i sur. (2018) čija je pretpostavka da ovakvi rezultati nisu posljedica utjecaja mutacija s obzirom na generalni trend nižih vrijednosti FIX kromogenom metodom. Dodatnim istraživanjem utjecaja mutacija u hemofiliji B na rezultate određivanja FIX kromogenom metodom mogle bi se razjasniti navedene razlike u rezultatima u odnosu na koagulacijsku metodu.

Regresijskom analizom po Passing-Babloku dobivena je dobra korelacija rezultata određivanja FIX između koagulacijske i kromogene metode u skupini svih ispitanika, kontrolnoj skupini, skupini svih pacijenata s hemofilijom B te skupini s blagim oblikom hemofilije B, dok u skupini s umjerenim oblikom bolesti nije utvrđena dobra korelacija ( $P=0,083$ ). Iako je Wilcoxonovim testom za parne uzorke utvrđena statistički značajna razlika u svim skupinama osim u skupini svih pacijenata s hemofilijom B i skupini s umjerenim oblikom bolesti. U skupini pacijenata s umjerenim oblikom utvrđena je lošija korelacija između metoda u odnosu na skupinu s blagim oblikom hemofilije B. Bland-Altman analizom dokazana je ukupna srednja razlika, odnosno odstupanje između metoda od  $-0,8\%$ , uz veće odstupanje u skupini s umjerenim oblikom u odnosu na skupinu s blagim oblikom bolesti, dok je najmanja razlika bila u skupini svih pacijenata s hemofilijom B. Također, iz grafičkog prikaza prema Bland-Altmanu uočljivo je da su vrijednosti  $FIX_{kr}$  bile niže u više od 80 % pacijenata s hemofilijom B u odnosu na vrijednosti  $FIX_{kgl}$ . Ispitivanjem korelacije rezultata APTV-a,  $FIX_{kgl}$  i  $FIX_{kr}$  s kliničkim pokazateljem, odnosno dobi prvog krvarenja u pojedinim skupinama pacijenata s obzirom na starosnu dob i težinu bolesti, utvrđena je dobra korelacija  $FIX_{kgl}$  s dobi prvog krvarenja u odraslih pacijenata te pacijenata s blagim oblikom hemofilije B. Navedeno upućuje na potencijalno bolju povezanost koagulacijske metode za određivanje FIX s kliničkim pokazateljima koji su jedan od bitnih čimbenika u postavljanju dijagnoze

hemofilije B što ukazuje na neizostavnu ulogu koagulacijske metode u postavljanju početne dijagnoze hemofilije.

U slučaju klasifikacije kromogenom metodom, na temelju izmjerenih aktivnosti FIX, 12 pacijenata (30 %) klasificirano je kao teški oblik, 15 pacijenata (38 %) kao umjereni oblik i 13 pacijenata (33 %) kao blagi oblik hemofilije B. Statističkom analizom uočena je značajna razlika u starosnoj dobi u skupini svih pacijenata i skupini odraslih ispitanika uz značajno nižu starosnu dob u pacijenata s teškim oblikom bolesti u odnosu na pacijente s blažim oblicima bolesti. Ovakvi rezultati u skladu su s literaturnim podacima o starijoj dobi postavljanja dijagnoze kod pacijenata s blažim oblicima hemofilije B u odnosu na pacijente s teškim oblikom bolesti (Key i sur., 2017). Rezultati dobi prvog krvarenja u pojedinim skupinama pacijenata u skladu su s dobivenim rezultatima u slučaju klasifikacije koagulacijskom metodom uz iznimku većeg broja pacijenata s umjerenim oblikom hemofilije B kod kojih se prvo krvarenja pojavilo u dobi od 1 godine života. U slučaju klasifikacije koagulacijskom metodom, u više je pacijenata s teškim oblikom bolesti zabilježena pojava prvog krvarenja u dobi od 1 godine života što ukazuje na bolju povezanost određivanja aktivnosti FIX koagulacijskom metodom s kliničkim pokazateljima bolesti. Usporedbom i statističkom analizom rezultata FIXkgl i FIXkr utvrđena je značajna razlika u rezultatima u svim skupinama pacijenata s hemofilijom B klasificiranih kromogenom metodom. Čak štoviše medijan vrijednosti FIXkgl je bio isti u pacijenata s umjerenim i teškim oblikom bolesti dok je medijan vrijednosti FIXkr u pacijenata s umjerenim oblikom bio trostruko veći nego u pacijenata s teškim oblikom hemofilije B uz neznatne razlike u rezultatima FIXkgl i FIXkr u pacijenata s blagim oblikom bolesti. Navedeni rezultati upućuju kako bi potencijalno kromogena metoda mogla biti bolja za razlikovanje teškog od umjerenog oblika hemofilije B.

S obzirom kako su uočene razlike u rezultatima koagulacijske i kromogene metode, u ovom se radu dodatno nastojao usporediti i utjecaj pojedine metode na klasifikaciju pacijenata s hemofilijom B. Najviše odstupanja u klasifikaciji s obje metode uočeno je kod teškog i umjerenog oblika hemofilije B. Čak 10 pacijenata klasificiranih kao teški oblik hemofilije prema FIXkgl bilo bi klasificirano kao umjereni oblik prema FIXkr pri čemu je kod 8 pacijenata uočen blaži fenotip što znači da bi bili ispravnije klasificirani prema FIXkr. Kod 4 pacijenata s umjerenim oblikom prema FIXkgl uočene su značajno niže vrijednosti FIXkr te bi prema FIXkr bili klasificirani kao teški oblik hemofilije B pri čemu je samo kod jednog pacijenta uočen teški fenotip sugerirajući bolju klasifikaciju prema FIXkr. Najmanje odstupanja u klasifikaciji uočeno je kod blagog oblika hemofilije. Čak 13 pacijenata s blagim oblikom bolesti nije

promijenilo klasifikaciju s obzirom na korištenu metodu, dok bi samo po jedan bio klasificiran kao umjereni oblik, odnosno kao teški oblik bolesti prema FIXkr. Kod tih pacijenata također je uočena bolja povezanost kliničkog fenotipa s klasifikacijom prema FIXkr. Ovi rezultati djelomično su u skladu s rezultatima Kershaw i sur. (2018) koji su dobili veća odstupanja u klasifikaciji prema FIXkr i FXIkgI kod blagog i umjerenog oblika hemofilije B, dok nijedan pacijent s teškim oblikom nije promijenio klasifikaciju s obzirom na korištenu metodu. S druge strane, Bowyer i sur. (2018) zabilježili su kod 5 pacijenata promjenu klasifikacije iz teškog u umjereni oblik prema FIXkr, čak štoviše kod tih pacijenata uočen je blagi fenotip i posljedično ispravnija klasifikacija prema FIXkr što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu. Kihlberg i sur. (2017) te Adcock i sur. (2018) također su uočili ispravniju klasifikaciju pacijenata prema kromogenoj metodi s obzirom na klinički fenotip. Navedeni rezultati upućuju na bolju povezanost klasifikacije prema FIXkr s kliničkim fenotipom u pacijenata s hemofilijom B te bi stoga kod klasifikacije pacijenata uz aktivnosti FIX valjalo uzeti u obzir i klinički fenotip te ukoliko je potrebno odrediti aktivnosti FIX s obje metode i donijeti odluku o klasifikaciji prema onoj metodi koja bolje korelira s kliničkim fenotipom. Međutim, kako na klinički fenotip utječu brojni faktori uključujući i mutacije, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se ispitalo koja metoda je prikladnija za klasifikaciju pacijenata s hemofilijom B.

S obzirom na važnost terapijskog praćenja pacijenata na nadomjesnoj terapiji i rizike koje sa sobom nosi uporaba metode koja precijenjuje ili podcijenjuje rezultate određivanja FIX, u ovom radu ispitano je i koja bi metoda, kromogena ili koagulacijska, bila potencijalno bolja za terapijsko praćenje pacijenata ovisno o nadomjesnoj terapiji. Skupinu pacijenata na nadomjesnoj terapiji činilo je 5/45 (13 %) muških ispitanika starosne dobi od 21 do 67 godina. Iako statističkom analizom nije uočena statistički značajna razlika u vrijednostima FIX izmjerenih kromogenom metodom u odnosu na vrijednosti određene koagulacijskom metodom, a iz grafičkog su prikaza uočljive više vrijednosti FIXkr u odnosu na FIXkgI. Regresijskom analizom po Passing-Babloku nije uočena značajna povezanost, odnosno korelacija između metoda ( $P=0,188$ ). Bland-Altmanovom analizom je dokazana ukupna srednja razlika, odnosno odstupanje između metoda od -102,4 %, uz veća odstupanja u području viših aktivnosti FIX.

Prema Adcock i sur. (2018) koagulacijska metoda daje nepouzdan rezultate u slučaju postinfuzijskog praćenja nadomjesne terapije koja sadrži modificirane rekombinantne pripravke FIX dok kromogena metoda daje puno pouzdanije rezultate terapijskog praćenja ovih pripravaka. S druge strane je u smjernicama WFH navedeno kako kromogena metoda za određivanje FIX značajno podcjenjuje rezultate aktivnosti FIX kod praćenja rekombinantnih



koncentrata FIX. U ovom su radu dva pacijenta bila na terapiji eftrenakog alfa, poznatijim pod imenom Alprolix®. Za ovaj rekombinantni nadomjesni pripravak preporučeno je praćenje kromogenom ili koagulacijskom metodom uz odgovarajuće reagense za APTV pri čemu je Actin FS reagens, koji je i korišten u ovom radu, prihvatljiv (Srivastava i sur., 2020). Iako su u ovom radu uočene značajne razlike u rezultatima praćenja Alprolixa, prema Kitchen i sur. (2016) postinfuzijske vrijednosti rFIXFc ovise isključivo o APTV reagensu koji koristi koagulacijska metoda pri čemu većina reagensa koji koriste elaginsku kiselinu kao aktivator dovode do precjenjivanja vrijednosti FIX, a reagensi koji sadrže silikate dovode do podcjenjivanja vrijednosti FIX.

Dva su pacijenta bila na terapiji nonacog beta pegolom, poznatijim pod nazivom Refixia®. U oba su pacijenta uočene više vrijednosti FIX izmjerene kromogenom metodom. Prema Müller i sur. (2022) uočena je značajna varijabilnost u rezultatima kod korištenja koagulacijske metode za praćenje terapije nonacog beta pegolom te je zabilježeno značajno podcjenjivanje vrijednosti FIX u slučaju korištenja reagensa Actin FS. Stoga je i WFH izdala smjernice za praćenje ove terapije prema kojima se može koristiti kromogena metoda dok bi se koagulacijska metoda trebala izbjegavati jer većina koagulacijskih metoda značajno precjenjuje ili podcjenjuje vrijednosti FIX (Srivastava i sur., 2020). Međutim, Young i sur. (2017) nisu zabilježili značajnu razliku u rezultatima praćenja terapije nonacog beta pegolom između koagulacijske i kromogene metode te su zaključili da bi se obje metode jednako mogle koristiti za praćenje terapije nonacog beta pegolom kod odraslih i djece.

Jedan je pacijent bio na terapiji koncentratom koagulacijskog faktora IX (Octanine F®) te kod njega nisu uočene značajne razlike u postinfuzijskim vrijednostima FIX<sub>kr</sub> i FIX<sub>kgl</sub>, međutim zabilježena je blago viša vrijednost FIX<sub>kr</sub> u odnosu na FIX<sub>kgl</sub>. Prema aktualnim smjericama WFH za terapijsko praćenje koncentrata FIX mogu se koristiti obje metode kalibrirane plazmatskim standardima sljedivim do međunarodnog standarda Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) (Srivastava i sur., 2020).

S obzirom na sve navedeno, za terapijsko praćenje pacijenata bi bilo prikladnije koristiti kromogenu metodu koja se može koristiti za sve do danas dostupne FIX nadomjesne pripravke pa i rekombinantne FIX s produljenim vremenom poluživota. Korištenje kromogene metode bi iz laboratorijske perspektive imalo praktične prednosti, uključujući uklanjanje potrebe za odabirom specifičnog reagensa za APTV za specifični lijek što bi imalo i značajne financijske prednosti za laboratorij. Međutim, u ovaj rad uključen je premali broj uzoraka, odnosno broj

pacijenata na nadomjesnoj terapiji te bi stoga trebalo provesti opsežnije istraživanje kako bi rezultati bili reprezentativni i kako bi se mogli izvesti konkretniji zaključci.

Iako je u današnje vrijeme upotreba koagulacijske metode raširenija među laboratorijima u svijetu, postoji određeni broj faktora koji mogu ograničiti njezinu primjenu. Kao što je već spomenuto, koagulacijska metoda nije prikladna za praćenje određenih modificiranih rekombinantnih nadomjesnih pripravaka FIX, prije svega zbog varijabilnosti u korištenim reagensima za APTV. Također je prema Adcock i sur. (2018) koagulacijska metoda manje pouzdana u prisutnosti nespecifičnih interferencija poput lipemije i ikterije a posebice ukoliko se koristi na analizatorima koji imaju optičku metodu detekcije ugruška. Nadalje, koagulacijska metoda zahtijeva primjenu faktor deficijentne plazme koja mora sadržavati aktivnost FIX  $<0,01$  kIU/L što predstavlja izazov jer ovisno o tome kako je dobivena, faktor deficijentna plazma može sadržavati inhibitore ili male količine drugih faktora koji mogu dovesti do lažno povišenih aktivnosti i skraćenog APTV-a (Adcock i sur., 2018). Za razliku od koagulacijske metode, kao što su zabilježili i Adcock i sur. (2018), kromogena je metoda pouzdanija za praćenje modificiranih rekombinantnih nadomjesnih pripravaka FIX, manje je podložna utjecaju interferencija nespecifičnih inhibitora te ne zahtijeva primjenu faktor deficijentne plazme. Glavna mana kromogene metode jest njezina viša cijena u odnosu na koagulacijsku metodu, no Kershaw i sur. (2018) predlažu znatno smanjenje troškova uz testiranje serije uzoraka u kombinaciji s alikvotiranjem i zamrzavanjem neiskorištenih reagensa kako bi se isti u potpunosti iskoristili. Također, još jedna mogućnost smanjenja troškova primjene kromogene metode je uporabom pohranjenih prethodno ispravno validiranih kalibracijskih krivulja.

Sve u svemu, rezultati ovog istraživanja ukazali su na složenost diferencijalno-dijagnostičkog pristupa u dijagnostici hemofilije B te neizostavnu ulogu koagulacijske i kromogene metode u dijagnostici i praćenju nadomjesne terapije. Također, uočene su prednosti i nedostaci pojedine metode te je osigurana osnova za potencijalnu primjenu kromogene metode u klasifikaciji i terapijskom praćenju pacijenata s hemofilijom B.

## 6. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitan je utjecaj kromogene metode na određivanje aktivnosti koagulacijskog faktora IX te mogućnost primjene kromogene metode u klasifikaciji i terapijskom praćenju pacijenata s hemofilijom B. Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je sljedeće:

1. Na temelju izmjerenih aktivnosti FIX koagulacijskom metodom u jednom stupnju, 17 je pacijenata (43 %) klasificirano kao teški oblik, 8 pacijenata (20 %) kao umjereni oblik i 15 pacijenata (38 %) kao blagi oblik hemofilije B.
2. U pacijenata s teškim oblikom bolesti ustanovljena je niža dob prvog krvarenja u odnosu na pacijente s umjerenim i blagim oblikom hemofilije B što je usporedivo s rezultatima koje su dobili Benson i sur. (2018).
3. Usporedbom rezultata određivanja APTV-a te aktivnosti FIX određenih koagulacijskom (FIXkgl) i kromogenom metodom (FIXkr) u bolesnika s hemofilijom B i kontrolnoj skupini utvrđene su statistički značajno više vrijednosti APTV-a te niže aktivnosti FIXkgl i FIXkr u skupini pacijenata s hemofilijom B u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,001$ ).
4. Statističkom su analizom utvrđene statistički značajno niže vrijednosti APTV-a te više vrijednosti FIXkgl u bolesnika s blagim oblikom u odnosu na bolesnike s teškim i umjerenim oblikom hemofilije B ( $P < 0,001$ ) uz korištenje reagensa za APTV Actin FS. Statistički značajna razlika uočena je i kod aktivnosti FIX određenih kromogenom metodom između svih skupina ispitanika ( $P < 0,001$ ).
5. Usporedba metoda određivanja aktivnosti FIX u ovome radu potvrdila je literaturne navode o razlikama u rezultatima između koagulacijske i kromogene metode. U odnosu na aktivnosti FIX određenih kromogenom metodom, aktivnosti FIX određenih koagulacijskom metodom značajno su više u pacijenata s blagim i umjerenim oblikom hemofilije B uz iznimku teškog oblika gdje su primijećene više vrijednosti FIX izmjerenih kromogenom metodom.

6. Dobivena je dobra korelacija rezultata određivanja FIX između koagulacijske i kromogene metode u skupini svih ispitanika, kontrolnoj skupini, skupini svih pacijenata s hemofilijom B te skupini s blagim oblikom hemofilije B, dok u skupini s umjerenim oblikom bolesti nije utvrđena dobra korelacija ( $P=0,083$ ).
7. Utvrđena je ukupna srednja razlika, odnosno odstupanje između metoda od  $-0,8\%$ , uz veće odstupanje u skupini s umjerenim oblikom u odnosu na skupinu s blagim oblikom bolesti, dok je najmanja razlika bila u skupini svih pacijenata s hemofilijom B. Ispitivanjem korelacije utvrđena je dobra povezanost FIXkgl s dobi prvog krvarenja u odraslih pacijenata ( $r=0,468$ ;  $P=0,037$ ) te pacijenata s blagim oblikom hemofilije B ( $r=0,716$ ;  $P=0,009$ ).
8. Na temelju izmjerenih aktivnosti FIX kromogenom metodom 12 je pacijenata (30 %) klasificirano kao teški oblik hemofilije B, 15 pacijenata (38 %) kao umjereni oblik hemofilije B te 13 pacijenata (33 %) kao blagi oblik hemofilije B.
9. Usporedbom utjecaja pojedine metode na klasifikaciju pacijenata s hemofilijom B najviše je odstupanje uočeno u klasifikaciji s obje metode kod teškog i umjerenog oblika hemofilije B, dok je najmanje odstupanje u klasifikaciji zabilježeno kod blagog oblika hemofilije. Također je uočena bolja povezanost kliničkog fenotipa s klasifikacijom prema FIXkr.
10. U skupini pacijenata na nadomjesnoj terapiji statističkom analizom nije uočena statistički značajna razlika u vrijednostima FIX izmjerenih kromogenom metodom u odnosu na vrijednosti određene koagulacijskom metodom. Ispitivanjem korelacije rezultata FIXkr i FIXkgl nije uočena dobra korelacija između metoda ( $P=0,188$ ). Najveća odstupanja između rezultata FIXkr i FIXkgl u skupini pacijenata na nadomjesnoj terapiji uočena su u području viših aktivnosti FIX.
11. Ispitivanje utjecaja kromogene metode na terapijsko praćenje pacijenata s hemofilijom B provedeno je na premalom broju ispitanika te bi stoga trebalo provesti opsežnije istraživanje s većim brojem ispitanika kako bi se izveli konkretniji zaključci.

## 7. POPIS KRATICA

AAV	adeno-asocirani virusni vektor
aPCC	aktivirani koncentraci protrombinskog kompleksa, engl. <i>activated prothrombin complex concentrates</i>
APTV	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
Ca <sup>2+</sup>	kalcijevi ioni
CaCl <sub>2</sub>	kalcijev klorid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (od engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EGF	domena slična epidermalnom faktoru rasta (od engl. <i>epidermal growth factor like domains</i> )
EGF1	domena slična epidermalnom faktoru rasta 1 (od engl. <i>epidermal growth factor like domain 1</i> )
EGF2	domena slična epidermalnom faktoru rasta 2 (od engl. <i>epidermal growth factor like domain 2</i> )
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove, engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FIX	koagulacijski faktor IX
FIXa	aktivirani oblik koagulacijskog faktora IX
FIXkgl	koagulacijska metoda u jednom stupnju za određivanje aktivnosti koagulacijskog faktora IX
FIXkr	kromogena metoda za određivanje aktivnosti koagulacijskog faktora IX
FVIIa	aktivirani oblik koagulacijskog faktora VII
FVIII	koagulacijski faktor VIII
FVIIIa	aktivirani oblik koagulacijskog faktora VIII
FX	koagulacijski faktor X
FXa	aktivirani oblik koagulacijskog faktora X
FXIa	aktivirani oblik koagulacijskog faktora XI
FXIIIa	aktivirani oblik koagulacijskog faktora XIII
HIV	virus humane imunodeficijencije, engl. <i>human immunodeficiency virus</i>
IgG	imunoglobulin G

IgG1	imunoglobulin G subklase 1
IQR	interkvartilni raspon, engl. <i>interquartile range</i>
ISTH	Međunarodno društvo za trombozu i hemostazu, engl. <i>International Society on Thrombosis and Haemostasis</i>
OVB	Owrenova puferska otopina, engl. <i>Owren's Veronal Buffer</i>
PEG	polietilen glikol
PV	protrombinsko vrijeme
rFIX	rekombinantni koagulacijski faktor IX
rFIXFc	rekombinantni koagulacijski faktor IX dobiven fuzijom s Fc fragmentom
rFVIIa	aktivirani rekombinantni koagulacijski faktor VII
SAD	Sjedinjene Američke Države
SD	standardna devijacija
TF	tkivni faktor
WFH	Svjetsko udruženje hemofilije, engl. <i>World Federation of Hemophilia</i>
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija, engl. <i>World Health Organization</i>

## 8. LITERATURA

Adcock DM, Strandberg K, Shima M, Marlar RA. Advantages, disadvantages and optimization of one-stage and chromogenic factor activity assays in haemophilia A and B. *Int J Lab Hematol*, 2018, 40 (6), 621-629.

Benson G, Auerswald G, Dolan G, et al. Diagnosis and care of patients with mild haemophilia: practical recommendations for clinical management. *Blood Transfus*, 2018, 16 (6), 535-544.

Bhaskar A, Nair CS, Thomas TA. Cell based model of haemostasis. *Current Medical Issues Journal*, 2016, 14, 53-58.

Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, i sur. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*, 2014, 12 (11), 1935-1939.

Bowyer AE, Duncan EM, Antovic JP. Role of chromogenic assays in haemophilia A and B diagnosis. *Haemophilia*, 2018, 24 (4), 578-583.

Castaman G. The benefits of prophylaxis in patients with hemophilia B. *Expert Rev Hematol*, 2018, 11(8), 673-683.

DeLoughery TG. Hemostasis and Thrombosis. Švicarska, Springer Cham, 2019, str. 23-31.

Dolan G, Benson G, Duffy A, i sur. Haemophilia B: Where are we now and what does the future hold?. *Blood Rev*, 2018, 32 (1), 52-60.

Factor IX Variant Database, 2023., <http://www.factorix.org/> , pristupljeno 19. 06. 2023.

Franchini M, Mannucci PM. The history of hemophilia. *Semin Thromb Hemost*, 2014, 40 (5), 571-576.

Gualtierotti R, Solimeno LP, Peyvandi F. Hemophilic arthropathy: Current knowledge and future perspectives. *J Thromb Haemost*, 2021, 19 (9), 2112-2121.

Hart DP, Matino D, Astermark J, i sur. International consensus recommendations on the management of people with haemophilia B. *Ther Adv Hematol*, 2022, 13, 1-22.

Horava SD, Peppas NA. Recent advances in hemophilia B therapy. *Drug Deliv Transl Res*, 2017, 7 (3), 359-371.

Ignjatovic V. Activated partial thromboplastin time. *Methods Mol Biol*, 2013, 992, 111-120.

Iorio A, Stonebraker JS, Chambost H, i sur. Establishing the Prevalence and Prevalence at Birth of Hemophilia in Males : A Meta-analytic Approach Using National Registries. *Ann Intern Med*, 2019, 171 (8), 540-546.

James P, Lillicap D. Molecular Diagnostic Approaches to Hemostasis. U: Practiacal Hemostasis and Thrombosis. Key NS, Makris M, Lillicap D, urednici, Chichester, John Wiley & Sons Inc, 2017, str. 27-41.

Kershaw GW, Dissanayake K, Chen VM, Khoo TL. Evaluation of chromogenic factor IX assays by automated protocols. *Haemophilia*, 2018, 24 (3), 492-501.

Kihlberg K, Strandberg K, Rosén S, Ljung R, Astermark J. Discrepancies between the one-stage clotting assay and the chromogenic assay in haemophilia B. *Haemophilia*, 2017, 23 (4), 620-627.

Kitchen S, Kershaw G, Tiefenbacher S. Recombinant to modified factor VIII and factor IX - chromogenic and one-stage assays issues. *Haemophilia*, 2016, 22 (5), 72-77.

Kitchen S, Signer-Romero K, Key NS. Current laboratory practices in the diagnosis and management of haemophilia: a global assessment. *Haemophilia*, 2015, 21 (4), 550-557.

Kloosterman KRHS, van Balen EC, Smit C i sur. Factor IX assay discrepancy in non-severe hemophilia B – a cross-sectional study in the Netherlands. *Haeomphilia*, 2020, 26, 21.

Labar B, Hauptman E i sur. Bolesti koagulacije. U: Hematologija. Labar B, Hauptman E i sur, urednici, Zagreb, Školska knjiga, 2007, str. 309-325.

Labar B, Hauptman E i sur. Sustav zgrušavanja i fibrinolize. U: Hematologija. Labar B, Hauptman E i sur, urednici, Zagreb, Školska knjiga, 2007, str. 67-73.

Larson PJ, High KA. Biology of Inherited Coagulopathies: Factor IX. *Hematol./Oncol. Clin. North Am*, 1992, 6 (5), 999-1009.

Maclean RM, Makris M. Hemophilia A and B. U: Practiacal Hemostasis and Thrombosis. Key NS, Makris M, Lillicap D, urednici, Chichester, John Wiley & Sons Inc, 2017, str. 79-94.

Marlar RA, Strandberg K, Shima M, Adcock DM. Clinical utility and impact of the use of the chromogenic vs one-stage factor activity assays in haemophilia A and B. *Eur J Haematol*, 2020, 104 (1), 3-14.



Matsumoto T, Shima M, Takeyama M, et al. The measurement of low levels of factor VIII or factor IX in hemophilia A and hemophilia B plasma by clot waveform analysis and thrombin generation assay. *J Thromb Haemost*, 2006, 4 (2), 377-384.

Miller CH. The Clinical Genetics of Hemophilia B (Factor IX Deficiency). *Appl Clin Genet*, 2021, 14, 445-454.

Müller J, Miesbach W, Prüller F, Siegemund T, Scholz U, Sachs UJ; Standing Commission Labor (STAEKOLA) of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research (GTH). An Update on Laboratory Diagnostics in Haemophilia A and B. *Hamostaseologie*, 2022, 42 (4), 248-260.

Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *Lancet*, 2016, 388(10040), 187-197.

Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD. A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. *J Thromb Haemost*, 2016, 14 (2), 248-261.

Pouplard C, Trossaert M, LE Querrec A, Delahousse B, Giraudeau B, Gruel Y. Influence of source of phospholipids for APTT-based factor IX assays and potential consequences for the diagnosis of mild haemophilia B. *Haemophilia*, 2009, 15 (1), 365-368.

Rogaev EI, Grigorenko AP, Faskhutdinova G, Kittler EL, Moliaka YK. Genotype analysis identifies the cause of the "royal disease". *Science*, 2009, 326 (5954), 817.

Schramm W. The history of haemophilia - a short review. *Thromb Res*, 2014, 134, 1-6.

Shen G, Gao M, Cao Q, Li W. The Molecular Basis of FIX Deficiency in Hemophilia B. *Int. J. Mol. Sci*, 2022, 23 (5), e2762.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, i sur. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia*, 2020, 26 (6), 1-158.

Strandberg K, Augustsson C. Evaluation of the Atellica COAG 360 coagulation analyzer in a specialized coagulation laboratory. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36 (3), e24276.

World Federation of Hemophilia Report on the Annual Global Survey 2021, 2022., <https://wfh.org/> , pristupljeno 16. 06. 2023.

Xu Z, Spencer HJ, Harris VA, Perkins SJ. An updated interactive database for 1692 genetic variants in coagulation factor IX provides detailed insights into hemophilia B. *J Thromb Haemost*, 2023, 21 (5), 1164-1176.

Young G, Ezban M, Clausen WHO, Negrier C, Oldenburg J, Shima M. Chromogenic analysis of FIX activity in haemophilia B patients treated with nonacog beta pegol. *Haemophilia*, 2017, 23 (6), e528-e530.

Zimmerman B, Valentino LA. Hemophilia: in review. *Pediatr Rev*, 2013, 34 (7), 289-295.

## 9. SAŽETAK

Hemofilija B je rijetki X-vezani nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi uzrokovan potpunim ili djelomičnim manjkom aktivnosti koagulacijskog faktora IX što rezultira povećanom sklonosti krvarenjima. S obzirom kako u većini slučajeva ostatna aktivnost FIX dobro korelira s kliničkom slikom, pacijenti s hemofilijom B klasificiraju se kao teški, umjereni ili blagi oblik na temelju aktivnosti FIX izmjerenih koagulacijskom metodom. S obzirom na sve veću primjenu kromogene metode u dijagnostici hemofilije i njezinih prednosti u odnosu na koagulacijsku metodu, ovim se istraživanjem nastojalo ispitati kakav utjecaj određivanje aktivnosti FIX kromogenom metodom ima na klasifikaciju pacijenata s hemofilijom B i ispitati razlike u rezultatima terapijskog praćenja pacijenata koagulacijskom i kromogenom metodom kako bi se utvrdilo koja je metoda prikladnija za praćenje učinkovitosti lijekova te time doprinijelo boljoj skrbi i liječenju pacijenata s hemofilijom B. U istraživanje je bilo uključeno 45 ispitanika muškog spola (33 odrasla i 12 pedijatrijskih) koji boluju od hemofilije B, od kojih je pet u trenutku ispitivanja primalo nadomjesnu terapiju te su oni promatrani kao zasebna skupina prilikom statističke obrade rezultata. Svim je ispitanicima izmjereno APTV te aktivnosti FIX koagulacijskom metodom (FIXkgl) i kromogenom metodom (FIXkr) upotrebom *BIOPHEN<sup>TM</sup>* FIX komercijalnog testa (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, Francuska) na analizatoru Atellica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). U odnosu na aktivnosti FIXkr, aktivnosti FIXkgl su bile značajno više u pacijenata s blagim i umjerenim oblikom hemofilije B uz iznimku teškog oblika gdje su primijećene više vrijednosti FIXkr. Najviše je odstupanja u klasifikaciji s obje metode uočeno kod teškog i umjerenog oblika hemofilije B dok je najmanje odstupanja u klasifikaciji zabilježeno kod blagog oblika hemofilije. Također je uočena bolja povezanost kliničkog fenotipa s klasifikacijom prema kromogenoj metodi. U skupini pacijenata na nadomjesnoj terapiji statističkom analizom nije uočena statistički značajna razlika aktivnosti FIXkr odnosu na aktivnosti FIXkgl. Najveća odstupanja između rezultata FIXkr i FIXkgl u skupini pacijenata na nadomjesnoj terapiji uočena su u području viših aktivnosti FIX. Rezultati ovog istraživanja ukazali su na složenost diferencijalno-dijagnostičkog pristupa u dijagnostici hemofilije B, kao i na neizostavnu ulogu koagulacijske i kromogene metode u dijagnostici i praćenju nadomjesne terapije. Nadalje, uočene su prednosti i nedostaci pojedine metode te je osigurana osnova za potencijalnu primjenu kromogene metode u klasifikaciji i terapijskom praćenju pacijenata s hemofilijom B.

## 10. SUMMARY

Hemophilia B is a rare X-linked hereditary blood clotting disorder caused by a complete or partially deficiency of coagulation factor IX activity that results with increased bleeding tendency. Since residual FIX activity correlates well with the clinical picture in most cases, hemophilia B patients are classified as severe, moderate or mild based on FIX activity measured by the one-stage coagulation method. With regard to the increasing use of the chromogenic method in the diagnosis of hemophilia and its advantages compared to the standard coagulation method, the goal of this investigation was to examine the influence of the determination of FIX activity by the chromogenic method on the classification of hemophilia B patients and to examine the differences in the results of the therapeutic monitoring by coagulation and chromogenic methods in order to determine which method is more suitable for monitoring the effectiveness of drugs and thereby contributes to better care and treatment of hemophilia B patients. The investigation has included 45 male subjects (33 adults and 12 pediatric) suffering from hemophilia B, of whom five were receiving replacement therapy at the time of the examination, and they were observed as a separate group during the statistical analysis of results. APTT and FIX activities were measured by using the coagulation method (FIXkgl) and chromogenic method (FIXkr) using the *BIOPHEN<sup>TM</sup>* FIX commercial test (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, France) in all subjects on the Atellica COAG 360 analyzer (Siemens Healthcare, Marburg, Germany). In relation to FIXkr activities, FIXkgl activities were significantly higher in mild and moderate hemophilia B patients with the exception of the severe form where higher FIXkr values were observed. The most discrepancies in classification with both methods were observed in severe and moderate hemophilia B forms, while the least discrepancies in classification were observed in mild forms of hemophilia. Moreover, a better correlation of the clinical phenotype with the classification according to the chromogenic method was observed. In the group of patients on replacement therapy, statistically significant difference was not found between the activities of FIXkr compared to FIXkgl activities. The largest discrepancies between the results of FIXkr and FIXkgl in the group of patients on replacement therapy were observed in the area of higher FIX activities. The results of this investigation indicated the complexity of the differential-diagnostic approach in the diagnosis of hemophilia B and the indispensable role of the coagulation and chromogenic methods in the diagnosis and monitoring of replacement therapy. Also, the advantages and disadvantages of each method were observed, and the basis for the potential application of the chromogenic

method in the classification and therapeutic monitoring of patients with hemophilia B was provided.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## UTJECAJ KROMOGENE METODE ZA ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KOAGULACIJSKOG FAKTORA IX NA KLASIFIKACIJU I LIJEČENJE BOLESNIKA S HEMOFILIJOM B

Dora Rebrek

### SAŽETAK

Hemofilija B je rijetki X-vezani nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi uzrokovan potpunim ili djelomičnim manjkom aktivnosti koagulacijskog faktora IX što rezultira povećanom sklonosti krvarenjima. S obzirom kako u većini slučajeva ostatna aktivnost FIX dobro korelira s kliničkom slikom, pacijenti s hemofilijom B klasificiraju se kao teški, umjereni ili blagi oblik na temelju aktivnosti FIX izmjerenih koagulacijskom metodom. S obzirom na sve veću primjenu kromogene metode u dijagnostici hemofilije i njezinih prednosti u odnosu na koagulacijsku metodu, ovim se istraživanjem nastojalo ispitati kakav utjecaj određivanje aktivnosti FIX kromogenom metodom ima na klasifikaciju pacijenata s hemofilijom B i ispitati razlike u rezultatima terapijskog praćenja pacijenata koagulacijskom i kromogenom metodom kako bi se utvrdilo koja je metoda prikladnija za praćenje učinkovitosti lijekova te time doprinijelo boljoj skrbi i liječenju pacijenata s hemofilijom B. U istraživanje je bilo uključeno 45 ispitanika muškog spola (33 odrasla i 12 pedijatrijskih) koji boluju od hemofilije B, od kojih je pet u trenutku ispitivanja primalo nadomjesnu terapiju te su oni promatrani kao zasebna skupina prilikom statističke obrade rezultata. Svim je ispitanicima izmjereno APTV te aktivnosti FIX koagulacijskom metodom (FIXkgl) i kromogenom metodom (FIXkr) upotrebom *BIOPHEN<sup>TM</sup>* FIX komercijalnog testa (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, Francuska) na analizatoru Atellica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). U odnosu na aktivnosti FIXkr, aktivnosti FIXkgl su bile značajno više u pacijenata s blagim i umjerenim oblikom hemofilije B uz iznimku teškog oblika gdje su primijećene više vrijednosti FIXkr. Najviše je odstupanja u klasifikaciji s obje metode uočeno kod teškog i umjerenog oblika hemofilije B dok je najmanje odstupanja u klasifikaciji zabilježeno kod blagog oblika hemofilije. Također je uočena bolja povezanost kliničkog fenotipa s klasifikacijom prema kromogenoj metodi. U skupini pacijenata na nadomjesnoj terapiji statističkom analizom nije uočena statistički značajna razlika aktivnosti FIXkr odnosu na aktivnosti FIXkgl. Najveća odstupanja između rezultata FIXkr i FIXkgl u skupini pacijenata na nadomjesnoj terapiji uočena su u području viših aktivnosti FIX. Rezultati ovog istraživanja ukazali su na složenost diferencijalno-dijagnostičkog pristupa u dijagnostici hemofilije B, kao i na neizostavnu ulogu koagulacijske i kromogene metode u dijagnostici i praćenju nadomjesne terapije. Nadalje, uočene su prednosti i nedostaci pojedine metode te je osigurana osnova za potencijalnu primjenu kromogene metode u klasifikaciji i terapijskom praćenju pacijenata s hemofilijom B.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 63 stranice, 22 grafička prikaza, 13 tablica i 41 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: koagulacijski faktor IX, hemofilija B, kromogena metoda, koagulacijska metoda, liječenje

Mentor: **dr. sc. Dunja Rogić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**dr. sc. Désirée Coen Herak**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **dr. sc. Ksenija Fumić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**dr. sc. Désirée Coen Herak**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**dr. sc. Željka Vogrinc**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2023.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### THE IMPACT OF THE CHROMOGENIC METHOD FOR DETERMINING THE ACTIVITY OF COAGULATION FACTOR IX ON THE CLASSIFICATION AND TREATMENT OF PATIENTS WITH HEMOPHILIA B

**Dora Rebek**

#### SUMMARY

Hemophilia B is a rare X-linked hereditary blood clotting disorder caused by a complete or partial deficiency of coagulation factor IX activity that results with increased bleeding tendency. Since residual FIX activity correlates well with the clinical picture in most cases, hemophilia B patients are classified as severe, moderate or mild based on FIX activity measured by the one-stage coagulation method. With regard to the increasing use of the chromogenic method in the diagnosis of hemophilia and its advantages compared to the standard coagulation method, the goal of this investigation was to examine the influence of the determination of FIX activity by the chromogenic method on the classification of hemophilia B patients and to examine the differences in the results of the therapeutic monitoring by coagulation and chromogenic methods in order to determine which method is more suitable for monitoring the effectiveness of drugs and thereby contributes to better care and treatment of hemophilia B patients. The investigation has included 45 male subjects (33 adults and 12 pediatric) suffering from hemophilia B, of whom five were receiving replacement therapy at the time of the examination, and they were observed as a separate group during the statistical analysis of results. APTT and FIX activities were measured by using the coagulation method (FIXkgl) and chromogenic method (FIXkr) using the *BIOPHEN<sup>TM</sup>* FIX commercial test (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, France) in all subjects on the Atellica COAG 360 analyzer (Siemens Healthcare, Marburg, Germany). In relation to FIXkr activities, FIXkgl activities were significantly higher in mild and moderate hemophilia B patients with the exception of the severe form where higher FIXkr values were observed. The most discrepancies in classification with both methods were observed in severe and moderate hemophilia B forms, while the least discrepancies in classification were observed in mild forms of hemophilia. Moreover, a better correlation of the clinical phenotype with the classification according to the chromogenic method was observed. In the group of patients on replacement therapy, statistically significant difference was not found between the activities of FIXkr compared to FIXkgl activities. The largest discrepancies between the results of FIXkr and FIXkgl in the group of patients on replacement therapy were observed in the area of higher FIX activities. The results of this investigation indicated the complexity of the differential-diagnostic approach in the diagnosis of hemophilia B and the indispensable role of the coagulation and chromogenic methods in the diagnosis and monitoring of replacement therapy. Also, the advantages and disadvantages of each method were observed, and the basis for the potential application of the chromogenic method in the classification and therapeutic monitoring of patients with hemophilia B was provided.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 63 pages, 22 figures, 13 tables and 41 references. Original is in Croatian language.

Keywords: coagulation factor IX, hemophilia B, chromogenic method, one-stage coagulation method, treatment

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
**Désirée Coen Herak, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Reviewers: **Ksenija Fumić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
**Désirée Coen Herak, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
**Željka Vogrinc, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: July 2023.

