

Klinička i laboratorijska dijagnostika hemofilije B

Pešut, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:358691>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Luka Pešut

**KLINIČKA I LABORATORIJSKA
DIJAGNOSTIKA HEMOFILIJE B**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Luka Pešut

**KLINIČKA I LABORATORIJSKA
DIJAGNOSTIKA HEMOFILIJE B**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u: Poliklinici Zavoda za hematologiju, KBC Zagreb

Mentor rada: prof. dr. sc. Silva Zupančić – Šalek, prim. dr. med

Rad ima 30 listova, 8 tablica i 3 slike.

1. UVOD	1
1.1 HEMOFILIJA B.....	1
1.2 EPIDEMIOLOGIJA.....	1
1.3 ETIOLOGIJA.....	1
1.4 PATOFIZIOLOGIJA.....	2
1.5 KLASIFIKACIJA HEMOFILJE B.....	3
1.6 KLINIČKA SLIKA	4
1.7. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA	6
2. HIPOTEZA	8
3. CILJ	9
4. MATERIJAL I METODE.....	10
4.1 ISPITANICI.....	10
4.2 METODE.....	10
4.3 STATISTIČKE METODE	13
5. REZULTATI.....	14
6. RASPRAVA.....	18
7. ZAKLJUČAK	20
8. SAŽETAK.....	21
9. SUMMARY	22
10. LITERATURA.....	23
11. ŽIVOTOPIS	25

POPIS KRATICA

FIX – faktor 9

TF – tkivni faktor

FVII – faktor 7

FX – faktor 10

FXII – faktor 12

FXI – faktor 11

FVIII – faktor 8

FV – faktor 5

FII- protrombin

FI – fibrinogen

GI – gastrointestinalni

PV – protrombinsko vrijeme

APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

TV- trombinsko vrijeme

nm – nanometri

s – sekunde

1. UVOD

1.1 Hemofilija B

Hemofilija B ili Christmasova bolest je nasljedni poremećaj sustava koagulacije koji se očituje smanjenom količinom ili potpunim nedostatkom faktora IX (FIX) u plazmi bolesnika. Kao posljedica, stvaranje trombina nije dovoljno te je produljeno vrijeme zgrušavanja krvi kod ozljeda i kirurških zahvata, a u težim slučajevima dolazi do spontanog krvarenja u zglobove i mišiće. Bolest se nasljeđuje se spolno, X - vezano i recesivno (1).

1.2 Epidemiologija

Hemofilija B je puno rjeđa od hemofilije A i čini 15 - 20 % svih slučajeva hemofilije. Incidencija je procijenjena na 1 slučaj na 60000 poroda muške novorođenčadi dok prevalencija iznosi 5,3 slučajeva na 100000 muškaraca. Od ukupnog broja oboljelih, na teške slučajeve otpada 44 % (2).

Bolest je rasprostranjena po cijelom svijetu i pojavljuje se kod svih rasa i etničkih grupa. Kako se radi o X - vezanom poremećaju, žene su najčešće asimptomatske nositeljice defektnog gena, a muškarci obolijevaju.

1.3 Etiologija

Hemofilija B je X - vezani, recesivni genetski poremećaj koji je uzrokovan naslijeđivanjem mutiranog gena ili spontanom mutacijom. Gen za FIX se nalazi na dugom kraku X kromosoma na poziciji q27. Gen kodira protein od 416 aminokiselina koji se sintetizira u jetri i ovisan je o vitaminu K te mora proći kroz posttranslacijsku modifikaciju kako bi postao aktivan.

Nekoliko stotina različitih mutacija je pronađeno u hemofiliji B, a to uključuje parcijalne ili totalne delecije i missense mutacije koje uzrokuju potpuni nedostatak ili abnormalan FIX.

Može se dogoditi da oboli i ženska osoba u slučaju da je na oba kromosoma prisutna mutacija. To se može dogoditi ako su oba roditelja pogođena bolesti (otac bolesnik, a majka nositeljica) ili ako se uz nasljeđeni bolestan gen dogodi i spontana mutacija zdravog. Također, moguća je pojava bolesti kod osoba sa Turnerovim sindromom (1,2).

1.4 Patofiziologija

Hemostaza je fiziološki proces kojemu je uloga održavanje krvi tekućom i zaustavljanje krvarenja na mjestu ozljede. Čim dođe do ozljede, krvne žile odgovaraju lokalnom vazokonstrikcijom kako bi se usporio protok krvi te u kontakt sa cirkulacijom dolaze proteini koji pokreću stvaranje hemostatskog čepa (3).

Primarna hemostaza se odnosi na adheziju i agregaciju trombocita na stijenku krvne žile uslijed ozljede. U krvnoj struji trombociti su diskoidnog oblika, glatke površine i ne reagiraju s endotelnim stanicama. Kod ozljede se, subendotelne strukture, kao što su bazalna membrana i kolagena vlakna izlažu trombocitima te se oni počinju nakupljati na mjestu ozljede, vežu se i formiraju primarni hemostatski čep. Prvo se stvara jednoslojni, za zatim višeslojni pokrivač na mjestu oštećenja.

Sekundarna hemostaza se sastoji od sustava koagulacije kojeg čine enzimi i njihovi kofaktori pomoću kojih se, u slučaju njihove aktivacije, netopivi fibrinogen pretvara u fibrin koji učvršćuje trombocite na mjestu ozljede, stvarajući sekundarni hemostatski čep. Proces koagulacije dijeli se na dva puta: unutarnji i vanjski put.

Vanjski put koagulacije započinje kada se uslijed ozljede krvnoj struji izlaže tkivni faktor (TF) koji se nalazi u adventiciji krvnih žila. TF ima jaki afinitet za faktor VII za kojeg se veže i s kojim tvori kompleks u prisutnosti kalcija. Aktivirani FVII aktivira FX.

Uposredan s vanjskim je i unutarnji put koagulacije, koji započinje ako se FXII izloži endotelu koji ga aktivira te pokreće kaskadnu aktivaciju slijedećih faktora. FXII djeluje enzimatski na FXI, koji zatim aktivira FIX. Aktivirani FIX zajedno sa FVIII i fosfolipidima iz trombocita aktiviraju FX te se na toj razini dva puta koagulacije spajaju.

Aktivirani FX uz kofaktor FV pretvara protrombin (FII) u trombin (FIIa). Trombin katalizira pretvorbu fibriinogena (FI) u fibrin (FIa) (4).

Za odvijanje procesa koagulacije svaki faktor mora biti aktivan i u definiranoj količini. Nedostatak ili abnormalnost FIX uzrokuje poremećaj u sustavu koagulacije, što dovodi do spontanih krvarenja i/ili pretjeranog krvarenja kod trauma i operacija. Spontana krvarenja se najčešće događaju u zglobove, mišiće, GI sustav i centralni živčani sustav (2).

1.5 Klasifikacija hemofilije B

Hemofilija B se klasificira na temelju razine plazmatske aktivnosti FIX i na težini kliničke slike, odnosno na temelju simptoma krvarenja.

Razina plazmatske aktivnosti FIX je najrašireniji kriterij koji se koristi za klasifikaciju hemofilije koja se dijeli se na blagu, umjerenu i tešku hemofiliju. Normalna razina aktivnosti FIX je između 70 % i 120 % aktivnosti te osobe sa razinom većom od 40 % uglavnom imaju urednu koagulaciju.

Blagi oblik bolesti se manifestira razinom aktivnosti između 5 % i 40 % te pacijenti krvare kod većih trauma ili operacija. Kod umjerenog tipa bolesti, aktivnost faktora je 1 % - 5 % i krvarenje se događa kod najmanjih ozlijeđa. Pacijenti sa teškim oblikom hemofilije imaju razinu aktivnosti faktora ispod 1 % i kod njih se krvarenje događa spontano u zglobove i meka tkiva (5).

Klinički simptom krvarenja se također koristi za klasifikaciju hemofilije jer u nekih bolesnika razina FIX ne korelira sa simptomima. Tako pacijenti sa razinom manjom od 1 % mogu imati malo ili nemaju uopće spontanih krvarenja te se čini da imaju umjereni ili blagi oblik bolesti. Naprotiv, postoje i pacijenti sa razinom 1 % - 5 % koji imaju simptome teškog oblika bolesti (2).

Tablica 1. Klinički kriteriji podjele hemofilije B (6)

Klasifikacija	Razina FIX (% od normalnog faktora)	Uzrok krvarenja	Učestalost hemofilije B
Teška – gradus 1	< 1 % (< 0,01 IU/dL)	Spontana krvarenja od ranog djetinstva Hemartroza	50 %
Umjerena – gradus 2	1 - 5 % (0,01 – 0,05 IU/dL)	Krvarenje nakon blage do umjerene traume ili operacije Povremeno spontno krvarenje	30 %
Blaga – gradus 3	6 - 40 % (0,06 – 0,40 IU/dL)	Krvarenje nakon teške traume ili operacije	20 %

1.6 Klinička slika

Glavno obilježje pacijenata sa hemofilijom B je sklonost krvarenjima odnosno hemoragijska diateza. Mjesta i obrazac krvarenja, kao i dob u kojoj će doći do pojave simptoma, značajno ovise o težini bolesti (7).

Pacijenti s blagim oblikom hemofilije nemaju spontanih krvarenja uopće. Na bolest se najčešće posumnja u kasnijim godinama života kada su pacijenti podvrgnuti medicinskim zahvatima zbog drugih dijagnoza. Abnormalno krvarenje se pojavljuje prilikom operacija, vađenja zuba i većih trauma, a učestalost krvarenja varira od jednom godišnje do jednom u deset godina. Bolesnici sa blagim oblikom uzimaju lijekove po potrebi, odnosno u periodima kada postoji mogućnost jačeg krvarenja (8).

Klinička slika pacijenata s umjerenim oblikom hemofilije je vrlo heterogena. Bolest se otkriva u prvim godinama života, a može se očitovati spontanim krvarenjima te produženim epizodama krvarenja nakon manjih ozlijeđa, trauma ili operacija. Otprilike četvrtina bolesnika ima krvarenja u zglobove, dok isti udio nema krvarenja uopće. Kao što je i klinička slika raznolika, osobe s umjerenim oblikom imaju i različitu količinu uzimanja lijekova, ovisnu o kliničkim manifestacijama bolesti (7, 8,9).

Pacijentima s najtežim oblikom hemofilije bolest se otkriva vrlo rano, uglavnom u doba poroda ili pri prvim medicinskim zahvatima kojima se podvrgavaju. Takvi pacijenti trebaju konstantno uzimati lijek kako bi im se smanjile posljedice i poboljšala kvaliteta života. S porastom fizičke aktivnosti, ukoliko dijete ne uzima profilaksu, sve češće se događaju spontana krvarenja i to u prosjeku od dva do pet puta mjesečno. Uz zglobove koji su najčešće mjesto, krvarenja se još događaju i u meka tkiva, a zahvaćeni su mišići, bubrezi, probavni sustav, nos i mozak (8, 10).

Žene koje su heterozigoti, nosioci mutiranog gena, mogu imati aktivnost FIX nižu od 40 % i slične simptome kao i bolesnici sa blagim oblikom bolesti.

Uz akutna krvarenja, nekoliko je komplikacija povezanih sa hemofilijom od kojih je najčešća hemartroza koja dovodi do hemofilične artropatije. Najteža komplikacija je intrakranijalno krvarenje kod kojeg može doći do smrti.

Hemofilična artropatija je klinički znak koji se pojavljuje kod hemofiličara sa spontanim krvarenjima, uglavnom onih sa umjerenim i teškim oblikom bolesti. Već u dječjoj dobi, s porastom tjelesne aktivnosti počinju se javljati spontana krvarenja u zglobove. Može biti zahvaćen bilo koji zglob, međutim najčešće su pogođena koljena, gležnjevi i laktovi. Manje često su pogođena ramena, kukovi i zapešća. Često su krvarenja u zglobove povezana s traumom, međutim događaju se u stanjima mirovanja, čak i u snu. Krv u zglobu uzrokuje njegovo oštećenje te se kao prvi korak razvija upala- sinovitis. Opetovano krvarenje u jedan te isti zglob, koji se nakon 3 ili više krvarenja u nekoliko mjeseci naziva ciljani zglob, dovodi do hemofilične artropatije kod koje dolazi do uništenja zglobne hrskavice, smanjenog obujma pokretljivosti zgloba te atrofije mišića zbog smanjenje uporabe (11,12).

Najteža komplikacija hemofilije je intrakranijalno krvarenje. Događa se rijetko, u 2 - 8 %, ali uzrokuje ozbiljno stanje sa visokom smrtnosti od 34 %. Ukoliko dođe do te vrste krvarenja pacijent mora biti podvrgnut hitnoj neurokirurškoj intervenciji (13).

Poseban udio komplikacija kod hemofiličara čine krvlju prenosive bolesti. Početkom pojave virusa HIV-a i HCV-a, krvni pripravci nisu prolazili kontrolu na te viruse te je značajan broj hemofiličara obolio od AIDS-a i hepatitisa uzrokovanih virusom. Danas se taj broj smanjio zahvaljujući testiranju i inaktiviranju virusa u plazmi, kao i pojavom rekombinantne tehnologije koja isključuje ljudske davaoce (12).

1.7. Laboratorijska dijagnostika

Sumnja na hemofiliju B se najčešće postavlja ukoliko postoji hemoragijska diateza, pozitivna obiteljska anamneza ili kod preoperativne obrade. Kako je laboratorijska dijagnostika poremećaja hemostaze stupnjeviti dijagnostički postupak, započinje se s općim pretragama, brojem trombocita, protrombinskim vremenom (PV), aktiviranim parcijalnim trombotoplastinskim vremenom (APTV), trombinskim vremenom (TV) i fibrinogenom (14).

Bolesnici s hemofilijom A i B će kod mjerenja općih koagulacijskih pretraga imati izolirani povišeni nalaz APTV - a, dok će im vrijednosti ostalih pretraga, PV - a, TV - a i fibrinogena ostati u referentnim intervalima. Uzrok patološkog nalaza APTV - a se otkriva daljnjim testiranjem pojedinih čimbenika zgrušavanja, kod sumnje na jednu od hemofilija, FVIII za hemofiliju A ili FIX za hemofiliju B.

Aktivirano parcijalno trombotoplastinsko vrijeme (APTV) je koagulacijska pretraga koja mjeri učinkovitost unutarnjeg puta zgrušavanja krvi te se pomoću nje mogu otkriti pomanjkanja faktora XII, XI, IX, VIII i prekalikreina.

Uzorak za APTV je plazma siromašna trombocitima koja se dobiva centrifugom iz uzorka pune krvi pohranjene u epruvetu sa antikoagulansom (3,8 % Na - citrat). Jednaka količina plazme i APTV reagensa se miješa i inkubira te se dodaje kalcijev klorid što dovodi do formiranja ugruška. Vrijeme od aktivacije sustava zgrušavanja do formiranja ugruška predstavlja APTV, mjeri se u sekundama i **referentni interval iznosi 28 - 37 sekundi** (15,16).

APTV reagens se sastoji od kontaktnog aktivatora i fosfolipida. Kontaktni aktivator najčešće kaolin, silika ili elaginska kiselina za ulogu imaju pokretanje unutarnjeg puta zgrušavanja, dok fosfolipidi zamjenjuju trombocitne fosfolipide. Dodatak kalcija nakon inkubiranja je potreban za komplekse tenaze i protrombinaze koje pokreću zadnje stadije zgrušavanja (17).

Za konačnu potvrdu i klasifikaciju hemofilije B se mjeri aktivnost FIX u plazmi bolesnika. Metoda mjerenja aktivnosti FIX je objašnjena u odijeljku „materijali i metode“.

2. HIPOTEZA

Pretpostavka ovog istraživanja jest da se težina hemofilije B može pokazati laboratorijskim rezultatima APTV - a i aktivnosti FIX. Teži slučajevi imaju kliničku sliku sa prisutnim ciljnim zglobovima i vrlo niskom aktivnošću FIX i produljenom aktivnošću APTV - a, za razliku od blažeg oblika kod kojeg se kod povreda može vidjeti posljedica bolesti, a aktivnost FIX je umjereno snižena, te APTV - a umjereno produljena.

3. CILJ

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Utvrditi postojanje bolesti kod bolesnika sa kliničkom slikom hemoragijske diateze, određivanjem aktivnosti FIX i APTV - a u plazmi.
2. Usporedba težine bolesti na temelju rezultata/aktivnosti APTV - a i FIX i postojanja ciljnog zgloba.

4. MATERIJAL I METODE

4.1 Ispitanici

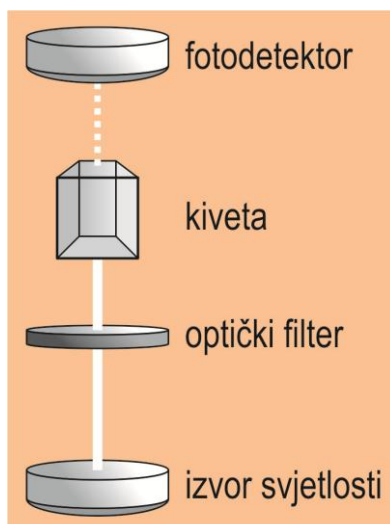
U ovom istraživanju uključeno je 30 bolesnika, muškog spola, s prisutnom hemoragijskom dijatezom, akutnom epizodom krvarenja bez osnovne dijagnoze ili s pozitivnom obiteljskom anamnezom. Ispitanici su obrađivani u Poliklinici Zavoda za hematologiju, KBC - a Zagreb. Uključeni su bolesnici u razdoblju od travnja 2017. do travnja 2018. Uzorak za istraživanje je plazma bolesnika.

4.2 Metode

Kod bolesnika sa sumnjom na hemofiliju B provedeno je određivanje aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTV) i aktivnosti FIX u plazmi bolesnika, fotometrijskim mjerenjem.

Fotometrijsko mjerenje temelji se na svojstvu promjene transmitancije odnosno apsorbancije u uzorku plazme ukoliko dođe do zgrušavanja. Transmitancija je pojam koji označava udio upadnog zračenja kojeg je otopina propustila dok je apsorbancija logaritam omjera intenziteta upadnog i propuštenog zračenja kroz uzorak.

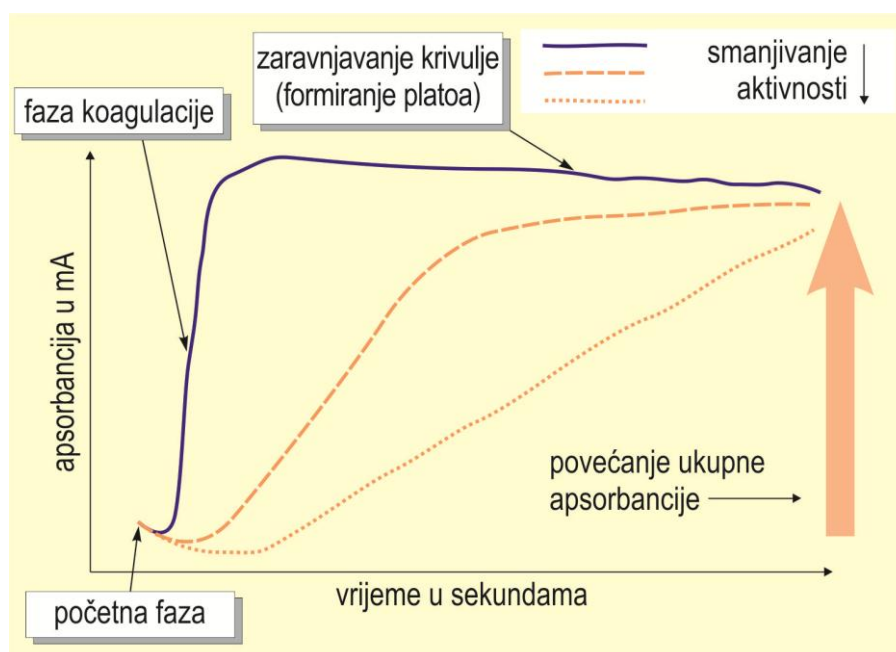
Zraka vidljive svjetlosti koju proizvodi lampa, reducira se pomoću optičkog filtera na točno određenu valnu duljinu, u ovom slučaju na 340, 405 ili 570 nm i prolazi kroz plazmu u kiveti. Zatim se jačina svjetlosti propuštena kroz kivetu mjeri fotodetektorom koji se nalazi iza nje, a analogni signal prolazne svjetlosti pretvara se u digitalni i računa se apsorbancija otopine u kiveti.



Slika 1. Princip rada metode mjerenja apsorbancije plazme, modificirano prema (18)

Mjerenjem apsorbancije u uzorku stvara se koagulacijska krivulja koja je rezultat stvaranja ugruška i koja se sastoji od nekoliko faza.

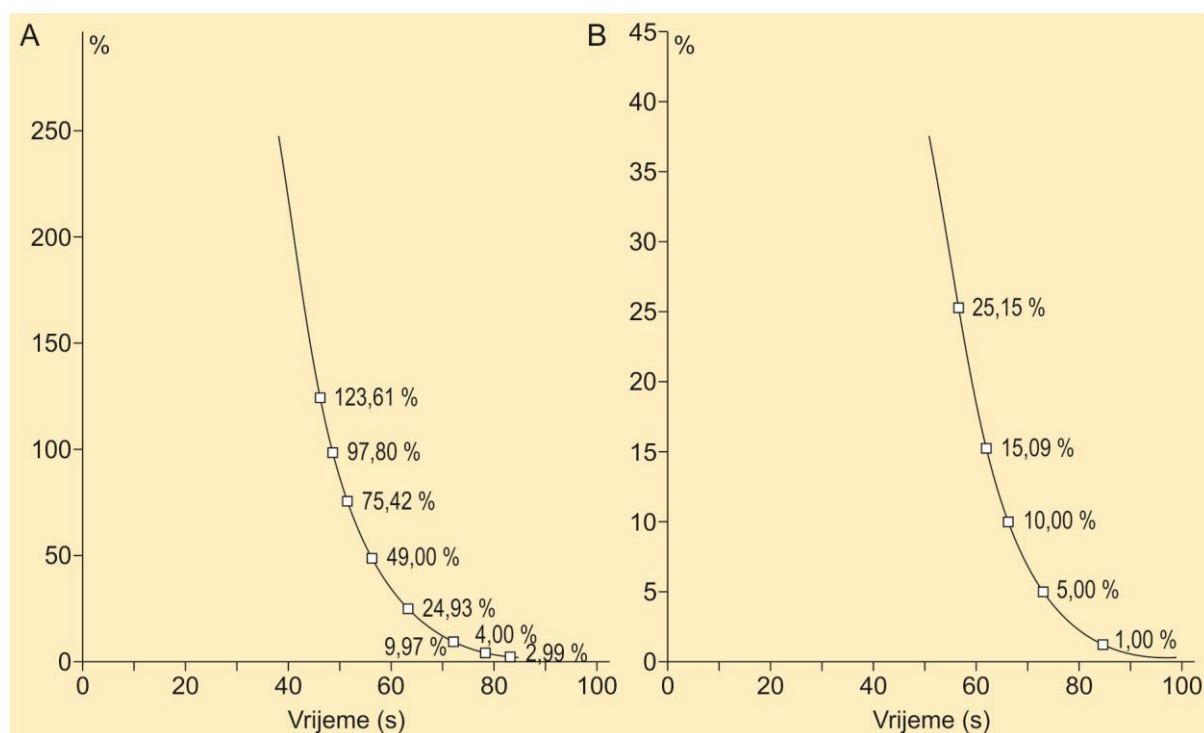
Prva je inicijalna faza u kojoj dolazi do aktivacije koagulacijske kaskade i u tom periodu ne postoji promjena apsorbancije odnosno transmitancije. Slijedeća je koagulacijska faza u kojoj se vidi porast apsorbancije zbog formiranja ugruška. Zatim slijedi, plato faza, kada je formacija ugruška završena, a apsorbancija konstantna. Rezultat APTV - a, dobiva se bilježenjem vremena u kojem se ugrušak počeo stvarati.



Slika 2. Primjer koagulacijske krivulje apsorbancije, modificirano prema (18)

Aktivnost FIX se mjeri modificiranom metodom mjerenja APTV - a. Određivanje aktivnosti se temelji na svojstvu da visoko razrijeđena plazma bolesnika korigira APTV plazme koja je deficitarna za FIX, odnosno ima aktivnost manju od 1 %. Uzorak plazme bolesnika se razrjeđuje puferom u omjeru 1:9 te se miješa sa plazmom deficitarnom za FIX. Vrijeme APTV - a potrebno za nastanak ugruška tada ovisi samo o aktivnosti FIX u uzorku jer deficitarna plazma sadrži sve ostale faktore zgrušavanja u suvišku. Iz prethodno izrađene kalibracijske krivulje, koja predstavlja odnos vremena zgrušavanja u sekundama (s) i aktivnosti FIX u razrijeđenjima standardne plazme očitava se aktivnost FIX (%) u uzorku.

U primjeru na slici 3. su prikazane dvije kalibracijske krivulje: jedna je, „normalna“ za očitavanje vrijednosti $> 5 \%$, a druga niska za očitavanje vrijednosti $< 10 \%$. **Referentni interval aktivnosti FIX za osobe starije od godinu dana iznosi 70 - 120 % aktivnosti (19).**



Slika 3. Primjer kalibracijskih krivulja za izračunavanje aktivnosti FIX, modificirano prema (20)

Mjerenja na uzorcima provedena su na analizatoru za procese hemostaze BCS XP, Siemens.

4.3 Statističke metode

Kategorijski podatci su predstavljeni apsolutnim frekvencijama. Razlike u kategorijskim podacima testirane su Fisherovim egzaktnim testom. Numerički podatci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro - Wilkovim testom. Razlike numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Mann - Whitney U testom, a između tri i više skupina Kruskal Wallisovim testom. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc Statistical Software version 18.9 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2018) i IBM SPSS Statistics 16 (SPSS Inc. Released 2007. SPSS for Windows, Version 16.0. Chicago, SPSS Inc.).

5. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na 30 muškaraca, s prisutnom hemoragijskom dijatezom, središnje vrijednosti (medijana) dobi 30 godina (interkvartilnog raspona od 25 - 53 godine) u rasponu od 8 do 83 godine.

Tablica 2. Raspodjela pacijenata po težini bolesti

Laboratorijski i klinički kriterij	Broj/ ukupno bolesnika
Gradus I	15/30
Gradus II	6/30
Gradus III	9/30

Stupanj hemofilije B određen je prema laboratorijskim vrijednostima FIX i kliničkoj slici bolesnika (laboratorijski i klinički kriterij).

Tablica 3. Raspodjela bolesnika po laboratorijskom kriteriju

Laboratorijski kriterij	Broj/ ukupno bolesnika
Gradus I (< 1 %)	11/30
Gradus II (1 – 5 %)	4/30
Gradus III (6 – 40 %)	15/30

Raspodjela bolesnika po stupnju hemofilije B ukoliko se koristi isključivo laboratorijski kriterij aktivnosti FIX.

Tablica 4. Raspodjela bolesnika po laboratorijskim parametrima

	Laboratorijski i klinički kriterij			P*
	Gradus I	Gradus II	Gradus III	
APTV				
28 - 37	1/15	1/6	6/9	0,006
> 37	14/15	5/6	3/9	
FIX				
< 70 %	15/15	6/6	9/9	-
< 40 %	15/15	6/6	9/9	-

Duljinu APTV - a u referentnom intervalu (28 - 37) ima 8/30 bolesnika, a vrijednosti veće od 37 njih 22/30. Vrijednosti veće od 37 imaju značajno više bolesnici sa stupnjem I (Fisherov egzaktni test, $P = 0,006$). Vrijednost aktivnosti FIX je kod svih bolesnika manja od referentnih (70 %), i od vrijednosti potrebnih za normalan tijek koagulacijskog procesa (40 %).

Tablica 5. Laboratorijski parametri po težini bolesti

	Laboratorijski i klinički kriterij			P*
	Gradus I	Gradus II	Gradus III	
APTV	57,6 (53,6 – 60,1)	41 (37,3 – 50,6)	36,8 (31,8 – 38,3)	< 0,001
FIX	0,01 (0,01 – 0,03)	0,11 (0,03 – 0,21)	0,13 (0,09 – 0,22)	< 0,001

Bolesnici stupnja III (po laboratorijskom i kliničkom kriteriju) imaju značajno niže vrijednosti APTV - a te značajno višu vrijednost aktivnosti FIX (Mann Whitney U test, $P < 0,001$), u odnosu na bolesnike s nižim stupnjem (tablica 5).

Tablica 6. Prisutnost ciljnog zgloba po težini bolesti (Fisherov egzaktni test)

	Gradus I	Gradus II	Gradus III	P*
Ciljni zglob				
da	15/15	4/6	1/9	0,63
ne	0/15	2/6	8/9	

Što se tiče prisutnosti ciljnog zgloba u odnosu na stupanj bolesti, nisu nađene značajne razlike (Tablica 6.)

Tablica 7. Povezanost ciljnog zgloba sa laboratorijskim parametrima

	Ciljni zglob – prisustvo		P*
	Ne	Da	
APTV	36,9 (31,9 – 38,6)	55,4 (49,6 – 58,4)	< 0,001
FIX	0,16 (0,11 – 0,26)	0,01 (0,01 – 0,06)	< 0,001

Bolesnici s prisutnim ciljnim zglobom imaju značajno više vrijednosti APTV (Mann Whitney U test, $P < 0,001$), i značajno niže vrijednosti FIX (Mann Whitney U test, $P < 0,001$) u odnosu na bolesnike koji nemaju prisutan ciljni zglob (tablica 7.)

Tablica 8. Ciljni zglobovi u ispitanika

Pogođeni zglob/zglobovi	Broj bolesnika
Oba koljena	4
Lijevo koljeno	4
Desno koljeno	3
Oba lakta	4
Lijevi lakat	3
Desni lakat	2
Desni gležanj	5
Lijevi gležanj	2
Oba kuka	1
Lijevi kuk	1
Desni kuk	1
Humeroskapularni zglob	1

6. RASPRAVA

Istraživanje je provedeno na skupini od 30 muškaraca, sa prisutnom hemoragijskom dijatezom, akutnom epizodom krvarenja bez osnovne dijagnoze ili s pozitivnom obiteljskom anamnezom.

Laboratorijski pokazatelj patološkog stanja u unutarnjem putu koagulacije, koje je prisutno ukoliko bolesnik ima hemofiliju B, je produljeno vrijeme aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTV). Međutim, normalan nalaz APTV - a ne isključuje prisutnost hemofilije B jer je u slučajevima blagog oblika bolesti taj parametar nedovoljno osjetljiv i unutar referentnog intervala. Kako bi točan poremećaj mogao biti određen, potrebno je determiniranje laboratorijskih parametara specifičnih za pojedinu bolest. Smanjena aktivnost FIX je specifični i potvrdni laboratorijski pokazatelj za hemofiliju B (14,21).

Statističkom obradom podataka pokazalo se da bolesnici svrstani u stupanj I imaju značajno produljeno vrijeme APTV - a, dok je dvije trećine pacijenata sa blagim oblikom bolesti, stupnjem III imalo APTV unutar referentnog intervala (tablica 4). Svi bolesnici su imali aktivnost FIX manju od referentnog intervala, kao i od vrijednosti potrebne za normalan proces koagulacije.

Bolesnici su svrstani u 3 skupine po težini hemofilije B koje su im dodjeljene prilikom pregleda, stupanj I u koji spadaju najteži slučajevi, stupanj II koji ima heterogenu kliničku sliku te stupanj III u koji spadaju blaži slučajevi. Kriterij za klasifikaciju po skupinama temelji se na kombinaciji kliničke slike bolesnika i na temelju vrijednosti FIX jer u određenim slučajevima razina FIX ne korelira sa kliničkom slikom bolesnika (8).

U provedenom istraživanju pokazalo se da bolesnici s najtežim stupnjem hemofilije B imaju visoke vrijednosti APTV - a, interkvartilnog raspona od 53,6 s do 60,1 s i veoma nisku aktivnost FIX, interkvartilnog raspona 0,01 % - 0,03 % što upućuje na veoma produžen proces koagulacije, odnosno izrazitu sklonost krvarenju. Interkvartilni raspon APTV - a kod bolesnika sa stupnjem II kreće se od 37,3 s, odnosno od rezultata koji se nalazi malo iznad gornje granice referentnog intervala, pa sve do 50,6 s, znatno povećanog rezultata (tablica 5). Interkvartilni raspon aktivnosti FIX je 0,03 % - 0,21 %. Navedeni rezultati upućuju da bolesnici unutar stupnja II imaju različite sklonosti krvarenju te vrlo vjerojatno heterogenu

kliničku sliku. Bolesnici sa stupnjem III imaju značajno niže vrijednosti APTV - a te značajno višu vrijednost aktivnosti FIX u odnosu na one sa stupnjem I i II (tablica 5.) Interkvartilni raspon APTV - a iznosi između 31,8 s do 38,3 s, a FIX 0,09 % - 0,22 % što upućuje na umjerenu sklonost krvarenju.

Ukoliko su bolesnici svrstani u stupnjeve isključivo prema laboratorijskom kriteriju, odnosno razini aktivnosti FIX, šest pacijenata ovog istraživanja nije podudarno s dodijeljenim stupnjem bolesti. Navedeno upućuje da razina aktivnosti FIX i klinička slika bolesnika nije podudarna u svim slučajevima.

Glavno obilježje pacijenata hemofilije B je hemoragijska diateza, koja uzrokuje različita patološka stanja bolesniku, razmjerno težini bolesti. Kod težih slučajeva, krvarenje se javlja spontano i dolazi do hemartroze, krvarenja u zglobove. Krvarenje se vrlo često ponavlja u jedan te isti zglob te se tada on naziva ciljani. Kod blažih slučajeva, krvarenja se događaju tek kod trauma. Bilo koji zglob može biti pogođen, međutim najčešće pogođeni zglob je koljeno, gležanj i lakat (11, 12).

U ovom istraživanju, svi bolesnici sa stupnjem I imaju prisutan ciljani zglob, za razliku od stupnja III gdje ga ima jedan od devet bolesnika. Unutar stupnja II prisutnost ciljnog zgloba je raznolika. Bolesnici koji u provedenom istraživanju imaju prisutan ciljani zglob, imaju značajno više vrijednosti APTV - a i značajno niže vrijednosti FIX u odnosu na one koji ga nemaju. Najčešće pogađani zglobovi kod bolesnika su bili koljeno, lakat i gležanj, u skladu sa podatkom o najčešće pogođenim zglobovima.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- Produljena aktivnost APTV - a može ukazivati na prisutnost hemofilije B, međutim u bolesnika s blažim oblikom je nedovoljno osjetljiv parametar. Kako bi se dokazala prisutnost bolesti, specifičan i potvrđan parametar je aktivnost FIX koja je u svih bolesnika ovog istraživanja bila ispod razine potrebne za normalan tijek koagulacije.
- Razine aktivnosti FIX i APTV su povezani sa težinom bolesti, i to tako da teži bolesnici imaju nižu razinu aktivnosti FIX i više produljeno APTV, dok bolesnici sa blagim oblikom bolesti imaju značajno više vrijednosti FIX i manje produljeno APTV.
- Razina aktivnosti FIX nije u svim istraženim slučajevima bila povezana sa kliničkim stanjem bolesnika te je potreban i klinički pregled kako bi se pacijentu dodijelio gradus bolesti.
- Prisutnost ciljnog zgloba je prisutna kod teških oblika bolesti dok je APTV kod takvih bolesnika bio značajno produljen, a aktivnost FIX značajno manja.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: istražiti povezanost vrijednosti laboratorijskih rezultata APTV - a i razine aktivnosti FIX te izgleda kliničke slike sa težinom hemofilije B.

Nacrt studije: Istraživanje slučaja

Ispitanici i metode: Istraživanje je provedeno na 30 muških bolesnika sa prisutnom hemoragijskom diatezom, akutnom epizodom krvarenja bez osnovne dijagnoze ili s pozitivnom obiteljskom anamnezom na hemofiliju B. Iz plazme bolesnika provedeno je određivanje dužine APTV - a i razina aktivnosti FIX fotometrijskom metodom

Rezultati: Bolesnici s težim oblikom bolesti imaju niže vrijednosti aktivnosti FIX i povišene vrijednosti APTV - a, te pokazuju prisustvo ciljnog zgloba za razliku od bolesnika sa lakšim oblikom bolesti koji imaju značajno niže vrijednosti APTV - a, više vrijednosti aktivnosti FIX i nemaju prisutan ciljni zglob.

Zaključak: Težina hemofilije B se može procijeniti laboratorijskim rezultatima APTV - a i razinom aktivnosti FIX.

Ključne riječi: hemofilija B, dužina APTV - a, aktivnost FIX, ciljni zglob

9. SUMMARY

Objectives: To examine interconnection of laboratory values of APTV and activity of FIX, and clinical appearance with severity of haemophilia B.

Study design: Case study

Participants and methods: The study was done on 30 male patients with presence of the haemorrhagic diathesis, acute bleeding without established diagnosis or presence of family anamnesis of haemophilia B. In the patients plasma, APTV and activity of FIX were determined using photometric method.

Results: Patients with the severe form of disease have lower activity of FIX and higher values of APTV with presence of the target joint, while patients with the mild form have significantly higher activity of FIX and lower values of APTV without presence of the target joint.

Conclusion: Severity of haemophilia B can be determined with laboratory results of APTV and activity of FIX.

Key words: haemophilia B, APTV value, activity of FIX, target joint

10. LITERATURA

1. Repozitorij Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Horvat V. Hemofilije u djece. Diplomski rad, 2014. Dostupno na adresi: <https://repozitorij.mef.unizg.hr/islandora/object/mef%3A90/datastream/PDF/view>. Datum pristupa: 27.9.2018.
2. Medscape. Zaiden RA . Hemophilia B. 2017. Dostupno na adresi: <https://emedicine.medscape.com/article/779434-overview#a5>. Datum pristupa: 27.9.2018.
3. Gale AJ. Current Understanding of Hemostasis. Toxiol Pathol. 2011;39(1):273-280.
4. Labar B, Hauptman E. Hematologija . 3. izd. Zagreb: Školska knjiga; 1998.
5. National Hemophilia Foundation for all bleeding disorders. Hemophilia B. Dostupno na adresi: <https://www.hemophilia.org/Bleeding-Disorders/Types-of-Bleeding-Disorders/Hemophilia-B>. Datum pristupa: 13.11.2018.
6. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. Interna medicina. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008.
7. Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments and its complications. Lancet. 2016; 388(10040), 187-97.
8. National Center for Biotechnology Information . Konkle BA, Huston H, Fletcher SN. Hemophilia B. 2017. Dostupno na : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1495/>. Datum pristupa: 13.11. 2018.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Hemophilia Data and Statistics in the United States. Dostupno na adresi: <https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/data.html>. Datum pristupa: 13.11. 2018.
10. Kulkarni R, Soucie JM, Lusher J, Presley R, Shapiro A, Gill J, i sur. Site of initial bleeding episodes, mode of delivery and age of diagnosis in babies with haemophilia diagnosed before the age of 2 years. Haemophilia. 2009; 15: 1281-90.

11. Caracao MD. The diagnosis and management of congenital Hemophilia. *Semin Thromb and Hemost.* 2012; 38(07): 727-34.
12. Repozitorij Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kustura A. Nasljedna i stečena hemofilija. Diplomski rad, 2016. Dostupno na adresi: <https://repozitorij.mef.unizg.hr/islandora/object/mef%3A1189/datastream/PDF/view>. Datum pristupa: 15.11. 2018.
13. Hedge A, Nair R, Upadhyaya S. Spontaneous intracerebral hemorrhage in hemophiliacs-A treatment dilemma. *Int J Surg Case Rep.* 2016; 29: 17–19.
14. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M, Barišić I, Erceg D. i sur. *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi.* 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada;2018.
15. Ignjatovic V. Activated Partial Thromboplastin Time. *Methods Mol Biol.* 2013;992:111-20.
16. Poliklinika Stela. Koagulacijske pretrage – APTV. Dostupno na adresi: http://www.poliklinikastela.hr/Aktivirano_parcijalno_tromboplastinsko_vrijeme_APTV.html. Datum pristupa: 16.11.2018.
17. Practical hemostasis. A practical guide to laboratory haemostasis. Activated partial Thromboplastin time (APTT). Dostupno na adresi: <http://www.practical-haemostasis.com/Screening%20Tests/aptt.html>. Datum prisutpa: 16.11.2018.
18. Siemens Diagnostics. BCS® XP System – Training Manual. Verzija 2.0.
19. Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice. Klinički zavod za kemiju. Laboratorij. Faktor IX (FIX) - % aktivnosti. Dostupno na adresi: <http://klinkemija.kbcm.hr/test.php?recordID=85>. Datum pristupa: 20.11.2018.
20. Zdravstveno veleučilište u Zagrebu. Interna skripta za studente medicinsko laboratorijske dijagnostike, 3 god. Transfuzijska medicina. Mjerenje aktivnosti FIX – koagulacijska metoda
21. Medscape. Schwartz RA, Factor IX Deficiency (Hemophilia B) Workup. 2018. Dostupno na adresi: <https://emedicine.medscape.com/article/199088-workup>. Datum pristupa: 20.11.2018.

11. ŽIVOTOPIS

Luka Pešut

Datum i mjesto rođenja: 06.06.1992., Zagreb, Republika Hrvatska

Adresa: Topolovec 4, 10340 Vrbovec

E-adresa: luka.pst@gmail.com

Obrazovanje:

2016. – 2019. Medicinski fakultet u Osijeku – diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

2013. – 2016. Zdravstveno veleučilište Zagreb – preddiplomski stručni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

2007. – 2011. Tehnička škola „Ruđer Bošković“