

Ana-Katarina Kralj

**Verifikacija metoda za određivanje koncentracije
novih oralnih antikoagulanasa: dabigatrana,
rivaroksabana i apiksabana**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 2 na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, a izrađen je na Kliničkom zavodu za kemiju KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Nade Vrkić i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Sandre Margetić, znanstvene suradnice. Eksperimentalni dio ovog diplomskog rada u cijelosti je financijski podržan od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) u sklopu istraživačkog projekta HRZZ-IP-2016-06-8208 pod nazivom „Novi oralni antikoagulansi: povezanost koncentracije lijeka i antikoagulantnog učinka“.

ZAHVALA

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Nadi Vrkić i dr. sc. Sandri Margetić na stručnom vodstvu, strpljenju i povjerenju iskazanom u procesu izradnje ovog diplomskog rada te na srdačnom i profesionalnom pristupu i prijateljskom odnosu.

Zahvaljujem i osoblju Kliničkog zavoda za kemiju KBC Sestre milosrdnice na ukazanoj pomoći i ljubaznosti.

Zahvaljujem svojoj obitelji, majci, ocu, bakama i djedovima bez čije financijske i emotivne potpore ni početak ni završetak ovog studija ne bi bio moguć. Zahvaljujem im na ljubavi i strpljenju koje su mi pružili tijekom svih pet godina i sedam mjeseci mojeg studija, kojega su učinili podnošljivim.

Zahvaljujem i svojim prijateljima i kolegama uz čiji je vedar duh i ohrabrenja svaki ispit bio malo opušteniji, a svaki stres malo lakši.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Fiziološke osnove sustava hemostaze	1
1.1.1.	Primarna hemostaza	1
1.1.2.	Sekundarna hemostaza	2
1.1.3.	Fibrinolitički sustav	4
1.2.	Antikoagulantna terapija	4
1.2.1.	Trombofilija	4
1.2.2.	Vrste antikoagulantnih lijekova	5
1.3.	Verifikacija kvantitativnih mjernih postupaka	11
2.	OBRAZLOŽENJE TEME	12
3.	MATERIJALI I METODE	13
3.1.	Opis postupka verifikacije kvantitativnih automatiziranih metoda za određivanje koncentracije NOAK lijekova	13
3.1.1.	Provjera preciznosti	13
3.1.2.	Unutarlaboratorijska preciznost	13
3.1.3.	Povećana mjerna nesigurnost	14
3.1.4.	Provjera linearnosti metode	14
3.1.5.	Usporedba metode s postojećim sustavom	15
3.1.6.	Provjera donje granice detekcije i donje granice kvantifikacije	17
3.1.7.	Provjera referentnih intervala	18
3.2.	Metode određivanja koncentracije NOAK lijekova	18
3.2.1.	Behring Coagulation System XP (BCSXP)	19
3.2.2.	Compact MAX, Stago	19
3.2.3.	Metode određivanja koncentracije dabigatrana	20
3.2.4.	Metode određivanja koncentracija rivaroksabana i apiksabana	23
4.	REZULTATI I RASPRAVA	29

4.1.	Rezultati ispitivanja metoda za određivanje koncentracije dabigatrana	29
4.1.1.	Rezultati ispitivanja metode za određivanje koncentracije dabigatrana Innovance DTI testom na analitičkom sustavu BCSXP	29
4.1.2.	Rezultati ispitivanja metode za određivanje koncentracije dabigatrana ECA II testom na analitičkom sustavu Compact MAX	32
4.2.	Rezultati ispitivanja metoda za određivanje koncentracije rivaroksabana	35
4.2.1.	Rezultati ispitivanja metode Innovance anti Xa za određivanje koncentracije rivaroksabana na analitičkom sustavu BCSXP	35
4.2.2.	Rezultati ispitivanja metode Liquid anti Xa na Compact MAX Stago analitičkom sustavu za određivanje koncentracije rivaroksabana	38
4.3.	Rezultati ispitivanja metoda za određivanje koncentracije apiksabana	41
4.3.1.	Rezultati ispitivanja metode za određivanje apiksabana Innovance heparin anti-Xa testom na analitičkom sustavu BCSXP	41
4.3.2.	Rezultati ispitivanja metode Liquid anti Xa na Compact MAX Stago analitičkom sustavu za određivanje koncentracije apiksabana	44
5.	ZAKLJUČAK	53
6.	LITERATURA	54
7.	SAŽETAK / SUMMARY	57
7.1.	Sažetak	57
7.2.	Summary	58
8.	PRILOZI	59
8.1	Popis kratica	59
9.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Fiziološke osnove sustava hemostaze

Hemostatski sustav je složen proces zaštite organizma od gubitka krvi pomoću niza povezanih reakcija. Sastoji se od dva dijela: sustava zgrušavanja i sustava fibrinolize, a njegove su sastavnice endotelne stanice krvnih žila, trombociti, te brojni aktivatori i inhibitori zgrušavanja i fibrinolize (Bahuleyan, 2015).

S patofiziološkog gledišta hemostatski sustav možemo podijeliti na primarnu i sekundarnu hemostazu i fibrinolitički sustav. U odsustvu patoloških zbivanja, pojedine komponente sustava zgrušavanja i fibrinolize nalaze se u međusobnoj strogo reguliranoj dinamičkoj ravnoteži čime je spriječena hipokoagulabilnost kao i hiperkoagulabilnost cirkulirajuće krvi (Slika 1). Stoga u normalnom fiziološkom stanju organizma ne postoji povećana sklonost trombozi ili krvarenju. Stari model hemostatskog sustava prema kojem se hemostaza dijeli na unutarnji i vanjski put zgrušavanja, zamijenjen je potpunijim, staničnim modelom sustava hemostaze, u kojem su sve sastavnice sustava zgrušavanja međusobno povezane i djeluju zajednički (Slika 2).



Slika 1. Prikaz hemostatskog sustava u fiziološkom stanju koje obilježava dinamička ravnoteža prokoagulantnih i antikoagulantnih sastavnica

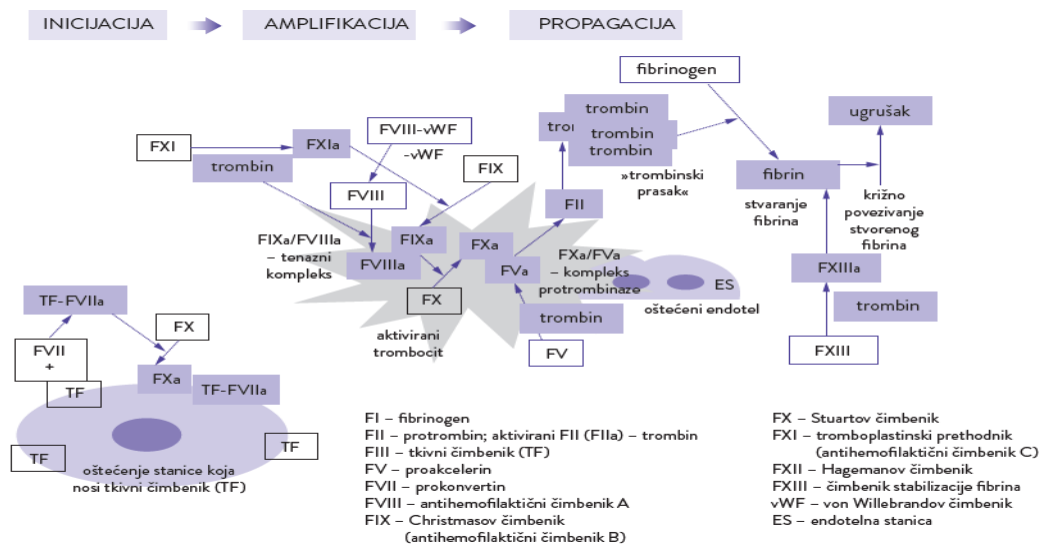
1.1.1. Primarna hemostaza

Primarna hemostaza je nastanak trombocitnog ugruška na mjestu ozljede krvne žile pri čemu krv dolazi u dodir sa subendotelom, a nastanak trombocitnog ugruška odvija se u slijedu događaja koji uključuju adheziju, aktivaciju i agregaciju trombocita. Adhezija trombocita posredovana je vezanjem glikoproteinskog kompleksa GP Ib/IX/V trombocita s von Willebrandovim čimbenikom (engl. *vWF*, *von Willebrand factor*) (Bahuleyan, 2015). Adhezija trombocita omogućuje njihovu aktivaciju koju obilježavaju brojne morfološke i funkcionalne promjene trombocita: promjenu oblika iz diskoidnog u sferični oblik s

izdancima (što im omogućuje povećavanje površine), premještanje membranskih fosfolipida na vanjsku stranu membrane, izlaganje membranskih trombocitnih receptora (glikoproteina) i sekreciju sadržaja granula. Nakon aktivacije trombocita dolazi do njihova međusobnog povezivanja ili agregacije i stvaranja primarnog hemostatskog ugruška. U procesu agregacije trombocita ključnu ulogu ima vezanje glikoproteinskog kompleksa GP IIb/IIIa na fibrinogen čime je omogućeno povezivanje susjednih trombocita (Margetić, 2017).

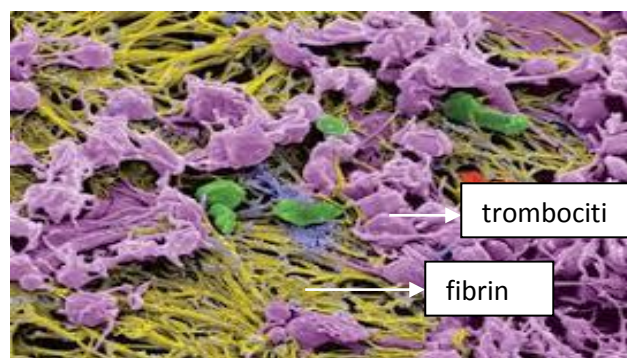
1.1.2. Sekundarna hemostaza

Sekundarna hemostaza uključuje aktivaciju čimbenika zgrušavanja kako bi nastao fibrin koji u konačnici s trombocitnim ugruškom tvori stabilan trombocitno – fibrinski ugrušak. Proces zgrušavanja počinje izlaganjem tkivnog čimbenika (engl. *TF, tissue factor*) oštećenih stanica u krv, a sam proces sekundarne hemostaze može se podijeliti u tri faze – inicijacijsku, amplifikacijsku i propagacijsku (Slika 2). Inicijacijska faza započinje vezanjem tkivnog čimbenika i čimbenika VII, pri čemu TF aktivira čimbenik VII i nastaje aktivni kompleks TF-FVIIa. Nastali kompleks TF – FVIIa potiče aktivaciju čimbenika zgrušavanja IX i X u FIXa, odnosno, FXa. FXa se zatim povezuje s FVa te tvori kompleks protrombinaze (Slika 2), koji aktivira protrombin (FII), te nastaje trombin. Stvaranje aktiviranog FII (FIIa) ili trombina središnji je događaj u cjelokupnom procesu aktivacije sustava zgrušavanja koji u konačnici omogućuje pretvorbu fibrinogena u fibrin, ali tijekom pojedinih faza aktivacije sustava zgrušavanja ima i brojne druge funkcije, kao što su izravna aktivacija trombocita i drugih čimbenika zgrušavanja (FV, FVIII, FIX, FXI, FXIII). Tako u fazi amplifikacije zgrušavanja, u kojoj glavnu ulogu od endotelnih stanica preuzimaju trombociti, prve male količine trombina stvorene u inicijacijskoj fazi aktiviraju trombocite i pojedine čimbenike zgrušavanja.



Slika 2. Prikaz staničnog modela sustava hemostaze, preuzeto iz: Margetić S, Čaržavec D. Bolesti hemostaze. U: Topić E. i sur., *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi*, 2. Izdanje, Zagreb, Medicinska naklada, 2018.

U propagacijskoj fazi čimbenik zgrušavanja XIa, vezan za aktivirane trombocite, aktivira čimbenik IX u FIXa, koji se potom, u prisutnosti kalcijevih iona, veže s FVIIIa u tenazni kompleks. (Slika 2). Tenazni kompleks u daljnjem slijedu aktivira čimbenik X (FX) u FXa. FXa i FVa na površini trombocita stvaraju već spomenuti kompleks protrombinaze. Posljedično stvaranje velike količine trombina rezultira pretvorbom fibrinogena u fibrin i međusobnim križnim povezivanjem molekula fibrina djelovanjem čimbenika zgrušavanja XIII (FXIII). Tenazni kompleks i kompleks protrombinaze na taj način djeluju zajednički u pozitivnoj povratnoj sprezi, uzrokujući ubrzano nastajanje trombina i posljedično fibrina. Polimerizacijom i kovalentnim povezivanjem fibrinskih vlakana nastaje stabilan trombocitno – fibrinski ugrušak (Slika 3).



Slika 3. Prikaz trombocitno – fibrinskog ugruška. Preuzeto iz:

<https://www.pennmedicine.org/news/news-blog/2012/december/dynamic-clots-make-for-dynamic>

Osim čimbenika zgrušavanja, u plazmi se nalaze i fiziološki inhibitori zgrušavanja kao što su protein C (PC), protein S (PS), antitrombin (AT) i inhibitor puta tkivnog ugruška (TFPI, engl.

tissue factor pathway inhibitor). Osnovna funkcija navedenih inhibitora zgrušavanja je regulacija sustava zgrušavanja ograničavanjem njegove aktivacije na mjesto ozljede i sprječavanje prekomjerne i spontane aktivacije zgrušavanja. Antitrombin inhibira uglavnom trombin (FIIa) i čimbenik Xa (FXa), ali i FXIa i FXIIa. PC, nakon aktivacije trombomodulinom iz endotelnih stanica, uz svoj kofaktor, PS, inaktivira aktivirane čimbenike zgrušavanja FVa i FVIIIa. TFPI inaktivira aktivni kompleks TF-FVIIa tako što stvara inaktivni kvarterni kompleks s TF/FVIIa/FXa.

1.1.3 Fibrinolitički sustav

Osnovna uloga sustava fibrinolize jest razgradnja ugruška koji je ispunio svoju funkciju te zaustavljanje prekomjernog stvaranja fibrina nastalog aktivacijom sustava zgrušavanja. U procesu fibrinolize ključnu ulogu ima enzim plazmin, koji nastaje aktivacijom plazminogena. Stvoreni plazmin razgrađuje fibrin, pri čemu nastaju brojni razgradni produkti različite veličine, a među njima i najmanji razgradni produkt D – dimer (Danesh, 2001).

Razgradni produkti fibrina djeluju inhibitorno na aktivnost sustava zgrušavanja. U regulaciji fibrinolitičkog sustava sudjeluju aktivatori kao što su tkivni aktivator plazminogena (tPA) i urokinazni aktivator plazminogena (uPA), pri čemu tPA djeluje uglavnom u cirkulirajućoj krvi, dok uPA uglavnom aktivira plazminogen vezan na stanice (Labar, 2007.) Inhibitori sustava fibrinolize su α_2 – antiplazmin koji izravno inhibira plazmin, inhibitor aktivatora plazminogena – 1 (PAI – 1) koji inhibira tPA i uPA te trombinom aktivirani inhibitor fibrinolize (TAFI) koji inhibira pretvorbu plazminogena u plazmin (Margetić i sur., 2017).

1.2. Antikoagulantna terapija

1.2.1. Trombofilija

Bolesti hemostaze se mogu podijeliti na poremećaje koji se klinički očituju povećanom sklonošću krvarenju koje nastaje kao posljedica hipokoagulabilnosti krvi ili trombozi u čijoj je patofiziološkoj podlozi hiperkoagulabilnost krvi.

U liječenju hiperkoagulabilnih stanja različitih uzroka, uključujući i tromboembolijska stanja ili trombofilije, primjenjuju se antikoagulantni lijekovi. Tromboembolijske bolesti koje uključuju arterijsku i vensku trombozu, predstavljaju značajan općezdravstveni problem u ekonomski razvijenim zemljama, pa tako i u Republici Hrvatskoj (Kralj, 2007).

Trombofilija se definira kao povećana sklonost trombozi zbog raznih, nasljednih i/ili stečenih čimbenika. Klinički se očituje najčešće kao venska tromboembolija (VTE) koja uključuje duboku vensku trombozu (DVT) i plućnu emboliju (PE). Pojavnost VTE je oko 1-2 na 1000

osoba godišnje u razvijenim zemljama (Cohen, 2007). VTE može biti uzrokovana nasljednim čimbenicima rizika, kao što su rezistencija na aktivirani protein C/mutacija gena za faktor V (APCR/Faktor V Leiden), mutacija FII (protrombina) te manjak fizioloških inhibitora zgrušavanja (PC, PS i AT). Uzrok mogu biti i stečeni čimbenici kao što je antifosfolipidni sindrom kojeg obilježava prisutnost antifosfolipidnih antitijela (lupus antikoagulans (LA)), antikardiolipinska antitijela (aCL) i anti-beta2-glikoprotein I antitijela (anti-β2-GPI). Nezavisni čimbenik VTE je i hiperhomocisteinemija (povećana koncentracija homocisteina u krvi), koja može biti nasljedna ili stečena, te povećana aktivnost čimbenika zgrušavanja VIII (FVIII) za kojeg još uvijek nije nedvojbeno utvrđeno radi li se o nasljednom ili stečenom čimbeniku ili oboje (Margetić, 2014).

Za razliku od VTE, arterijska tromboza se klinički očituje kao akutni infarkt miokarda (AIM) ili moždani udar (MU). Rizični čimbenici arterijske tromboze su uglavnom stečeni i uključuju hiperlipidemiju, hipertenziju, pretilost, kardiovaskularne i mijeloproliferativne bolesti. Od poznatih čimbenika rizika VTE, do danas je jednoznačno pokazana povezanost arterijske tromboze s antifosfolipidnim sindromom i hiperhomocisteinemijom (Margetić, 2014).

Kako je već navedeno u uvodnom dijelu ovog odjeljka, osnovni pristup u prevenciji i liječenju hiperkoagulabilnih stanja koja se očituju arterijskom ili venskom trombozom predstavlja antikoagulantna terapija.

1.2.2. Vrste antikoagulantnih lijekova

1.2.2.1. Heparin

Heparin je antikoagulantni lijek koji svoj antikoagulantni učinak ostvaruje inaktivacijom pojedinih aktiviranih čimbenika zgrušavanja, uz prethodno vezanje na fiziološki inhibitor zgrušavanja AT, pri čemu nastaje kompleks heparin – AT (Mannucci, 2011). Niskomolekularni heparin (engl. *low molecular weight heparin, LMWH*) uglavnom inaktivira FXa, a nefrakcionirani heparin (engl. *unfractionated heparin, UFH*) većinom inaktivira trombin (FIIa), te u manjoj mjeri i FIXa, FXa, FXIa i FXIIa.

Heparin je po svojoj strukturi smjesa glikozaminoglikana i primjenjuje se isključivo parenteralno, zbog aktivnosti enzima heparinaze u probavnom traktu (sline). Nefrakcionirani heparin, zbog nepredvidivih farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava, male bioraspoloživosti i uskog terapijskog intervala, zahtijeva redovito praćenje terapijskog učinka pomoću pretrage aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) (Kottke - Marchant, 2012).

Niskomolekularni heparin je oblik heparina koji se dobiva enzimskom ili kemijskom razgradnjom molekule nefrakcioniranog heparina. Ima određene prednosti u odnosu na nefrakcionirani heparin, uključujući veću bioraspodivnost i predvidiv odgovor na terapiju, može se primijeniti i supkutano (a ne isključivo intravenski), te znatno rjeđe izaziva komplikaciju liječenja heparinom induciranu trombocitopeniju (HIT). Stoga primjena niskomolekularnog heparina ne zahtijeva rutinsko laboratorijsko praćenje terapije. Izuzetak su određene populacije bolesnika ili klinička stanja (djeca, prekomjerna ili premala tjelesna težina, ili bubrežna bolest pacijenta). Ukoliko je u navedenim stanjima potrebno pratiti antikoagulantni učinak niskomolekularnog heparina, prikladna laboratorijska pretraga je heparin – anti Xa test (Kottke - Marchant, 2012).

1.2.2.2. Antagonisti vitamina K

Antagonisti vitamina K su kemijski spojevi koji se nazivaju kumarini, a svoj antikoagulantni učinak ostvaruju sprečavanjem posttranslacijske gama – karboksilacije glutaminske kiseline u strukturi čimbenika zgrušavanja ovisnih o vitaminu K (FII, FVII, FIX i FX) s posljedičnim nastankom tzv. PIVKA proteina (engl. *Proteins Induced in Vitamin K Absence*) ili nefunkcionalnih čimbenika zgrušavanja nastalih u odsutnosti vitamina K. Osim navedenih čimbenika zgrušavanja, smanjena je i aktivnost fizioloških inhibitora proteina C i proteina S, koji su također ovisni o vitaminu K (Fareed, 2012).

Neke od karakteristika antagonista vitamina K su uski terapijski raspon, velik utjecaj prehrane, lijekova i genetskih čimbenika na biološki odgovor te oralna primjena. Zbog uske terapijske širine lijeka potrebno je učestalo laboratorijski pratiti učinkovitost terapije ovim lijekovima (Kitchen, 2013). Za laboratorijsko praćenje terapije antagonistima vitamina K koristimo pretragu protrombinsko vrijeme (PV) izraženo kao internacionalizirani normalni omjer (INR, engl. *International Normalized Ratio*), zbog različite osjetljivosti pojedinih tromboplastinskih reagenasa na manjak čimbenika zgrušavanja (Ansell, 2008). Za ostale pacijente (one koji nisu na terapiji antagonistima vitamina K), rezultat PV-a se izražava kao udjel ili omjer (Ansell, 2008).

Unatoč značajnoj terapijskoj učinkovitosti ovih lijekova u prevenciji i liječenju tromboembolijskih stanja, istodobni brojni nedostaci kao što su brojne interakcije s hranom i lijekovima, uska terapijska širina i posljedična potreba za stalnim laboratorijskim praćenjem, kao i neželjene nuspojave poput krvarenja, razlog su stalnih istraživanja usmjerenih razvoju novijih, učinkovitijih i sigurnijih oralnih antikoagulantnih lijekova neovisnih o vitaminu K.

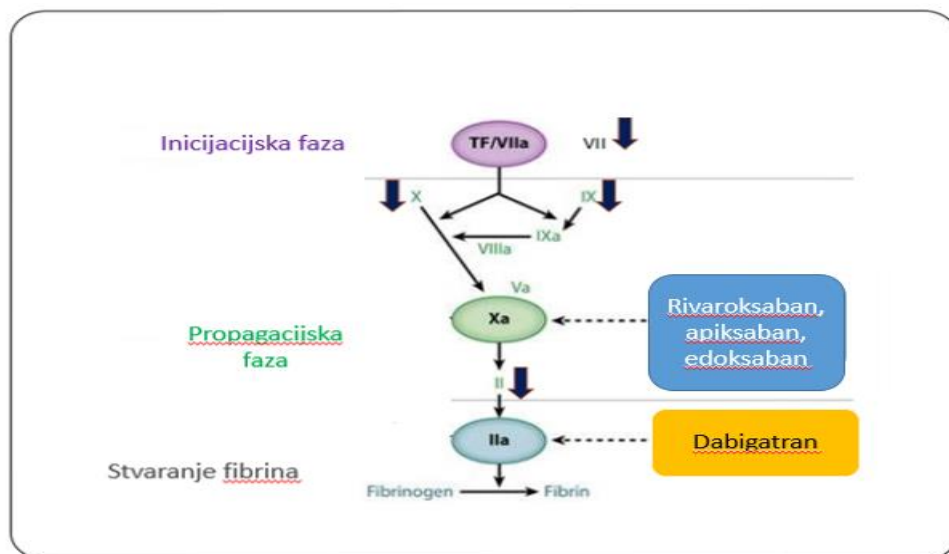
1.2.2.3. Novi oralni antikoagulansi (NOAK)

Novi oralni antikoagulansi (NOAK) su lijekovi koji se posljednjih nekoliko godina sve više koriste u prevenciji i liječenju venske i arterijske tromboze.

Do danas je odobrena uporaba NOAK lijekova u većini europskih zemalja, pa tako i u Republici Hrvatskoj, za sljedeće kliničke indikacije: primarna prevencija venske tromboembolije (VTE) u odraslih bolesnika koji se podvrgavaju elektivnom kirurškom zahvatu ugradnje umjetnog kuka ili koljena, prevencija i liječenje VTE i prevencija moždanog udara (MU) i sistemske embolije (SE) u bolesnika s nevalvularnom fibrilacijom atrija (engl. *nonvalvular atrial fibrillation*, NVAf) koji imaju jedan ili više čimbenika rizika, te za liječenje VTE, uključujući duboku vensku trombozu (DVT) i plućnu emboliju (PE) i prevenciju ponavljajućih DVT-a i PE-a u odraslih bolesnika (Mannucci, 2011).

Prema mehanizmu djelovanjaovi se lijekovi dijele na dvije skupine:

1. Izravni inhibitori trombina: dabigatran (*Pradaxa*)
2. Izravni inhibitori čimbenika zgrušavanja Xa: rivaroksaban (*Xarelto*), apiksaban (*Eliquis*) i najnoviji edoksaban (*Lixiana*) (Slika 4.)



Slika 4. Mehanizam djelovanja NOAK lijekova.

Dabigatran eteksilat je prolijek koji se hidrolitičkim cijepanjem esterazama u plazmi prevodi u dabigatran, kompetitivni direktni inhibitor trombina. Ne metabolizira se enzimima citokroma P450 ili oksidoreduktazama (Bauer, 2013). Dabigatran se najvećim dijelom izlučuje putem bubrega, a samo oko 20% lijeka se izlučuje hepatalno. Inhibitori p-glikoproteina kao što su amiodaron, verapamil i kinidin povećavaju raspoloživost lijeka (Bauer, 2013).

Rivaroksaban i apiksaban nisu prolijekovi i vežu se za aktivno mjesto čimbenika Xa te imaju visoku oralnu bioraspoloživost (Bauer, 2013). Trećina rivaroksabana se izlučuje nepromijenjena bubregom, dok se 67% prevodi u inaktivni metabolit putem jetrenog enzima CYP 3A4 (Tablica 1). Zbog toga se rivaroksaban ne bi smio propisivati pacijentima koji uzimaju inhibitore ili induktore CYP 3A4 ili onima s umjerenom ili teškom bolesti jetre (Laux, 2007). Apiksaban se također većinom metabolizira putem jetre, djelomično s CYP 3A4. Fekalno se eliminira 75% apiksabana, a bubrežno 25%, te se također ne preporučuje primjena lijeka kod pacijenata koji uzimaju induktore CYP 3A4 i p-glikoproteina i onima s umjerenom ili teškom bolesti jetre (Becker, 2011). Osnovna svojstva NOAK lijekova navedena su u Tablici 1.

Tablica 1. Obilježja NOAK lijekova.

Lijek	Dabigratan	Rivaroksaban	Apiksaban
Mehanizam djelovanja	Direktna inhibicija FIIa (trombina)	Direktna inhibicija FXa	Direktna inhibicija FXa
Primjena	Oralna	Oralna	Oralna
Poluvrijeme života u cirkulaciji	12 – 18 sati	5 – 13 sati	12 – 15 sati
Put eliminacije	80% renalno, 20% fekalno	33% renalno, 67% fekalno	25% renalno, 75% fekalno
Vrijeme vršne koncentracije u plazmi	1 – 2 sata	2 – 4 sata	3 – 4 sata
Značajne interakcije	Inhibitori/induktori P glikoproteina	Inhibitori/induktori P glikoproteina i CYP 3A4	Inhibitori/induktori P glikoproteina i CYP 3A4

Novi oralni antikoagulansi imaju bolja farmakokinetička i farmakodinamička svojstva u odnosu na konvencionalne antikoagulantne lijekove kao što su nefrakcionirani heparin i antagonisti vitamina K, što rezultira predvidivim farmakološkim odgovorom na liječenje i visokom bioraspoloživošću te primjenom fiksnih doza lijeka, uz znatno manje interakcija s hranom i drugim lijekovima (Tablica 2). Osim toga, ovi lijekovi imaju i kratko poluvrijeme života u cirkulaciji (8 – 15 sati) te ostvaruju brži početak kao i prestanak terapijskog djelovanja.

Tablica 2. Prednosti i nedostaci NOAK lijekova u odnosu na antagoniste vitamina K.

PREDNOSTI	NEDOSTACI
brz početak i kraj djelovanja	kontraindicirani kod pacijenata s kroničnom bolešću bubrega i/ili jetre ovisno o lijeku
ne interferiraju značajno s hranom i lijekovima	ograničena dostupnost metoda za praćenje antikoagulantnog učinka
visoka bioraspoloživost ne zahtijevaju učestalo laboratorijsko praćenje primjena u fiksnoj dozi doza lijeka se ne podešava prema rezultatu laboratorijskog testa	nije definiran terapijski raspon (nisu poznate terapijske koncentracije lijeka)

Navedena svojstva NOAK lijekova čine rutinsko praćenje njihova terapijskog učinka najčešće nepotrebnim, što značajno olakšava njihovu primjenu u odnosu na konvencionalne oralne antikoagulantne lijekove kao što su antagonisti vitamina K. Međutim, unatoč navedenim prednostima NOAK lijekova, gotovo da i nema podataka o njihovoj upotrebi u pedijatrijskoj populaciji, u bolesnika s bolestima jetre i bubrega, autoimunim bolestima i infekcijama, kao i o pravilnom doziranju kod pretilih i neuhranjenih pacijenata, pacijenata starije životne dobi i pacijenata s bolestima više organa, pa su potrebna daljnja klinička istraživanja primjene ovih lijekova u navedenim populacijama i kliničkim stanjima. Nadalje, za sada nisu istraženi niti poznati koncentracijski rasponi NOAK lijekova koji bi bili optimalni za sve bolesnike (Fareed, 2012). Također, usporedno s uvođenjem NOAK lijekova u kliničku praksu, rezultati prvih kliničkih iskustava ujedno i pobijaju činjenicu da liječenje NOAK lijekovima u potpunosti isključuje i potrebu za laboratorijskom dijagnostikom. Stoga uvođenje NOAK lijekova u kliničku upotrebu predstavlja i značajan izazov za laboratorije specijalizirane za ispitivanje hemostaze. Naime, primjena NOAK lijekova ima utjecaj na opće koagulacijske pretrage kao što su protrombinsko vrijeme (PV), APTV, trombinsko vrijeme (TV) i fibrinogen. Međutim, značajne razlike u osjetljivosti pojedinih reagensa za navedene opće pretrage na NOAK lijekove, čini ih nestandardiziranim i stoga neprikladnim za procjenu antikoagulantnog učinka ovih lijekova. Stoga je jedina potencijalna primjena općih pretraga hemostaze u bolesnika liječenih NOAK lijekovima samo djelomična i gruba procjena odgovarajuće doziranosti lijekom u hitnim stanjima u vitalno ugroženih bolesnika. U pojedinim kliničkim slučajevima je temeljem rezultata općih koagulacijskih pretraga moguće samo isključiti prisutnost lijeka u cirkulaciji, ali ne i procijeniti učinkovitost liječenja.

Nadalje, iako se doziranje NOAK lijekova ne temelji na rezultatima laboratorijskih pretraga, u određenim situacijama kao što su krvarenje tijekom terapije, bolesti jetre i/ili bubrega i klinička sumnja u učinkovitost liječenja, nužno je procijeniti antikoagulantni učinak ovih lijekova što je moguće isključivo specifičnim pretragama kojima se određuje koncentracija pojedinog lijeka. Ovo dovodi do potrebe za razvojem i implementacijom specifičnih pretraga za kvantitativno određivanje koncentracije NOAK lijekova (Tripodi, 2013). Stoga su istodobno s uvođenjem NOAK lijekova u kliničku praksu, a zbog ograničenja probirnih testova nestandardiziranih za praćenje terapije NOAK lijekovima, istraživanja istodobno bila usmjerena i na razvoj specifičnih koagulacijskih metoda kojima je moguće kvantitativno odrediti koncentraciju pojedinih NOAK lijekova u plazmi bolesnika. Metode za kvantitativno određivanje koncentracije pojedinih NOAK lijekova još uvijek su u razvoju i tek posljednjih godina postaju predmetom brojnih istraživanja vezanih uz primjenu NOAK lijekova, a njihova implementacija u laboratorije specijalizirane za pretrage hemostaze omogućena je posljednjih nekoliko godina s dostupnošću prvih komercijalnih metoda.

1.2.2.3.1. Metode praćenja koncentracija NOAK lijekova

Prve osmišljene metode za kvantitativno određivanje koncentracije dabigatana temelje se na koagulometrijskoj metodi i modifikaciji pretrage određivanja standardnog trombinskog vremena uz razrjeđivanje i kalibraciju kalibracijskim plazmama dabigatana. U stručnoj literaturi ova pretraga se naziva razrijeđeno TV (engl. *dilute thrombin time, dTT*) (Douxflis, 2012). Noviji testovi temelje se na određivanju koncentracije dabigatana kromogenim metodama pri čemu se koncentracija lijeka određuje mjerenjem promjene apsorpcije ili emisije svjetlosti, uz primjenu peptidnih supstrata na koje je vezana određena indikatorska boja koja apsorbira svjetlost u vidljivom elektromagnetskom rasponu valnih duljina (od 380 do 770 nm).

Metode osmišljene za kvantitativno određivanje koncentracije izravnih inhibitora FXa, u koje spadaju lijekovi rivaroksaban i apiksaban, temelje se na određivanju anti Xa aktivnosti fotometrijskom metodom s kromogenim supstratom uz primjenu odgovarajućih kalibracijskih plazmi (kalibracijske plazme za rivaroksaban sadrže lijek rivaroksaban, a kalibracijske plazme za apiksaban sadrže lijek apiksaban) s različitim i poznatim koncentracijama lijeka (Samama, 2010).

1.3. Verifikacija kvantitativnih mjernih postupaka

Postupak verifikacije potrebno je provesti prilikom uvođenja nove metode, novog analizatora ili novog reagensa u svakodnevni rad. Verifikacija mjernog postupka ima za cilj nepristranu i objektivnu procjenu ili utvrđivanje karakteristika metode i/ili analitičkog sustava koja je u postupku uvođenja u rutinski rad kako bismo utvrdili posjeduje li ispitivani mjerni postupak dovoljnu analitičku kvalitetu koja će utvrditi bi li rezultati pretraga bili primjenjivi za kliničku svrhu za koju je metoda namijenjena (Saračević, 2013). Tijekom postupka verifikacije prikupljaju se eksperimentalni podaci koji nakon statističke obrade daju procjenu analitičkih obilježja metode koja se potom uspoređuju s unaprijed postavljenim analitičkim ciljevima ili kriterijima prihvatljivosti. Cilj objektivne usporedbe analitičkih obilježja postignutih verifikacijom i s postavljenim analitičkim ciljevima jest konačna odluka o prikladnosti uvođenja nove metode u rutinski rad laboratorija (Saračević, 2013).

Inicijalna verifikacija kvantitativnih automatiziranih metoda uključuje:

- 1) provjeru preciznosti, koja obuhvaća ponovljivost, unutarlaboratorijsku preciznost i proširenu mjernu nesigurnost,
- 2) usporedbu metode s postojećim sustavom (za sve pretrage koje su ranije bile u primjeni na drugom analitičkom sustavu uz primjenu iste ili druge metode),
- 3) provjeru linearnosti (gdje je to primjenjivo).

Prije provođenja postupka verifikacije za provjeru preciznosti i usporedbe metoda potrebno je odabrati kriterije prihvatljivosti.

Za pretrage za koje je to klinički značajno, potrebno je napraviti i provjeru donje granice detekcije i kvantifikacije te provjeru referentnih intervala.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Metode kvantitativnog određivanja koncentracije NOAK lijekova posljednjih nekoliko godina tek postaju predmetom uvođenja u specijalizirane laboratorije za pretrage hemostaze i za sada još uvijek nisu sastavni dio laboratorijske dijagnostike, osim u istraživačke svrhe. Sukladno drugim kvantitativnim metodama, preduvjet njihova uvođenja je inicijalna verifikacija kojom se ispituju analitička obilježja metode prije njezina uvođenja u svakodnevni rad. Cilj ovog rada bio je ispitati ključna analitička obilježja kvantitativnih metoda određivanja koncentracije NOAK lijekova na dva različita analitička sustava kako bismo procijenili jesu li ispitivane metode prikladne za uvođenje u svakodnevni rad, odnosno za određivanje koncentracije pojedinih NOAK lijekova u uzorcima bolesnika.

Cilj rada: verifikacija metoda za kvantitativno određivanje dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana na dva različita analitička sustava (BCSXP, Siemens, Njemačka i Compact MAX, Stago, Francuska).

Specifični ciljevi:

1. Odrediti ponovljivost metoda za kvantitativno određivanje NOAK lijekova.
2. Odrediti unutarlaboratorijsku preciznost metoda za kvantitativno određivanje NOAK lijekova.
3. Odrediti proširenu mjernu nesigurnost metoda za kvantitativno određivanje NOAK lijekova.
4. Odrediti linearnost metoda za kvantitativno određivanje NOAK lijekova.
5. Na temelju rezultata verifikacijskog postupka utvrditi jesu li ispitivane metode prikladne za uvođenje u svakodnevni rad laboratorija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Opis postupka verifikacije kvantitativnih automatiziranih metoda za određivanje koncentracije NOAK lijekova

Postupak verifikacije uključio je provjeru preciznosti, (koja obuhvaća ponovljivost, unutarlaboratorijsku preciznost i proširenu mjernu nesigurnost) te provjeru linearnosti metode (Saračević A, 2013).

Postupci usporedbe metode s postojećim sustavom i provjere referentnih intervala nisu bili dio provedene verifikacije NOAK lijekova, te će u ovom radu samo biti opisan postupak kojim se isti trebaju provesti.

3.1.1. Provjera preciznosti

Preciznost metode provjerava se korištenjem komercijalnih kontrolnih uzoraka i/ili uzoraka bolesnika. Potrebno je odabrati najmanje dvije koncentracijske razine komercijalnih kontrola uzoraka tako da pokrivaju klinički značajno koncentracijsko područje. Svaka se koncentracijska razina određuje tijekom 5 uzastopnih dana u triplikatu.

Ponovljivost se izračunava prema slijedećem slijedu formula:

$$\text{Aritmetička sredina: } \bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3}{3}$$

$$\text{Standardno odstupanje (n=3 mjerenja): } Sd = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\text{Standardno odstupanje za 5 dana (D=5): } Sr = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}}$$

$$\text{Koeficijent varijacije: } CVp = \frac{Sr}{\bar{x}} \times 100$$

Dobiveni koeficijent varijacije predstavlja ponovljivost metode i uspoređuje se s odabranim kriterijem prihvatljivosti. Ukoliko je izmjereni koeficijent varijacije manji ili jednak odabranom, zaključuje se da metoda ima zadovoljavajuću ponovljivost, a ukoliko je veći, zaključuje se da metoda nema zadovoljavajuću ponovljivost.

3.1.2. Unutarlaboratorijska preciznost

Unutarlaboratorijska preciznost se izračunava na slijedeći način:

Srednja vrijednost: $\bar{x} = \frac{x_1+x_2+x_3+x_4+x_5}{D}$ gdje je D=5 dana

Validacijska međupreciznost kod ponovljenih mjerenja: $Sb = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D (x_d - \bar{x})^2}{D-1}}$ (D=5 dana)

Unutarlaboratorijsko standardno odstupanje: $Sl = \sqrt{\frac{n-1}{n} \times Sr^2 \times Sb^2}$

gdje je n=3 mjerenja (triplikat)

Koeficijent varijacije: $CVu = \frac{Sl}{\bar{x}} \times 100$

Dobiveni CVu predstavlja unutarlaboratorijsku preciznost metode i uspoređuje se s odabranim kriterijem prihvatljivosti. Ako je manji ili jednak odabranom kriteriju, unutarlaboratorijska preciznost metode je zadovoljavajuća, ako je veći, unutarlaboratorijska preciznost metode nije zadovoljavajuća.

3.1.3. Proširena mjerna nesigurnost

Proširena mjerna nesigurnost (U) računa se prema formuli: $U = 2 \times CVu$ te se dobivena proširena mjerna nesigurnost uspoređi s odabranim kriterijima prihvatljivosti. Ako je U manja od kriterija prihvatljivosti, metoda ima zadovoljavajuću proširenu mjernu nesigurnost. Ako je U veća od kriterija prihvatljivosti, metoda nema zadovoljavajuću proširenu mjernu nesigurnost.

3.1.4. Provjera linearnosti metode

Provjeru linearnosti potrebno je raditi za one metode čija je kalibracijska krivulja linearna. Provjeru linearnosti provodimo korištenjem 2 uzorka: uzorak s najvišom dostupnom koncentracijom analita koja je manja od gornje granice mjernog raspona (H) i uzorak s najnižom dostupnom koncentracijom analita koja je veća od donje granice mjernog raspona (L). Uzorci H i L se pomiješaju u sljedećim omjerima: H:L = 3:1, H:L = 1:1 i H:L = 1:3. Sva mjerenja izvode se u duplikatu te se izračunaju srednje vrijednosti. Iz njih se izračunaju teorijske, odnosno očekivane koncentracije uzoraka prema formulama: H:L = 3:1 = $\frac{3H+L}{4}$, H:L = 1:1 = $\frac{H+L}{2}$, H:L = 1:3 = $\frac{H+3L}{4}$, te se za svako od navedenih razrjeđenja izračuna postotak odstupanja između očekivane i izmjerene koncentracije prema: $odstupanje = \frac{izmjerena - očekivana}{očekivana} \times 100\%$. Ukoliko su odstupanja za sva tri definirana omjera L i H uzoraka manja od kriterija prihvatljivosti za usporedbu metoda, zaključuje se da je metoda linearna, a ukoliko je neko od navedenih odstupanja veće, zaključuje se da metoda

nije linearna. Za one metode za koje se linearnost ne ispituje, rezultati se izdaju u skladu s dilucijskim protokolima izdanim od strane proizvođača. Ukoliko provjera linearnosti nije dala zadovoljavajuće rezultate, ponavlja se na užem koncentracijskom području (smanji se gornja granica).

Osim u ovom radu provedenih postupaka verifikacije, dodatni postupci verifikacije uključuju usporedbu metode s postojećim sustavom (ukoliko je pretraga ranije bila u uporabi na drugom analitičkom sustavu ili drugom metodom), provjeru donje granice detekcije i kvantifikacije te provjeru referentnog intervala gdje je to potrebno i primjenjivo. U ovom slučaju, u nastavku opisa metoda i postupaka verifikacije biti će opisani postupci za njihovu provedbu, iako eksperimentalno isti nisu provedeni.

3.1.5. Usporedba metode s postojećim sustavom

Usporedba metode s postojećim sustavom uključuje:

- 1) izračun srednjeg odstupanja
- 2) Bland – Altmanovu analizu
- 3) Passing – Bablokovu regresijsku analizu.

Usporedba se provodi usporednim određivanjem minimalno 20, a optimalno 40 uzoraka na oba analitička sustava. Prilikom prikupljanja uzoraka potrebno je paziti da se pokrije čitavo mjerno područje analita. Ukoliko se mjerno područje uspoređivanih metoda razlikuje, uzorci moraju biti prikupljeni u onom području koje je zajedničko objema metodama.

3.1.5.1. Izračun srednjeg odstupanja

Srednje odstupanje između metoda (bias) računa se prema formuli:

$$BIAS = \frac{\text{metoda 2} - \text{metoda 1}}{\text{metoda 1}} \times 100\%$$

gdje je metoda 1 = određivanje analita na 1. analitičkom sustavu (dotada korištena ili „stara“ metoda) i

metoda 2= određivanje analita na 2. analitičkom sustavu (metoda koja se uvodi ili „nova“ metoda).

Odstupanje se izračuna za svaki par rezultata, koristeći apsolutnu vrijednost da bi se izbjeglo poništavanje pozitivnih i negativnih rezultata. Srednje odstupanje je aritmetička sredina apsolutnih vrijednosti pojedinih odstupanja.

3.1.5.2. Bland – Altmanova analiza

Bland – Altmanova analiza je slikovna statistička metoda za usporedbu dviju analitičkih metoda. Nakon izrade grafičkog prikaza procjenjuje se ukazuje li Bland – Altmanova analiza na postojanje proporcionalnog ili konstantnog odstupanja, te se provjeri u kojem su koncentracijskom rasponu odstupanja najveća.

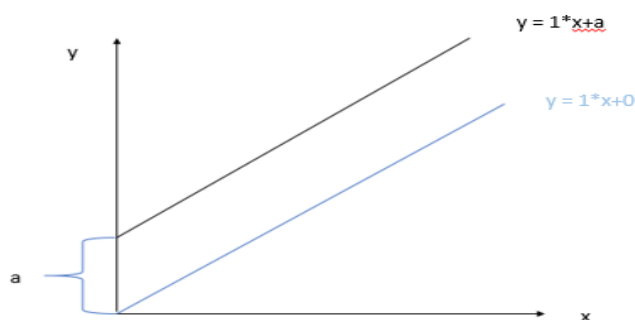
3.1.5.3. Passing – Bablokova regresijska analiza

Passing – Bablokova regresijska analiza je kvantitativna statistička metoda za usporedbu dviju metoda. Omogućuje utvrđivanje statistički značajnog konstantnog ili proporcionalnog odstupanja (Slika 5. i 6). Rezultat Passing – Bablokove statističke analize je jednadžba pravca u obliku:

$$y = a(95\%CI) + b(95\%CI)x$$

gdje je a odsječak na osi y , b koeficijent smjera pravca, a $95\%CI$ 95 – postotni interval pouzdanosti.

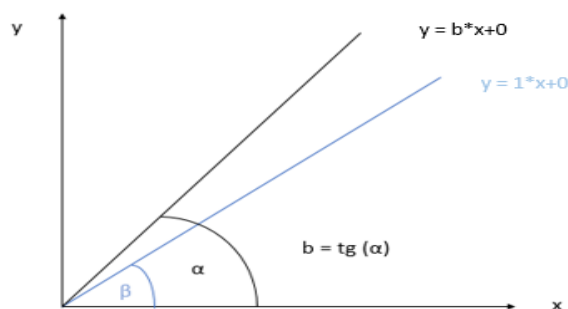
Konstantno odstupanje je matematički otklon između metoda i odgovara odsječku na y osi. Ukoliko $95\% CI$ odsječka na osi y ne obuhvaća nulu, postoji statistički značajno odstupanje između metoda. U tom slučaju potrebno je odstupanje usporediti s kriterijima prihvatljivosti te, ukoliko je ono veće od kriterija prihvatljivosti, zaključuje se da je razlika između metoda značajna, a ukoliko je manje, zaključuje se da razlika nije značajna.



Slika 5. Primjer rezultata Passing – Bablokove regresijske analize koji ukazuje na konstantno odstupanje

Proporcionalno odstupanje je matematički otklon koji odgovara koeficijentu smjera pravca, to jest, tangensu kuta s osi x . Ukoliko $95\% CI$ odsječka ne obuhvaća 1, postoji statistički značajno proporcionalno odstupanje te ga je potrebno usporediti s kriterijima prihvatljivosti.

Ukoliko je odstupanje veće od kriterija prihvatljivosti, zaključuje se da je razlika između metoda značajna, a ukoliko je manje, zaključuje se da razlika nije značajna.



Slika 6. Primjer rezultata Passing – Bablokove regresijske analize koji ukazuje na proporcionalno odstupanje

3.1.6. Provjera donje granice detekcije i donje granice kvantifikacije

Donju granicu detekcije i donju granicu kvantifikacije potrebno je provjeriti za one metode za koje je to klinički značajno, najčešće za one analite koji nisu prisutni u uzorcima zdravih ljudi. Donja granica detekcije (eng. *limit of detection, LOD*) je najmanja koncentracija analita koja se može pouzdano detektirati. Donja granica kvantifikacije je najmanja količina analita koja se može pouzdano kvantificirati. Za provjeru donje granice detekcije koja je deklarirana, mora se poznavati granica praznine (engl. *limit of blank, LOB*). LOB se provjerava tako da se minimalno 20, a poželjno 40 puta odredi koncentracija analita u uzorku koji taj analit ne sadrži. Ukoliko više od 3 određivanja ne prelazi deklarirani LOB, može ga se koristiti za provjeru donje granice detekcije. Za provjeru deklarirane LOD, odaberu se uzorci s najnižom koncentracijom analita koja je viša od LOB te se takav uzorak odredi minimalno 20, a poželjno 40 puta. 95% mjerenja mora biti ispod deklarirane granice. Ako je manje od 95% mjerenja ispod deklarirane granice, postupak se ponavlja s neznatno većom koncentracijom uzorka. Donja granica kvantifikacije provjerava se tako da se odabere uzorak niske koncentracijske razine te se izvrši minimalno 25 ponavljanja mjerenja. Za svako mjerenje se izračuna odstupanje od početne koncentracije. Ako manje od 5% mjerenja ima odstupanje veće od odabranog kriterija za pogrešku, prihvaća se deklarirana granica kvantifikacije. Ako više od 5% kriterija ima odstupanje veće od odabranog kriterija za pogrešku, mjerenje se ponavlja s korištenjem uzorka s neznatno većom koncentracijom do dobivanja zadovoljavajućih rezultata.

3.1.7. Provjera referentnih intervala

Iako za potrebe ovog rada nije moguće primijeniti postupak provjere referentnih intervala budući da se radi o određivanju koncentracije lijekova u krvi, u daljnjem tekstu opisan je preporučeni postupak provjere referentnih intervala.

Potrebno je odabrati 20 reprezentativnih zdravih ispitanika, te se, slijedeći predanalitičke i analitičke zahtjeve metode, odredi koncentracija analita. Zatim se provjeri postoje li rezultati s ekstremnim odstupanjima: vrijednosti manje od vrijednosti prvog kvartila ($Q1 - 3X$ vrijednost interkvartilnog raspona ($Q3 - Q1$)) ili vrijednosti veće od vrijednosti trećeg kvartila ($Q3 + 3X$ vrijednost interkvartilnog raspona ($Q3 - Q1$)). Ukoliko takve vrijednosti postoje, isključuju se iz skupa ispitanika i uvode se novi ispitanici. Ukoliko je barem 18 od 20 vrijednosti unutar provjeravanog referentnog intervala, on se prihvaća. Ukoliko je 3 ili više vrijednosti izvan provjeravanog referentnog intervala, odabere se nova skupina od 20 ispitanika i ponovi postupak na novom skupu od 20 uzoraka. Ukoliko je barem 18 od 20 vrijednosti unutar provjeravanog referentnog intervala, on se prihvaća. Ukoliko je 3 ili više vrijednosti izvan provjeravanog referentnog intervala, zaključuje se da se ne mogu prihvatiti predloženi referentni intervali. U tom slučaju odabire se novi referentni interval (prema navodima proizvođača ili prema relevantnoj literaturi) te se za njega napravi provjera. Ukoliko i u tom slučaju nije potvrđen referentni interval, potrebno je odrediti vlastite referentne intervale.

3.2. Metode određivanja koncentracije NOAK lijekova

Postupak verifikacije metoda određivanja koncentracija sva tri NOAK lijeka (dabigratan, rivaroksaban, apiksaban) učinjen je uz primjenu odgovarajućih komercijalnih metoda za dva različita analitička sustava: :

1. Behring Coagulation System (BCSXP) Siemens, Njemačka (Slika 7).
2. Compact MAX, Stago, Francuska (Slika 8).

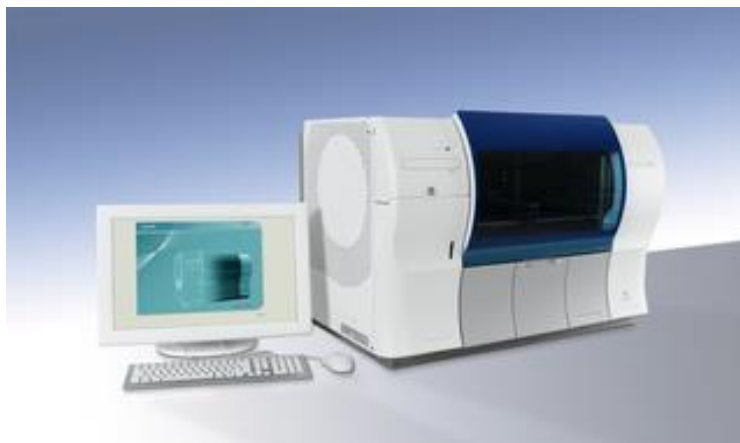
3.2.1. Behring Coagulation System XP (BCSXP)



Slika 7. Automatizirani analitički sustav BCSXP, Siemens, Njemačka

Analizator BCSXP je potpuno automatizirani analitički sustav za izvođenje svih automatiziranih pretraga hemostaze koji radi na načelu optičkog mjerenja koagulometrijskih, kromogenih i imunokemijskih metoda detekcije reakcije. Kao izvor svjetla analizator rabi ksenonsku lampu koja stvara monokromatsku bijelu zraku svjetlosti kojom se mjeri apsorbanacija reakcijske smjese na 340, 405 ili 570 nm.

3.2.2. Compact MAX, Stago, Francuska



Slika 8. Automatizirani analitički sustav Compact MAX, Stago, Francuska

STA Compact MAX je potpuno automatizirani analitički sustav za izvođenje svih automatiziranih pretraga hemostaze, koji koristi načelo elektromehaničkog i optičkog mjerenja koagulometrijskih, kromogenih i imunokemijskih metoda detekcije reakcije.

Elektromehanička metoda temelji se na mjerenju razlika u amplitudi oscilacija metalne kuglice tijekom koagulometrijske reakcije. Optička metoda se temelji na apsorbanciji monokromatskog svjetla određene valne duljine koje prolazi kroz reakcijsku kivetu.

3.2.3. Metode određivanja koncentracije dabigatrana

3.2.3.1. Innovance DTI test

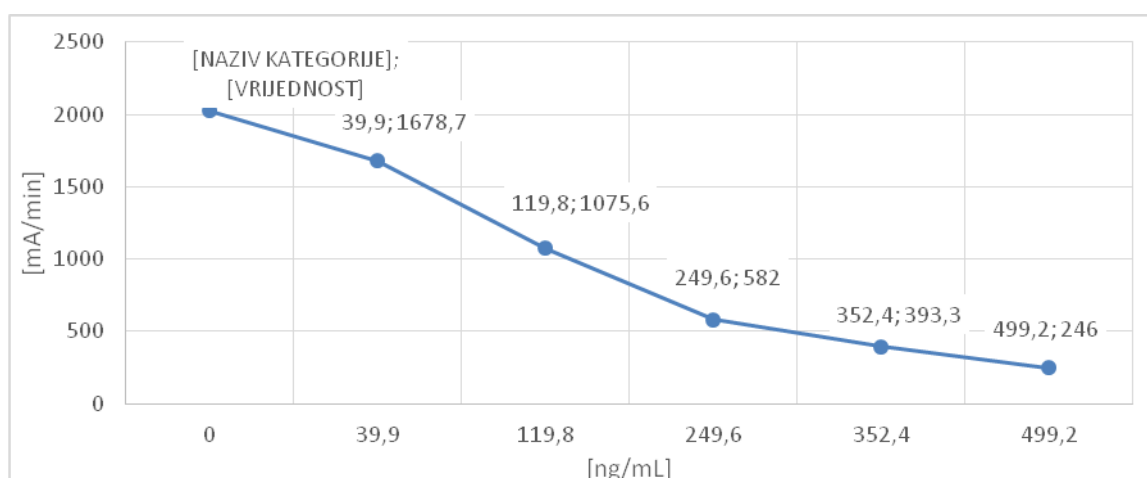
Innovance DTI test je kromogena metoda za kvantitativno određivanje koncentracije dabigatrana u humanoj citratnoj plazmi na analitičkom sustavu BCSXP. Mjerni raspon metode iznosi od 20 do 500 ng/ml. Granica detekcije iznosi 14,8 ng/ml, a granica kvantifikacije 20 ng/ml za navedeni analitički sustav.

Načelo metode: Trombin se kao reagens dodaje plazmi ispitanika u suvišku. U prisutstvu dabigatrana u plazmi dio trombina se inaktivira. Višak neinhibiranog trombina (ostatni trombin) razgrađuje, odnosno, cijepa specifičan kromogeni supstrat, uzrokujući promjenu obojenja što se određuje spektrofotometrijski porastom apsorbancije na 405 nm. Obojenje je obrnuto proporcionalno aktivnosti dabigatrana u uzorku plazme, što znači da niže koncentracije dabigatrana rezultiraju većom apsorbancijom, a veća koncentracija dabigatrana rezultirat će nižom apsorbancijom. Koncentracija dabigatrana u uzorku plazme ispitanika određuje se na temelju kalibracijske krivulje (Slika 9).

Gore opisanu reakciju određivanja dabigatrana opisuje shema:

Dabigatran + trombin (suvišak) → [dabigatran - trombin] + trombin (ostatni)

kromogeni supstrat trombina + trombin (ostatni) → tripeptid + boja (405 nm)



Slika 9. Kalibracijska krivulja za dabigatran na analitičkom sustavu BCSXP.

Pojedine sastavnice reagensa te kalibratori i kontrolni uzorci za određivanje koncentracije dabigatrana Innovance DTI testom prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Sastavnice za određivanje koncentracije dabigatrana Innovance DTI testom.

Naziv reagens/kalibratora/ kontrolnih uzoraka	Sastav	Priprema
InnovanceDTI Reagens	Liofilizirani goveđi trombin	Otapanjem u 5 mL innovance DTI diluenta
Innovance DTI Supstrat	Tos–Gly–Pro–Arg–ANBS– Izopropilamid X AcOH ₂	Tekući reagens, spreman za upotrebu
Innovance DTI Diluent	Tris pufer (hidroksimetil) – aminometan; pH 8,2	Služi za otapanje DTI reagensa, tekuć, spreman za upotrebu
Niska kontrola (L)	koncentracija dabigatrana 67 (54 – 80) ng/mL	otapanjem u 1 mL destilirane vode
Visoka kontrola (H)	koncentracija dabigatrana 230 (184 – 276) ng/mL	otapanjem u 1 mL destilirane vode
Kalibracijske plazme (2)	koncentracija dabigatrana 0: 0 ng/mL 1: 599 ng/mL	otapanjem u 1 mL destilirane vode

Sastavnice Innovance DTI reagensa stabilne su nakon pripreme 8 tjedana na temperaturi 2 – 8° C.

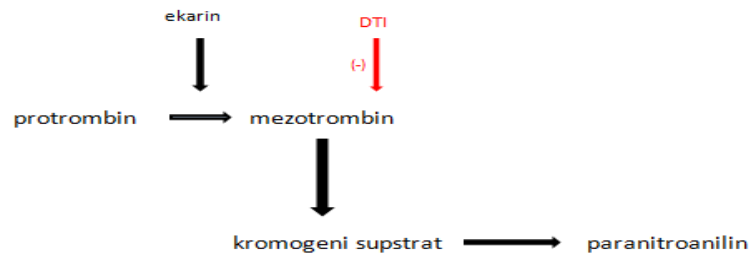
Interferencije: u reakciji mjerenja ne interferiraju terapijske doze nefrakcioniranog heparina (do 8 IU/mL) ili niskomolekularnog heparina (do 15 IU/mL). Interferencije nema kod koncentracija triglicerida do 7 g/L, hemoglobina do 4 g/L, nekonjugiranog bilirubina do 615 µmol/L, konjugiranog bilirubina do 684 µmol/L.

3.2.3.2. ECA II test

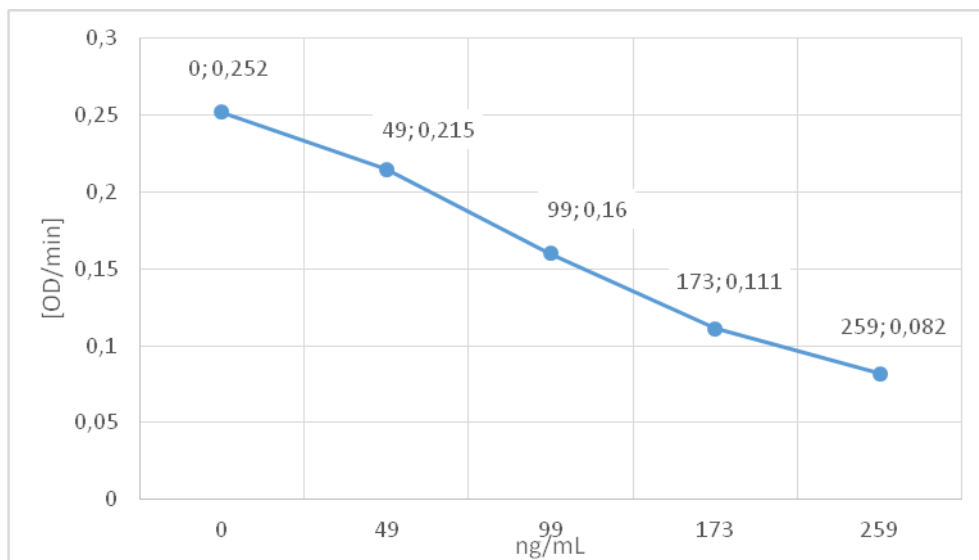
ECA II test je kromogena metoda za kvantitativno određivanje koncentracije dabigatrana u humanoj citratnoj plazmi na analitičkom sustavu Compact MAX Stago. Mjerni raspon metode iznosi od 15 do 460 ng/ml. Granica detekcije za navedeni analitički sustav iznosi 15 ng/ml.

Načelo metode: ECA II metoda se temelji na razgradnji protrombina pomoću ekarina, zmijskog venoma metaloproteinaze dobivene iz zmijske *Echis carinatus*. Produkti razgradnje

(uglavnom mezotrombin) zatim enzimatski cijepaju kromogeni supstrat, što rezultira oslobađanjem paranitroanilina (pNA). Nastanak pNA u reakciji ovisi o koncentraciji dabigatrana u uzorku. Količina stvorenog pNA koja se mjeri spektrofotometrijski na 405 nm je obrnuto proporcionalna koncentraciji dabigatrana u plazmi. Koncentracija dabigatrana u uzorku plazme ispitanika određuje se na temelju kalibracijske krivulje (Slika 11.)



Slika 10. Shematski prikaz ECA II metode.



Slika 11. Kalibracijska krivulja za dabigatran na analitičkom sustavu Compact MAX.

Pojedine sastavnice reagensa te kalibratori i kontrolni uzorci za određivanje koncentracije dabigatrana ECA II testom prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Sastavnice za određivanje koncentracije dabigatrana ECA II testom

Naziv reagens/kalibratora/ kontrolnih uzoraka	Sastav	Priprema
STA reagens 1	liofilizirani humani protrombin	otapanjem u 3,5 mL destilirane vode
STA - reagens 2	kromogeni supstrat HSY-83	tekući, spreman za uporabu
STA - reagens 3	liofilizirani ekarin	otapanjem u 2 mL destilirane vode
STA– dabigatran kalibratori (5)	koncentracije dabigatrana: 0: 0 ng/mL 1: 49 ng/mL 2: 99 ng/mL 3: 173 ng/mL 4: 259 ng/mL	otapanjem u 1 mL destilirane vode
STA– dabigatran kontrole 1 (niska) i 2 (visoka)	koncentracije dabigatrana 1: 39 – 68 ng/mL 2: 165 – 231 ng/mL	otapanjem u 1 mL destilirane vode

Sastavnice reagensa stabilne su nakon pripreme 28 dana na temperaturi 2 – 8°C.

Interferencije :moguća je interferencija ostalih antikoagulantnih lijekova s izravnom anti-II aktivnošću (npr. argatroban, bivalirudin). U metodi ne interferiraju koncentracije hemoglobina do 2 g/L, konjugiranog bilirubina do 496 µmol/L, nekonjugiranog bilirubina do 496 µmol/L i triglicerida do 5 g/L.

3.2.4. Metode određivanja koncentracija rivaroksabana i apiksabana

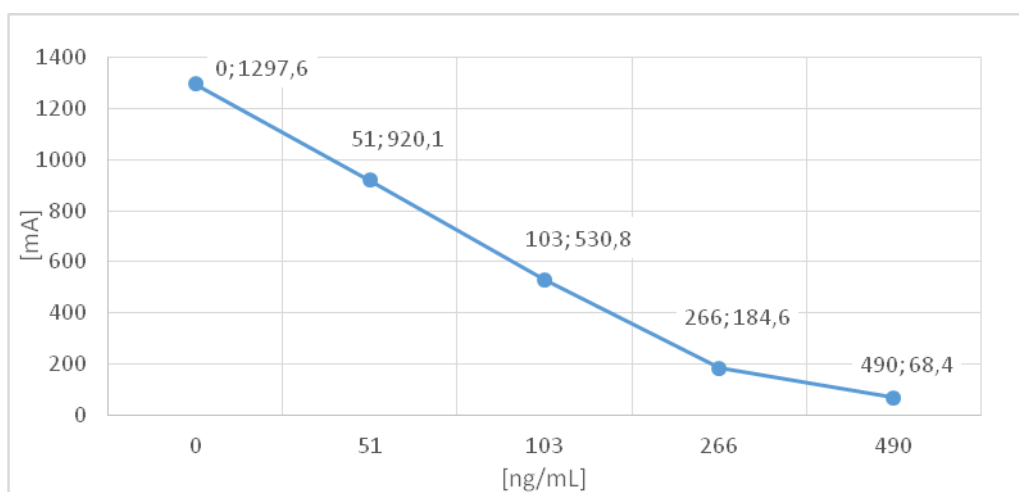
3.2.4.1. Innovance anti-Xa test

Test Innovance anti-Xa je kromogeni test za kvantitativno određivanje koncentracija rivaroksabana i apiksabana u humanoj citratnoj plazmi na analitičkom sustavu BCSXP.

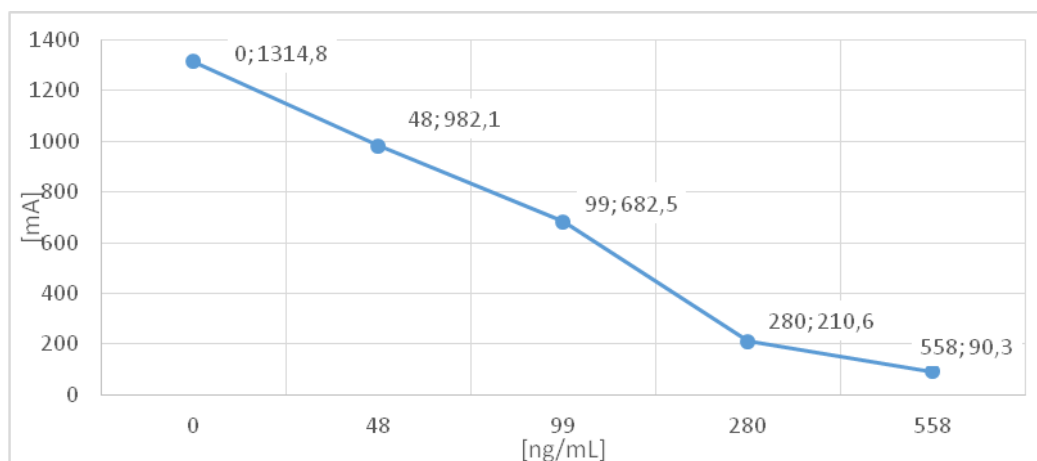
Načelo metode temelji se na kromogenoj metodi pri čemu se uzorku plazme ispitanika dodaje reagens koji sadrži poznatu količinu čimbenika zgrušavanja Xa (FXa). Ukoliko je u plazmi prisutan lijek čija se koncentracija određuje (rivaroksaban ili apiksaban), taj lijek inhibira aktivnost FXa. Količina neinhibiranog (ostatnog) FXa određuje se dodatkom kromogenog

substrata, a obrnuto je razmjerna koncentraciji lijeka (rivaroksabana ili apiksabana) u uzorku. Ostatni FXa cijepa kromogeni supstrat pri čemu kao produkt nastaje pNA. Stvaranje pNA koje se određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na 405 nm, obrnuto je razmjerno koncentraciji lijeka rivaroksabana, odnosno apiksabana u plazmi ispitanika. Koncentracije rivaroksabana i apiksabana u uzorku plazme ispitanika određuju se na temelju kalibracijskih krivulja za pojedini lijek (Slika 12 a) i b): a) rivaroksaban i b) apiksaban).

a)



b)



Slika 12. a) i b): Kalibracijske krivulje za rivaroksaban (a) i apiksaban (b) na analitičkom sustavu BCSXP.

Pojedine sastavnice reagensa te kalibratori i kontrolni uzorci za određivanje koncentracije rivaroksabana i apiksabana Innovance anti Xa testom prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Sastavnice za određivanje koncentracije rivaroksabana i apiksabana Innovance anti Xa testom na analitičkom sustavu BCSXP.

Naziv reagensa/kalibratora/ kontrolnih uzoraka	Sastav	Priprema
Innovance anti Xa reagens	goveđi FXa (0,7 IU/mL)	otapanjem u 1 mL destilirane vode
Innovance anti Xa kromogeni supstrat	Suc – Ile – Glu (piperidin – 1 – yl) – Gly – Arg – pNA	otapanjem u 1 mL destilirane vode
Kontrolne plazme za rivaroksaban(4)	konc. rivaroksabana 24 (14 – 34) ng/mL 84 (67 – 101) ng/mL 104 (73 – 135) ng/mL 316 (265 – 367) ng/mL	otapanjem u 1 mL destilirane vode
Kalibracijske plazme za rivaroksaban (5)	konc. rivaroksabana 1: 0 ng/mL 2: 50 ng/mL 3: 109 ng/mL 4: 266 ng/mL 5: 490 ng/mL	otapanjem u 1 mL destilirane vode
Kontrolne plazme za apiksaban (4)	konc. rivaroksabana 26 (16 -36) ng/mL 76 (61 – 91) ng/mL 191 (162 – 220) ng/mL 385 (327 – 443) ng/mL	otapanjem u 1 mL destilirane vode
Kalibracijske plazme za apiksaban (5)	konc. apiksabana 1: 0 ng/mL 2: 48 ng/mL 3: 99 ng/mL 4: 280 ng/mL 5: 558 ng/mL	otapanjem u 1 mL destilirane vode

Stabilnost priređenih reagensa iznosi 8 tjedana na 2 – 8°C.

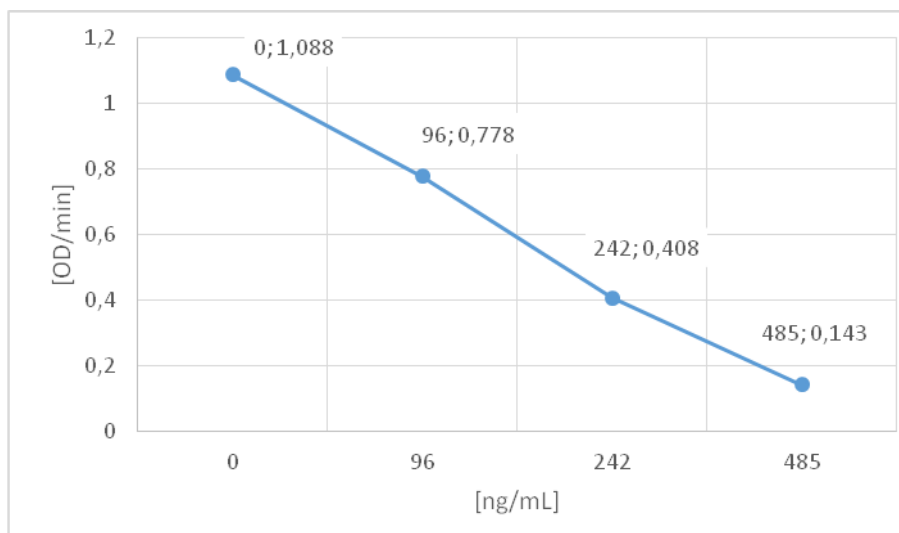
Interferencije: u metodi ne interferiraju koncentracije nekonjugiranog bilirubina do 1026 µmol/L, konjugiranog bilirubina do 684 µmol/L, hemoglobina do 5g/L i triglicerida do 8 g/L.

3.2.4.2. Liquid anti Xa test

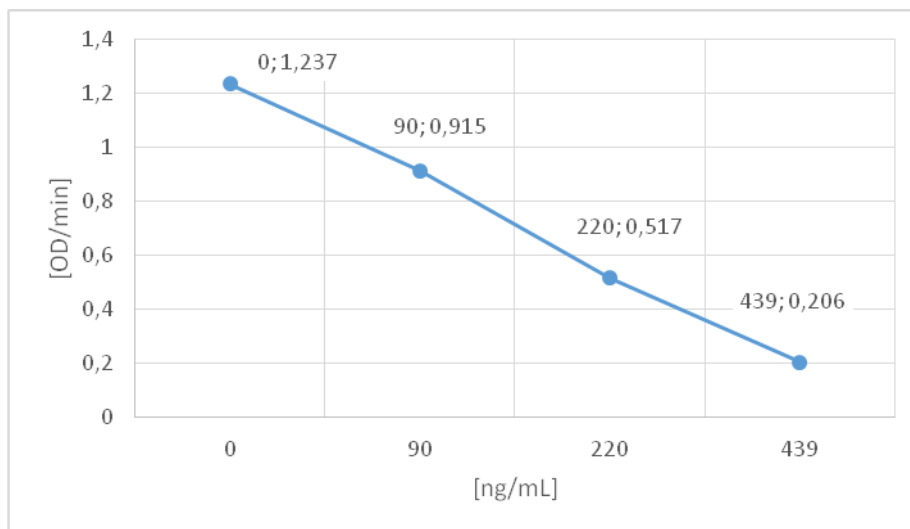
Komercijalni test Liquid anti Xa je kromogena metoda za kvantitativno određivanje koncentracija rivaroksabana i apiksabana u humanoj citratnoj plazmi na analitičkom sustavu Compact MAX Stago. Granica detekcije za navedeni analitički sustav iznosi 25 ng/mL za rivaroksaban i 23 ng/mL za apiksaban. Linearnost metode iznosi do 500 ng/mL za oba lijeka.

Načelo metode: Normalna funkcija čimbenika Xa je cijepanje njegovog prirodnog supstrata, protrombina, i stvaranje trombina, ključnog enzima odgovornog za nastajanje fibrinskog ugruška. U prisutstvu lijeka rivaroksabana ili apiksabana odvija se kompeticija između ovog mehanizma i inhibitorškog učinka rivaroksabana i apiksabana na aktivirani čimbenik zgrušavanja X (FXa). Reagens je dvokomponentni te se sastoji od FXa i kromogenog supstrata koji sadrži pNA. Nakon miješanja obje komponente s ispitivanom plazmom, istovremeno dolazi do dvije reakcije: hidrolize supstrata faktorom Xa te inhibicije FXa rivaroksabanom ili apiksabanom. Količina oslobođenog pNA je obrnutno proporcionalna koncentraciji lijeka rivaroksabana, odnosno apiksabana u plazmi. Koncentracije rivaroksabana i apiksabana u uzorku plazme ispitanika određuje se na temelju kalibracijskih krivulja za pojedini lijek (Slika 13. a) i b))

a)



b)



Slika 13. a) i b): Kalibracijske krivulje za rivaroksaban (a) i apiksaban (b) na analitičkom sustavu Compact MAX.

Pojedine sastavnice reagensa te kalibrator i kontrolni uzorci za određivanje koncentracije rivaroksabana i apiksabana Liquid anti Xa testom prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Sastavnice za određivanje koncentracije rivaroksabana i apiksabana Liquid anti Xa testom na analitičkom sustavu Compact MAX Stago.

Naziv reagensa/kalibratora/ kontrolnih uzoraka	Sastav	Priprema
Liquid anti Xa Reagens 1	kromogeni supstrat MAPA-Gly-Arg-pNA	tekući, spreman za uporabu
Liquid anti Xa Reagens 2	goveđi faktor Xa (1 IU)	tekući, spreman za uporabu
STA – kalibracijske plazme za rivaroksaban (4)	konc. kalibratora 0: 0 ng/mL 1: 96 ng/mL 2: 242 ng/mL 3: 485 ng/mL	otapanjem u 1 mL destilirane vode
STA –kalibracijske plazme za apiksaban (4)	konc. kalibratora 0: 0 ng/mL 1: 96 ng/mL 2: 242 ng/mL 3: 485 ng/mL	otapanjem u 1 mL destilirane vode
STA – kontrolne plazme za rivaroksaban (2)	konc. rivaroksabana 1: 59- 97 ng/mL 2: 247 – 341 ng/mL	otapanjem u 1 mL destilirane vode
STA – kontrolne plazme za apiksaban (2)	konc. apiksabana 1: 39 – 68 ng/mL 2: 165 – 231 ng/mL	otapanjem u 1 mL destilirane vode

Nakon otvaranja, sastavnice reagensa stabilne su 3 mjeseca na 2-8°C.

Interferencije: u metodi ne interferiraju koncentracije hemoglobina do 2 g/L, nekonjugiranog i konjugiranog bilirubina do 342 µmol/L i triglicerida do 5 g/L (za apiksaban) odnosno do 10 g/L (za rivaroksaban).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati ispitivanja metoda za određivanje koncentracije dabigatrana

4.1.1. Rezultati ispitivanja metode za određivanje koncentracije dabigatrana Innovance DTI testom na analitičkom sustavu BCSXP

4.1.1.1. Ponovljivost metode

Rezultati mjerenja ponovljivosti u uzorcima plazme s niskom i visokom koncentracijom dabigatrana prikazani su u tablicama 7. i 8.

Tablica 7. Ponovljivost metode Innovance DTI u komercijalnom kontrolnom uzorku plazme s niskim vrijednostima dabigatrana.

Datum	19. 9. 2017.	20. 9. 2017.	21. 9. 2017.	22. 9. 2017	23. 9. 2017.
Mjerenje 1 (ng/mL)	83,0	85,0	91,0	81,0	72,0
Mjerenje 2 (ng/mL)	82,0	83,0	91,0	83,0	74,0
Mjerenje 3 (ng/mL)	83,0	89,0	84,0	81,0	77,0
Srednja vrijednost (ng/mL)	82,7	85,7	88,7	81,7	74,3
Standardno odstupanje (ng/mL)	0,579	3,055	4,042	1,155	2,527

$$Sr = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}} = 2,5952$$

Tablica 8. Ponovljivost metode Innovance DTI u komercijalnom kontrolnom uzorku plazme s visokim vrijednostima dabigatrana.

Datum	19. 9. 2017.	20. 9. 2017.	21. 9. 2017.	22. 9. 2017	23. 9. 2017.
Mjerenje 1 (ng/mL)	244,0	245,0	258,0	257,0	244,0
Mjerenje 2 (ng/mL)	241,0	244,0	258,0	255,0	243,0
Mjerenje 3 (ng/mL)	247,0	251,0	249,0	256,0	247,0
Srednja vrijednost (ng/mL)	244,0	246,7	255,0	256,0	244,7
Standardno odstupanje (ng/mL)	3,000	3,786	5,196	1,000	2,082

Srednja vrijednost svih mjerenja = 249,3 ng/mL

$$S_r = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}} = 3,3368$$

Izračunata ponovljivost metode, prema $CVp = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$, za nisku kontrolu iznosila je 3,1% te je manja od deklariranog koeficijenta varijacije prema proizvođaču koji iznosi 4%.

Izračunata ponovljivost, prema $CVp = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$, za visoku kontrolu iznosila je 1,3% te je manja od deklariranog koeficijenta varijacije prema proizvođaču, koji iznosi 1,42%.

4.1.1.2. Unutarlaboratorijska preciznost metode

Izračunata unutarlaboratorijska preciznost na način kako je opisano u odjeljku 3.1.2., iznosila je za nisku kontrolu 6,9%, te je manja od deklariranog koeficijenta varijacije prema proizvođaču koji iznosi 10,0%.

Izračunata unutarlaboratorijska preciznost za visoku kontrolu iznosila je 2,6%, te je manja od deklariranog koeficijenta varijacije prema proizvođaču, koji iznosi 5,0%.

4.1.1.3. Proširena mjerna nesigurnost

Proširena mjerna nesigurnost za nisku kontrolu, izračunata prema $U = 2xCV_u$, iznosila je 14%, te je manja od kriterija prihvatljivosti prema vanjskoj kontroli kvalitete (VKK) preuzetog od organizatora VKK ECAT-a (engl. *External Quality Control of Diagnostic Assays and Tests*) koji iznosi 20,0%.

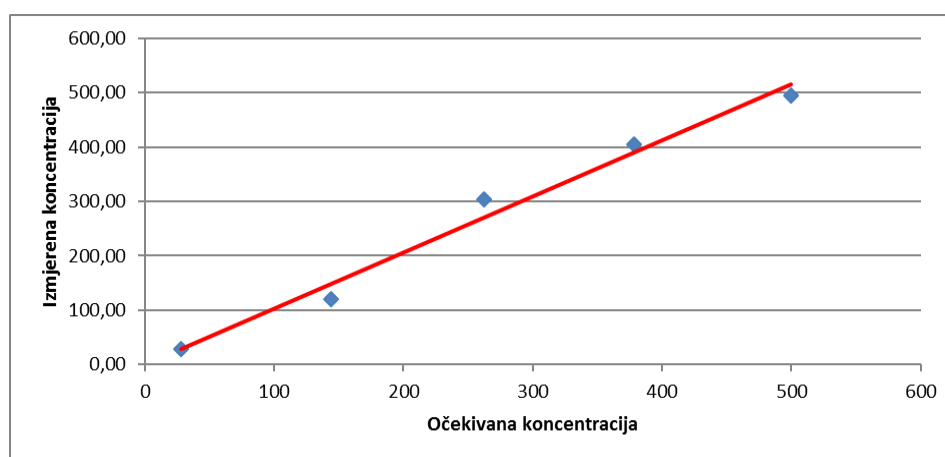
Proširena mjerna nesigurnost za visoku kontrolu, izračunata prema formuli $U = 2xCV_u$, iznosila je 5%, te je manja od ECAT kriterija prihvatljivosti, koji iznosi 20,0%

4.1.1.4. Linearnost metode

Linearnost metode ispitana je za deklarirano mjerno područje koncentracije dabigatrana od 20 do 500 ng/mL. Za određivanje linearnosti metode korišteni su uzorci s visokom koncentracijom dabigatrana (500 ng/ml) i niskom koncentracijom dabigatrana (28 ng/mL).

Tablica 9. Rezultati ispitivanja linearnosti DTI Innovance testa za određivanje koncentracije dabigatrana.

	Volumen (μL)	Očekivana vrijednost (ng/mL)	Mjerenje 1 (ng/mL)	Mjerenje 2 (ng/mL)	Srednja vrijednost (ng/mL)	Odstupanje izmjerene od očekivane vrijednosti (bias)
H	400	500	495	496	496	-0,9%
H:L=3:1	300+100	378	397	413	405	7,1%
H:L=1:1	200+200	262	295	312	304	15,8%
H:L=1:3	100+300	144	118	122	120	-16,7%
L	400	28	29	28	30	3,6%



Slika 14. Linearnost Innovance DTI metode za kvantitativno određivanje dabigatrana

Ispitivanje linearnosti metode za određivanje koncentracije dabigatrana Innovance DTI testom na BCSXP analitičkom sustavu pokazalo je da je metoda linearna u deklariranom mjernom području od 20 do 500 ng/mL. Odstupanja (bias, %) izmjerenih koncentracija od očekivanih koncentracija u svih 5 točaka mjerenja linearnosti bila su unutar kriterija prihvatljivosti za usporedivost metoda (20% prema kriteriju VKK ECAT).

4.1.2. Rezultati ispitivanja metode za određivanje koncentracije dabigatrana ECA II testom na analitičkom sustavu Compact MAX

4.1.2.1. Ponovljivost metode

Rezultati mjerenja ponovljivosti u uzorcima plazme s niskom i visokom koncentracijom dabigatrana prikazani su u Tablicama 10. i 11.

Tablica 10. Ponovljivost metode ECA II u komercijalnom kontrolnom uzorku plazme s niskim vrijednostima dabigatrana

Datum	26. 11. 2017.	27. 11. 2017.	28. 11. 2017.	29. 11. 2017.	30. 11. 2017.
Mjerenje 1 (ng/mL)	56,0	57,0	59,0	56,0	55,0
Mjerenje 2 (ng/mL)	56,0	55,0	57,0	56,0	53,0
Mjerenje 3 (ng/mL)	55,0	54,0	53,0	55,0	50,0
Srednja vrijednost (ng/mL)	55,7	55,3	56,3	55,7	52,7
Standardno odstupanje (ng/mL)	0,579	1,528	3,055	0,579	2,517

Srednja vrijednost svih mjerenja = 55,1 ng/mL

$$S_r = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}} = 1,9326$$

Tablica 11. Ponovljivost metode ECA II u komercijalnom kontrolnom uzorku plazme s visokim vrijednostima dabigatrana

Datum	26. 11. 2017.	27. 11. 2017.	28. 11. 2017.	29. 11. 2017.	30. 11. 2017.
Mjerenje 1 (ng/mL)	208,0	210,0	207,0	205,0	207,0
Mjerenje 2 (ng/mL)	202,0	201,0	203,0	198,0	200,0
Mjerenje 3 (ng/mL)	199,0	199,0	199,0	199,0	199,0
Srednja vrijednost (ng/mL)	203,0	203,3	203,0	200,7	202,0
Standardno odstupanje (ng/mL)	4,583	5,859	4,000	3,786	4,359

Srednja vrijednost svih mjerenja = 203,1 ng/mL

$$S_r = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}} = 4,5754$$

Izračunata ponovljivost, prema $CVp = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$, za nisku kontrolu iznosila je 3,5%, te je manja od deklariranog koeficijenta varijacije proizvođača, koji iznosi 3,6%.

Izračunata ponovljivost, prema $CVp = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$, za visoku kontrolu iznosila je 2,0%, te je jednaka deklariranom koeficijentu varijacije proizvođača, koji iznosi 2,0%.

4.1.2.2. Unutarlaboratorijska preciznost

Izračunata unutarlaboratorijska preciznost za nisku kontrolu iznosila je 3,9% te je manja od deklariranog koeficijenta varijacije proizvođača, koji iznosi 10%.

Izračunata unutarlaboratorijska preciznost za visoku kontrolu iznosila je 1,9% te je manja od deklariranog koeficijenta varijacije proizvođača, koji iznosi 5%.

4.1.2.3. Proširena mjerna nesigurnost

Proširena mjerna nesigurnost za nisku kontrolu, izračunata prema $U = 2xCV_u$, iznosila je 8% te je manja od ECAT kriterija prihvatljivosti, koji iznosi 20%.

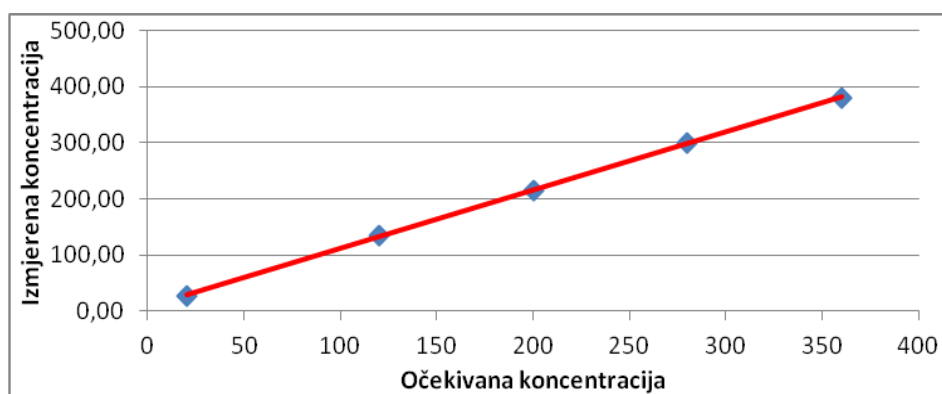
Proširena mjerna nesigurnost za visoku kontrolu, izračunata prema formuli $U = 2xCV_u$, iznosila je 4% te je manja od ECAT kriterija prihvatljivosti, koji iznosi 20%.

4.1.2.4. Linearnost metode

Linearnost metode ispitana je unutar deklariranog mjernog područja od 15 do 460 ng/mL korištenjem uzoraka s visokom koncentracijom dabigatrana (360 ng/mL) i niskom koncentracijom dabigatrana (20 ng/mL).

Tablica 12. Rezultati mjerenja različitih razrjeđenja u sklopu određivanja linearnosti

	Volumen (μL)	Očekivana vrijednost (ng/mL)	Mjerenje 1 (ng/mL)	Mjerenje 2 (ng/mL)	Srednja vrijednost (ng/mL)	Odstupanje izmjerene od očekivane vrijednosti (bias)
H	400	360	370	382	381	5,8%
H:L=3:1	300+100	280	295	300	299	6,7%
H:L=1:1	200+200	200	210	217	214	7,0%
H:L=1:3	100+300	120	136	130	135	12,5%
L	400	20	24	23	25	20,0%



Slika 15. Linearnost ECA II metode za određivanje koncentracije dabigatrana

Ispitivanje linearnosti metode za određivanje koncentracije dabigatrana ECA II testom na Compact MAX analitičkom sustavu pokazalo je da je metoda linearna u deklariranom

mjernom području od 15 do 460 ng/mL. Odstupanja (bias, %) izmjerenih koncentracija od očekivanih koncentracija u svih 5 točaka mjerenja linearnosti bila su unutar kriterija prihvatljivosti za usporedivost metoda (20% prema kriteriju VKK ECAT).

4.2. Rezultati ispitivanja metoda za određivanje koncentracije rivaroksabana

4.2.1. Rezultati ispitivanja metode Innovance anti Xa za određivanje koncentracije rivaroksabana na analitičkom sustavu BCSXP

4.2.1.1. Ponovljivost metode

Rezultati mjerenja ponovljivosti u komercijalnim uzorcima plazme s niskom i visokom koncentracijom rivaroksabana prikazani su u tablicama 13. i 14.

Tablica 13. Ponovljivost metode Innovance anti Xa u komercijalnom kontrolnom uzorku plazme s niskim vrijednostima rivaroksabana.

Datum	29. 5. 2017.	30. 5. 2017.	31. 5. 2017.	1. 6. 2017.	2. 6. 2017.
Mjerenje 1 (ng/mL)	26,5	25,2	28,8	27,5	26,4
Mjerenje 2 (ng/mL)	25,5	24,3	28,0	25,9	27,5
Mjerenje 3 (ng/mL)	25,2	24,7	25,6	26,9	25,6
Srednja vrijednost (ng/mL)	25,7	24,7	27,4	26,7	26,5
Standardno odstupanje (ng/mL)	0,682	0,441	1,658	0,785	0,943

Srednja vrijednost svih mjerenja = 26,2 ng/mL

$$S_r = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}} = 0,9911$$

Tablica 14. Ponovljivost metode Innovance anti Xa u komercijalnom kontrolnom uzorku plazme s visokim vrijednostima rivaroksabana

Datum	29. 5. 2017.	30. 5. 2017.	31. 5. 2017.	1. 6. 2017.	2. 6. 2017.
Mjerenje 1 (ng/mL)	323,9	335,5	345,5	340,6	347,2
Mjerenje 2 (ng/mL)	330,0	333,4	342,3	342,2	341,5
Mjerenje 3 (ng/mL)	326,9	327,6	340,1	344,7	335,6
Srednja vrijednost (ng/mL)	326,9	332,2	342,6	342,5	341,4
Standardno odstupanje (ng/mL)	3,060	4,117	2,727	2,089	5,755

Srednja vrijednost svih mjerenja = 337,1 ng/mL

$$Sr = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}} = 3,7745$$

Izračunata ponovljivost, prema formuli $CVp = \frac{Sr}{\bar{x}} \times 100$, za nisku kontrolu iznosila je 3,8%, što je unutar deklariranog koeficijenta varijacije proizvođača od 5%.

Izračunata ponovljivost prema formuli $CVp = \frac{Sr}{\bar{x}} \times 100$, za visoku kontrolu iznosila je 1,1%, što je unutar deklariranog koeficijenta varijacije proizvođača od 5%.

4.2.1.2. Unutarlaboratorijska preciznost

Izračunata unutarlaboratorijska preciznost za nisku kontrolu iznosila je 5,0%, što je unutar prihvatljivog koeficijenta varijacije od 10%.

Izračunata unutarlaboratorijska preciznost za visoku kontrolu iznosila je 2,3%, što je unutar prihvatljivog koeficijenta varijacije od 5%.

4.2.1.3. Proširena mjerna nesigurnost

Proširena mjerna nesigurnost za nisku kontrolu, izračunata prema $U = 2xCV_u$, iznosila je 10%, te je manja od ECAT kriterija prihvatljivosti, koji iznosi 20,0%.

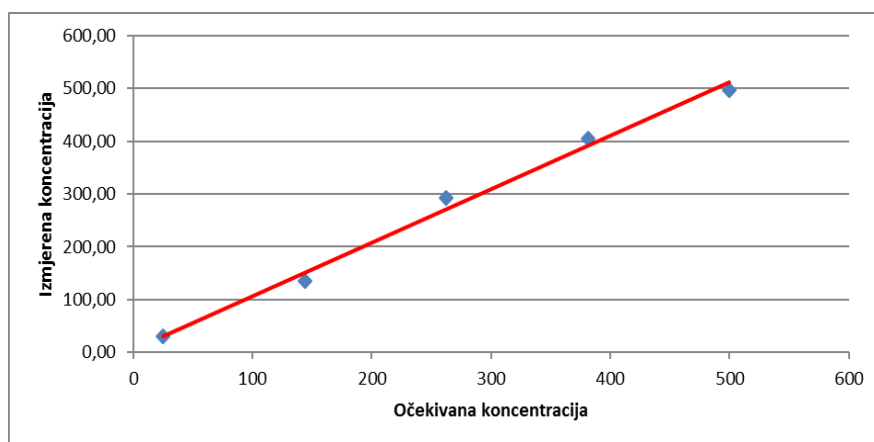
Proširena mjerna nesigurnost za visoku kontrolu, izračunata prema formuli $U = 2xCV_u$, iznosila je 5%, te je manja od ECAT kriterija prihvatljivosti, koji iznosi 20,0%.

4.2.1.4. Linearnost

Linearnost metode ispitana je unutar deklariranog mjernog područja od 20 do 500 ng/mL korištenjem uzoraka s visokom koncentracijom rivaroksabana (H=500ng/mL) i niskom koncentracijom rivaroksabana (L=25 ng/mL).

Tablica 15. Rezultati mjerenja različitih razrjeđenja u sklopu određivanja linearnosti

	Volumen (μL)	Očekivana vrijednost (ng/mL)	Mjerenje 1 (ng/mL)	Mjerenje 2 (ng/mL)	Srednja vrijednost (ng/mL)	Odstupanje izmjerene od očekivane vrijednosti (bias)
H	400	500	495	497	496	-0,7%
H:L=3:1	300+100	381	399	409	404	6,1%
H:L=1:1	200+200	262	285	299	292	11,3%
H:L=1:3	100+300	143	130	141	135	-5,7%
L	400	25	28	31	29	18,0%



Slika 16. Linearnost Innovance anti Xa metode za kvantitativno određivanje rivaroksabana.

Ispitivanje linearnosti metode za određivanje koncentracije rivaroksabana Innovance anti Xa testom na BCSXP analitičkom sustavu pokazalo je da je metoda linearna u deklariranom

mjernom području od 20 do 500 ng/mL. Odstupanja (bias, %) izmjerenih koncentracija od očekivanih koncentracija u svih 5 točaka mjerenja linearnosti bila su unutar kriterija prihvatljivosti za usporedivost metoda (20% prema kriteriju VKK ECAT).

4.2.2. Rezultati ispitivanja metode Liquid anti Xa na Compact MAX Stago analitičkom sustavu za određivanje koncentracije rivaroksabana

4.2.2.1. Ponovljivost metode

Rezultati mjerenja ponovljivosti u komercijalnim uzorcima plazme s niskom i visokom koncentracijom rivaroksabana prikazani su u tablicama 16. i 17.

Tablica 16. Ponovljivost metode Liquid anti Xa u komercijalnom kontrolnom uzorku plazme s niskim vrijednostima rivaroksabana.

Datum	4. 9. 2017.	5. 9. 2017.	6. 9. 2017	7. 9. 2017.	8. 9. 2017.
Mjerenje 1 (ng/mL)	88	86	84	86	84
Mjerenje 2 (ng/mL)	90	84	88	91	90
Mjerenje 3 (ng/mL)	87	84	83	90	85
Srednja vrijednost (ng/mL)	88,3	84,7	85,0	89,0	86,3
Standardno odstupanje (ng/mL)	1,528	1,155	2,646	2,646	3,215

Srednja vrijednost svih mjerenja = 86,7 ng/mL

$$S_r = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}} = 2,3667$$

Tablica 17. Ponovljivost metode Liquid anti Xa u komercijalnom kontrolnom uzorku plazme s visokim vrijednostima rivaroksabana

Datum	4. 9. 2017.	5. 9. 2017.	6. 9. 2017.	7. 9. 2017.	8. 9. 2017.
Mjerenje 1 (ng/mL)	310	325	307	327	331
Mjerenje 2 (ng/mL)	316	323	330	329	333
Mjerenje 3 (ng/mL)	315	319	323	334	323
Srednja vrijednost (ng/mL)	313,7	322,3	320,0	330,0	329,0
Standardno odstupanje (ng/mL)	3,215	3,055	11,789	3,606	5,292

Srednja vrijednost svih mjerenja = 323,0 ng/mL

$$S_r = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}} = 6,3193$$

Izračunata ponovljivost, prema formuli $CVp = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$, za nisku kontrolu iznosila je 2,7%, te je manja od deklariranog koeficijenta varijacije proizvođača, koji iznosi 3,3%.

Izračunata ponovljivost, prema formuli $CVp = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$, za visoku kontrolu iznosila je 1,9%, te je manja od deklariranog koeficijenta varijacije proizvođača, koji iznosi 2,8%.

4.2.2.2. Unutarlaboratorijska preciznost

Izračunata unutarlaboratorijska preciznost za nisku kontrolu iznosila je 3,2%, što je unutar prihvatljivog koeficijenta varijacije od 10%.

Izračunata unutarlaboratorijska preciznost za visoku kontrolu iznosila je 2,6%, što je unutar prihvatljivog koeficijenta varijacije od 5%.

4.2.2.3. Proširena mjerna nesigurnost

Proširena mjerna nesigurnost za nisku kontrolu, izračunata prema $U = 2xCV_u$, iznosila je 6%, te je manja od ECAT kriterija prihvatljivosti, koji iznosi 20,0%.

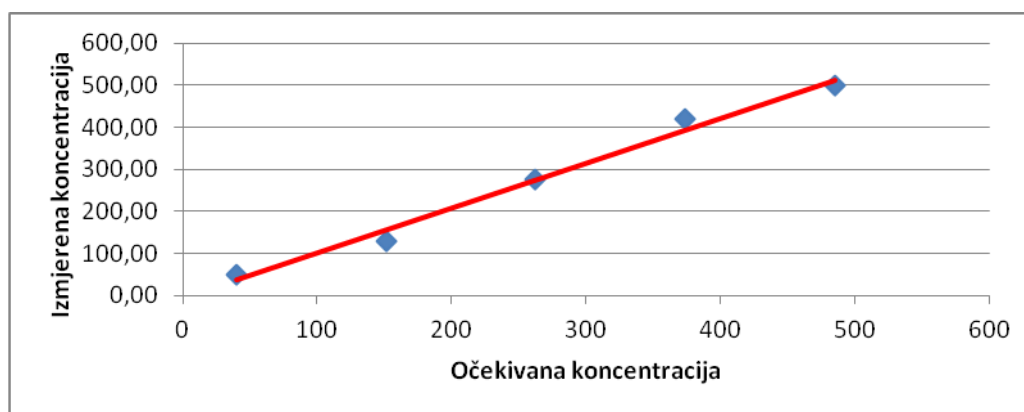
Proširena mjerna nesigurnost za visoku kontrolu, izračunata prema formuli $U = 2xCV_u$, iznosila je 5%, te je manja od ECAT kriterija prihvatljivosti, koji iznosi 20,0%.

4.2.2.4. Linearnost

Linearnost metode ispitana je unutar deklariranog mjernog područja od 25 do 500 ng/mL korištenjem uzoraka s visokom koncentracijom rivaroksabana (H=485 ng/mL) i niskom koncentracijom rivaroksabana (L=40 ng/mL).

Tablica 18. Rezultati mjerenja različitih razrjeđenja u sklopu određivanja linearnosti.

	Volumen (μL)	Očekivana vrijednost (ng/mL)	Mjerenje 1 (ng/mL)	Mjerenje 2 (ng/mL)	Srednja vrijednost (ng/mL)	Odstupanje izmjerene od očekivane vrijednosti (bias)
H	400	485	498	496	500	2,7%
H:L=3:1	300+100	366	420	407	433	12,4%
H:L=1:1	200+200	248	276	266	287	5,3%
H:L=1:3	100+300	129	128	122	135	-15,0%
L	400	40	45	53	47	12,4%



Slika 17. Linearnost Liquid anti Xa metode za kvantitativno određivanje rivaroksabana

Ispitivanje linearnosti metode za određivanje koncentracije rivaroksabana Liquid anti Xa testom na Compact MAX analitičkom sustavu pokazalo je da je metoda linearna u deklariranom mjernom području od 25 do 500 ng/mL. Odstupanja (bias, %) izmjerenih

koncentracija od očekivanih koncentracija u svih 5 točaka mjerenja linearnosti bila su unutar kriterija prihvatljivosti za usporedivost metoda (20% prema kriteriju VKK ECAT).

4.3. Rezultati ispitivanja metoda za određivanje koncentracije apiksabana

4.3.1. Rezultati ispitivanja metode za određivanje apiksabana Innovance anti Xa testom na analitičkom sustavu BCSXP

4.3.1.1. Ponovljivost metode

Rezultati mjerenja ponovljivosti u komercijalnim uzorcima plazme s niskom i visokom koncentracijom apiksabana prikazani su u tablicama 19. i 20.

Tablica 19. Rezultati mjerenja niske kontrole apiksabana.

Datum	29. 5. 2017.	30. 5. 2017.	31. 5. 2017.	1. 6. 2017.	2. 6. 2017.
Mjerenje 1 (ng/mL)	26,9	27,4	25,6	27,0	30,4
Mjerenje 2 (ng/mL)	26,5	23,7	27,8	25,7	25,6
Mjerenje 3 (ng/mL)	26,0	25,5	24,3	26,4	27,5
Srednja vrijednost (ng/mL)	26,5	25,5	25,9	26,4	27,8
Standardno odstupanje (ng/mL)	0,4528	1,8507	1,7425	0,6519	2,3909

Srednja vrijednost svih mjerenja = 26,4 ng/mL

$$S_r = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}} = 1,6005$$

Tablica 20. Rezultati mjerenja visoke kontrole apiksabana.

Datum	29. 5. 2017.	30. 5. 2017.	31. 5. 2017.	1. 6. 2017.	2. 6. 2017.
Mjerenje 1 (ng/mL)	414,0	413,1	425,0	430,0	435,3
Mjerenje 2 (ng/mL)	429,2	425,3	417,2	418,4	442,7
Mjerenje 3 (ng/mL)	425,0	430,3	429,0	428,1	440,0
Srednja vrijednost (ng/mL)	422,7	422,9	423,7	425,5	439,3
Standardno odstupanje (ng/mL)	7,8289	8,8656	6,0145	6,2390	3,7254

Srednja vrijednost svih mjerenja = 426,8 ng/mL

$$S_r = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}} = 6,7656$$

Izračunata ponovljivost, prema formuli $CVp = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$, za nisku kontrolu iznosila je 6,1%, što je izvan prihvatljivog koeficijenta varijacije od 5%.

Izračunata ponovljivost, prema formuli $CVp = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$, za visoku kontrolu iznosila je 1,6%, što je unutar prihvatljivog koeficijenta varijacije od 5%.

4.3.1.2. Unutarlaboratorijska preciznost

Izračunata unutarlaboratorijska preciznost za nisku kontrolu iznosila je 5,9%, što je unutar prihvatljivog koeficijenta varijacije od 10%.

Izračunata unutarlaboratorijska preciznost za visoku kontrolu iznosila je 2,1%, što je unutar prihvatljivog koeficijenta varijacije od 5%.

4.3.1.3. Proširena mjerna nesigurnost

Proširena mjerna nesigurnost za nisku kontrolu, izračunata prema $U = 2xCV_u$, iznosila je 12%, te je manja od ECAT kriterija prihvatljivosti, koji iznosi 20,0%.

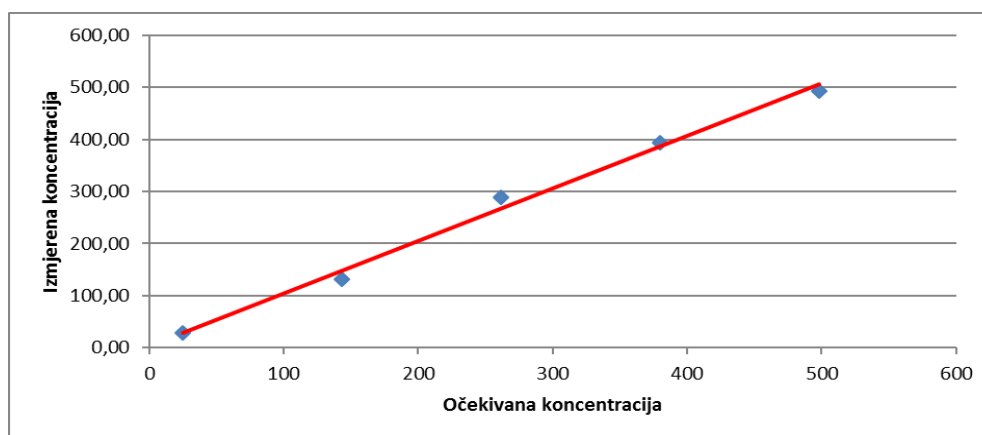
Proširena mjerna nesigurnost za visoku kontrolu, izračunata prema formuli $U = 2xCV_u$, iznosila je 4%, te je manja od ECAT kriterija prihvatljivosti, koji iznosi 20,0%.

4.3.1.4. Linearnost metode

Linearnost metode ispitana je unutar deklariranog mjernog područja od 0 do 500 ng/mL korištenjem uzoraka s visokom koncentracijom apiksabana (H=498 ng/mL) i niskom koncentracijom apiksabana (L=25 ng/mL).

Tablica 21. Rezultati mjerenja različitih razrjeđenja u sklopu određivanja linearnosti

	Volumen (μL)	Očekivana vrijednost (ng/mL)	Mjerenje 1 (ng/mL)	Mjerenje 2 (ng/mL)	Srednja vrijednost (ng/mL)	Odstupanje izmjerene od očekivane vrijednosti (bias)
H	400	498	492	495	494	-0,9%
H:L=3:1	300+100	379	393	395	394	3,8%
H:L=1:1	200+200	261	291	286	289	10,3%
H:L=1:3	100+300	143	133	129	131	-8,6%
L	400	25	27	29	28	12,0%



Slika 18. Linearnost Innovance anti Xa metode za kvantitativno određivanje apiksabana

Ispitivanje linearnosti metode za određivanje koncentracije apiksabana Innovance anti Xa testom na BCSXP analitičkom sustavu pokazalo je da je metoda linearna u deklariranom mjernom području od 0 do 500 ng/mL. Odstupanja (bias, %) izmjerenih koncentracija od

očekivanih koncentracija u svih 5 točaka mjerenja linearnosti bila su unutar kriterija prihvatljivosti za usporedivost metoda (20% prema kriteriju VKK ECAT).

4.3.2. Rezultati ispitivanja metode Liquid anti Xa za određivanje koncentracije apiksabana na analitičkom sustavu Compact MAX Stago

4.3.2.1. Ponovljivost metode

Rezultati mjerenja ponovljivosti u komercijalnim uzorcima plazme s niskom i visokom koncentracijom apiksabana prikazani su u tablicama 22. i 23.

Tablica 22. Ponovljivost metode Liquid anti-Xa u komercijalnom kontrolnom uzorku plazme s niskim vrijednostima apiksabana.

Datum	4. 9. 2017.	5. 9. 2017.	6. 9. 2017.	7. 9. 2017.	8. 9. 2017.
Mjerenje 1 (ng/mL)	75	69	74	74	80
Mjerenje 2 (ng/mL)	74	71	71	78	84
Mjerenje 3 (ng/mL)	72	67	75	82	82
Srednja vrijednost (ng/mL)	73,7	69,0	73,3	78,0	82,0
Standardno odstupanje (ng/mL)	1,528	2,000	2,082	4,000	2,000

Srednja vrijednost svih mjerenja = 75,2 ng/mL

$$S_r = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}} = 2,4767$$

Tablica 23. Rezultati mjerenja visoke kontrole apiksabana.

Datum	4. 9. 2017.	5. 9. 2017.	6. 9. 2017.	7. 9. 2017.	8. 9. 2017.
Mjerenje 1 (ng/mL)	268	277	276	285	286
Mjerenje 2 (ng/mL)	267	290	272	273	290
Mjerenje 3 (ng/mL)	278	274	273	264	291
Srednja vrijednost (ng/mL)	271,0	280,3	273,7	274,0	289,0
Standardno odstupanje (ng/mL)	6,083	8,504	2,082	10,536	2,646

Srednja vrijednost svih mjerenja = 277,6 ng/mL

$$S_r = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}} = 6,8067$$

Izračunata ponovljivost, prema formuli $CV_p = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$, za nisku kontrolu iznosila je 3,3%, te je manja od deklariranog koeficijenta varijacije proizvođača, koji iznosi 4,3%.

Izračunata ponovljivost prema formuli $CV_p = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$, za visoku kontrolu iznosila je 2,5%, te je manja od deklariranog koeficijenta varijacije proizvođača, koji iznosi 2,6%.

4.3.2.2. Unutarlaboratorijska preciznost

Izračunata unutarlaboratorijska preciznost za nisku kontrolu iznosila je 7,1%, te je manja od deklariranog koeficijenta varijacije proizvođača, koji iznosi 10%.

Izračunata unutarlaboratorijska preciznost za visoku kontrolu iznosila je 3,3%, te je manja od deklariranog koeficijenta varijacije proizvođača, koji iznosi 5%.

4.3.2.3. Proširena mjerna nesigurnost

Proširena mjerna nesigurnost za nisku kontrolu, izračunata prema $U = 2xCV_u$, iznosila je 14%, te je manja od ECAT kriterija prihvatljivosti, koji iznosi 20,0%.

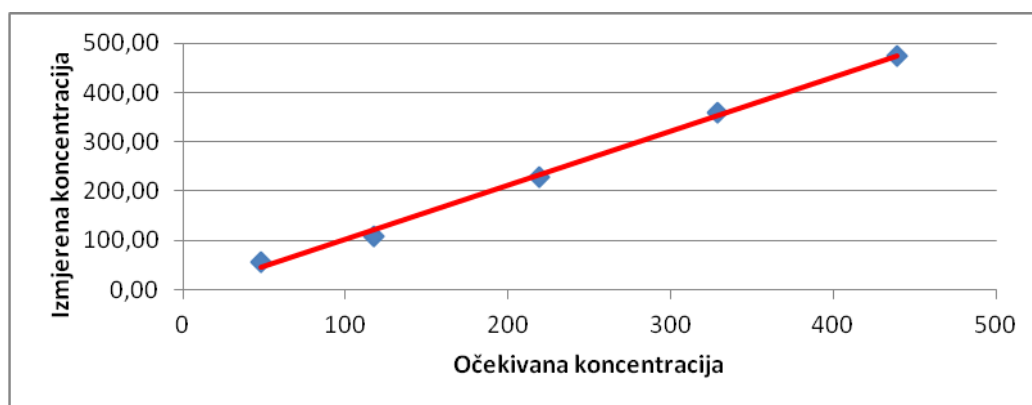
Proširena mjerna nesigurnost za visoku kontrolu, izračunata prema formuli $U = 2xCV_u$, iznosila je 7%, te je manja od ECAT kriterija prihvatljivosti, koji iznosi 20,0%.

4.3.2.4. Linearnost metode

Linearnost metode ispitana je unutar deklariranog mjernog područja od 23 do 500 ng/mL korištenjem uzoraka s visokom koncentracijom apiksabana (H=439 ng/mL) i niskom koncentracijom apiksabana (L= 48 ng/mL).

Tablica 24. Rezultati mjerenja različitih razrjeđenja u sklopu određivanja linearnosti.

	Volumen (μL)	Očekivana vrijednost (ng/mL)	Mjerenje 1 (ng/mL)	Mjerenje 2 (ng/mL)	Srednja vrijednost (ng/mL)	Odstupanje izmjerene od očekivane vrijednosti (bias)
H	400	439	475	462	488	8,2%
H:L=3:1	300+100	329	359	343	375	9,1%
H:L=1:1	200+200	219	229	232	226	4,3%
H:L=1:3	100+300	11	109	105	113	-7,1%
L	400	48	57	55	59	18,8%



Slika 19. Linearnost Liquid anti Xa metode za kvantitativno određivanje apiksabana

Ispitivanje linearnosti metode za određivanje koncentracije apiksabana Liquid anti Xa testom na Compact MAX analitičkom sustavu pokazalo je da je metoda linearna u deklariranom mjernom području od 23 do 500 ng/mL. Odstupanja (bias, %) izmjerenih koncentracija od

očekivanih koncentracija u svih 5 točaka mjerenja linearnosti bila su unutar kriterija prihvatljivosti za usporedivost metoda (20% prema kriteriju VKK ECAT).

Uvođenje novog analitičkog sustava i/ili metoda jedan je od načina kontinuiranog poboljšanja kvalitete dijagnostičkih usluga koje medicinskobiokemijski laboratorij pruža svojim korisnicima. Prije uvođenja novog sustava i/ili metode potrebno je u prvom koraku razmotriti i utvrditi postoji li potreba za uvođenjem analitičkog sustava, primjerice, zbog zastarjele opreme, opreme čije je održavanje financijski ili vremenski zahtjevno, zbog povećanog broja uzoraka ili nedostatnog kapaciteta opreme. Ako se radi o uvođenju nove metode na postojećem analitičkom sustavu, također je potrebno utvrditi razlog uvođenja metode, primjerice, ukoliko je u trenutnoj uporabi metoda nedovoljne analitičke pouzdanosti, kliničke osjetljivosti ili specifičnosti, metoda koja je podložna interferencijama ili se jednostavno radi o uvođenju nove metode koja ranije nije bila u uporabi bilo zbog nedostupnosti ili zbog neopravdanosti primjene s obzirom na potrebe laboratorija. Prilikom odabira nove metode potrebno je uzeti u obzir praktične zahtjeve same metode, kao što su potreban volumen uzorka za analizu, predanalitička priprema uzorka prije analize, postupak izvođenja unutarnje analitičke kontrole, ekonomska prihvatljivost metode s obzirom na broj uzoraka i potrebe laboratorija. Nakon odabira metode, a prije provođenja postupka evaluacije, potrebno je definirati analitičke ciljeve ili kriterije prihvatljivosti pojedinih ključnih obilježja same metode. Kriteriji prihvatljivosti metode mogu biti oni deklarirani od strane proizvođača, ili ih može postaviti sam korisnik prema drugim dostupnim izvorima, kao što su primjerice kriteriji vanjske kontrole kvalitete (VKK) odabranog dobavljača za procjenu usporedbe ispitivane metode s drugom, najčešće postojećom metodom.

Svrha evaluacije neke metode je objektivna procjena, odnosno, utvrđivanje obilježja metode. Drugim riječima, evaluacijom metode želimo utvrditi ima li metoda koju želimo uvesti u rad laboratorija zadovoljavajuća analitička obilježja kako bi rezultati pretraga u uzorcima ispitanika bili primjenjivi u dijagnostici stanja ili bolesti za koje je ta metoda namijenjena.

Postupku same evaluacije treba pristupiti kao složenom i planiranom procesu u kojem prikupljamo sve eksperimentalno dobivene podatke, a potom njihovom statističkom obradom procjenjujemo ispitivane značajke metode. Pri tome se rezultat dobiven u postupku evaluacije za svako ispitivano svojstvo ili obilježje metode uspoređuje s unaprijed utvrđenim analitičkim ciljevima. Na kraju postupka evaluacije, odnosno obrade dobivenih eksperimentalnih podataka, donosi se odluka je li evaluirana metoda prikladna za uvođenje u rad laboratorija.

U postupku evaluacije metode koriste se, a nerijetko i miješaju, dva različita pojma, validacija i verifikacija metode. Verifikacija metode definira se kao postupak kojim se osiguravaju objektivni dokazi da metoda zadovoljava specificirana svojstva koje je naveo proizvođač.

Validacija je postupak kojim se dokazuje da su specificirani zahtjevi prikladni za određenu namjenu. Prema zahtjevima Europske unije (EU) proizvođači analitičkih sustava i metoda namijenjenih za dijagnostičke svrhe obvezni su provesti njihovu validaciju u razvojnoj fazi metode i prije njezina izlaska na tržište, a korisnik usluga, u ovom slučaju medicinskobiokemijski laboratorij, provodi verifikaciju kojom ispituje jesu li karakteristike metode utvrđene postupkom validacije primjenjive u svakodnevnom radu laboratorija. To znači da uvođenje nove originalne metode proizvođača za koju postoji dokaz o provedenoj validaciji od strane proizvođača ne zahtijeva validaciju, već verifikaciju prije uvođenja u rad. Postupak validacije je, međutim, potrebno provesti u slučaju kada se metoda modificira u odnosu na originalnu metodu prema proizvođaču ili se želi uvesti metoda uspostavljena u vlastitom laboratoriju (tzv. *in-house* metoda).

Postupak validacije koju je dužan provesti proizvođač uključuje ispitivanje svih ključnih značajki metode kao što su preciznost, istinitost, linearnost, granice detekcije i kvantifikacije, analitička osjetljivost, referentni intervali i interferencije. Prema potrebi validacija može uključivati i druge značajke metode kao što su primjerice procjena prenosivosti prethodnog uzorka (engl. *carry over*), dijagnostičku specifičnost i osjetljivost, stabilnost uzorka i reagensa, stabilnost kalibracijske krivulje i drugo. Postupak verifikacije koju provodi laboratorij prije uvođenja neke metode uključuje obvezno ispitivanje, odnosno provjeru nekih od navedenih značajki metoda, kao što su preciznost (ponovljivost i međulaboratorijska preciznost) i linearnost, a za metode za koje je to primjenjivo i istinitost (razlika rezultata dobivenih ispitivanom metodom i poznate vrijednosti certificiranog referentnog materijala ili vrijednosti izmjerene usporednom metodom) i referentne intervale. O potrebi ispitivanja, odnosno provjere ostalih značajki metode, koje su provedene u validacijskom postupku od strane proizvođača i naznačene u dokumentu koji detaljno opisuje metodu, odlučuje sam laboratorij.

U ovom radu cilj verifikacije bio je ispitati značajke metoda za kvantitativno određivanje koncentracije novih oralnih antikoagulantnih lijekova. Ove metode posljednjih nekoliko godina tek postaju dostupne kao komercijalne metode te još uvijek nisu sastavni dio rutinskog rada laboratorija za ispitivanje hemostaze, već se za sada koriste isključivo u istraživačke svrhe.

U ovom su radu ispitane osnovne analitičke značajke metoda, tj. ponovljivost, unutarlaboratorijska preciznost, proširena mjerna nesigurnost i linearnost za određivanje tri nova antikoagulantna lijeka dostupna na tržištu (dabigatran, rivaroksaban i apiksaban) na dva

različita automatizirana analitička sustava (BCSXP i Compact MAX) i uz primjenu odgovarajućih komercijalnih reagenasa.

Provedena verifikacija metoda za kvantitativno određivanje novih oralnih antikoagulanasa pokazala je da iste ispunjavaju kriterije ponovljivosti, unutarlaboratorijske preciznosti, proširene mjerne nesigurnosti i linearnosti. Drugim riječima, ispitane značajke ponovljivosti, unutarlaboratorijske preciznosti i proširene mjerne nesigurnosti zadovoljile su postavljene kriterije prihvatljivosti. Na temelju provedene verifikacije zaključuje se da su ispitane analitičke metode za određivanje koncentracija dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana na oba analitička sustava (BCSXP i Compact MAX) prikladne za uvođenje u rad laboratorija. Verifikacijskim postupkom ispitivana preciznost, koja je uključivala ponovljivost i unutarlaboratorijsku preciznost, pokazala se nižom u području niskih koncentracija lijekova za sva tri ispitivana lijeka i na oba analitička sustava, u odnosu na preciznost u području visokih koncentracija lijekova. Također, rezultati ovog ispitivanja potvrđuju da je i proširena mjerna nesigurnost veća u području vrlo niskih koncentracija lijeka, te manja u području većih koncentracija sva tri lijeka. To znači da se veće koncentracije NOAK lijekova mjere s manjom mjernom nesigurnošću i obrnuto. Ovakvi rezultati u potpunosti se mogu smatrati očekivanima. Manja preciznost mjerenja i veća mjerna nesigurnost u području vrlo niskih koncentracija lijeka objašnjavaju se vrijednostima koje su nešto veće ili oko graničnih vrijednosti kvantifikacije. Suprotno, preciznost mjerenja je veća, a proširena mjerna nesigurnost manja kod većih koncentracija lijekova.

Ispitivanje linearnosti važna je značajka, odnosno, sastavnica verifikacijskih protokola. Linearnost metode odražava njezinu sposobnost da unutar određenog (deklariranog) područja daje rezultat koji je proporcionalan koncentraciji ili količini analita u uzorku. Ispitivanje linearnosti metoda za određivanje koncentracije sva tri lijeka pokazalo je zadovoljavajuću, odnosno, prihvatljivu linearnost u deklariranom mjernom području. Sukladno ispitivanju preciznosti, i ispitivanje linearnosti metoda za određivanje koncentracije sva tri lijeka na oba analitička sustava također je pokazalo veća odstupanja izmjerene od očekivane vrijednosti (*bias*) pri nižim nego pri višim koncentracijama lijeka, što se također može objasniti manjom preciznošću i točnošću mjerenja pri koncentracijama oko graničnih koncentracija kvantifikacije, u odnosu na veće koncentracije lijeka. Deklarirana mjerna područja svih metoda su međusobno usporediva za oba analitička sustava, te se na temelju ispitane linearnosti zaključuje da se ispitane metode za sva tri lijeka i na oba analitička sustava mogu primijeniti za mjerenje u deklariranom mjernom području.

Rezultati verifikacije metoda dobiveni ovim ispitivanjem podudarni su s rezultatima evaluacije dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana u multicentričnoj francuskoj studiji, u kojoj autori zaključuju da su metode određivanja koncentracije sva tri lijeka pouzdane za određivanje koncentracija lijekova u dovoljno širokom mjernom rasponu, ali je potrebno njihovo poboljšanje kod određivanja vrlo niskih koncentracija (Gouin-Thibault 2017).

U ovom radu, verificirane osnovne značajke metoda za kvantitativno određivanje NOAK lijekova (preciznost, povećana mjerna nesigurnost i linearnost metoda), čine temeljni sastavni dio svake verifikacije kvantitativnih metoda u laboratorijskim uvjetima. Međutim, kako je već ranije navedeno, ukoliko laboratorij ima mogućnost ili postoji klinička opravdanost, poželjno je verificirati i ostale značajke metode prema potrebi, kao što su provjera granica detekcije i kvantifikacije, ukoliko se primjerice klinička odluka donosi u vrlo niskom koncentracijskom području. U slučaju verifikacije NOAK lijekova područje niskih koncentracija nije osnova za donošenje kliničkih odluka tijekom liječenja, zbog čega se u ovom slučaju mogu prihvatiti vrijednosti granica detekcije i kvantifikacije koje deklarira proizvođač za svaku pojedinu metodu.

Kao sastavni dio verifikacije u laboratorijskim uvjetima izvodi se i postupak usporedivosti metoda koji može poslužiti kao mjera istinitosti metode koja se uvodi (ukoliko istinitost nije moguće ispitati primjenom certificiranih referentnih materijala poznatih koncentracija). U postupku uspoređivanja nove i usporedne metode kao mjera istinitosti (*bias*) izračunava se odstupanje rezultata dobivenih ispitivanom metodom i usporednom metodom. Verifikacija ove značajke metode najčešće se primjenjuje pri uvođenju metode koja se uspoređuje s postojećom metodom. U slučaju verifikacije metoda za određivanje NOAK lijekova, ispitivanje istinitosti analizom usporedivosti nije primjenjivo s obzirom da se u ovom slučaju radi o uvođenju potpuno novih metoda (mjernih postupaka) koje do danas nisu dio rutinske laboratorijske dijagnostike, a obje metode u ovom radu su ispitivane zbog čega nijedna od metoda ne može poslužiti za ispitivanje usporedivosti.

Nadalje, jedna od značajki metode koja najčešće nije obuhvaćena verifikacijskim protokolima jest provjera stabilnosti reagensa unutar deklariranog (prema proizvođaču) vremenskog razdoblja. Naime, proizvođač svakog pojedinog reagensa uz priložen dokument koji detaljno opisuje metodu, deklarira i stabilnost reagensa na određenoj temperaturi nakon njegova otvaranja, odnosno pripreme za rad. U ovom radu nije provjeravana stabilnost reagensa, no prema specifikacijama proizvođača može se zaključiti da je deklarirana stabilnost reagensa nakon njihova otvaranja, odnosno pripreme za rad, različita za različite metode kojima se određuje isti lijek. Primjerice, deklarirane stabilnosti reagensa za DTI Innovance metodu i

ECA II metodu kojima se određuje koncentracija dabigatrana iznose 8 tjedana (DTI Innovance, BCSXP) i 28 dana (ECA II metoda, COMPACT MAX) na 2-8°C. Za određivanje koncentracija rivaroksabana i apiksabana sastavnice reagensa za BCSXP analitički sustav stabilne su 2 mjeseca, a za Compact MAX 3 mjeseca. Vremenski zadovoljavajuće duga stabilnost pojedinih metoda za određivanje koncentracije NOAK lijekova od izuzetne je važnosti budući da se radi o skupim pretragama koje su namijenjene mjerenju u pojedinačnim uzorcima u stanjima hitne dijagnostike. Stoga je relativno duga stabilnost reagensa, a to znači više mjeseci, imperativ u slučaju metoda za određivanje NOAK lijekova kako bi se spriječili značajni materijalni gubitci pri njihovoj primjeni u kliničkoj praksi.

Ispitivanje interferencija također spada u značajke metode koje je ponekad potrebno verificirati u laboratoriju prije uvođenja same metode. Ispitivanje interferencije uključuje određivanje učinka pojedinih tvari prisutnih u uzorku koje uzrokuju odstupanje izmjerene vrijednosti u odnosu na pravu vrijednost. Klinički najznačajnije interferencije za većinu laboratorijskih metoda su najčešće hemoliza, hiperbilirubinemija i lipemija. Proizvođači u dokumentu koji detaljno opisuje metodu iskazuju i utjecaj najvažnijih, odnosno klinički značajnih interferencija za pojedinu metodu, na temelju vlastitih ispitivanja u sklopu validacijskog postupka. Laboratorij pri uvođenju metode može prihvatiti od strane proizvođača naznačene podatke o klinički značajnim interferencijama, s tim da je u slučaju potrebe poželjno provjeriti odgovaraju li naznačeni podaci stvarnim laboratorijskim uvjetima. U ovom radu nije ispitan utjecaj interferencija na mjerenje koncentracije NOAK lijekova. Proizvođači su za svaku pojedinu metodu, odnosno lijek iskazali do kojih koncentracija interferirajućih supstanci nema značajnog utjecaja na mjerenje.

Na kraju ovog rada, potrebno je naglasiti da je prije uvođenja neke metode (mjernog postupka), postupak verifikacije nužan korak u kojem izravnim ispitivanjem upoznajemo važne značajke i obilježja same metode, stječemo saznanja o njezinim osnovnim analitičkim svojstvima, sagledavamo pozitivne i negativne strane metode te u konačnici ocjenjujemo njezinu prikladnost za uvođenje u kliničku primjenu. Stoga je jasno da ispravno izvedena verifikacija metode u konačnici značajno pridonosi kvaliteti usluga koje laboratorij pruža svojim korisnicima.

5. ZAKLJUČAK

1. Ispitivanje metoda za određivanje koncentracije dabigatrana na analitičkim sustavima BCSXP (Siemens, Njemačka) i Compact MAX (Stago, Francuska) pokazalo je zadovoljavajuće i prihvatljive kriterije ponovljivosti, unutarlaboratorijske preciznosti i linearnosti metoda. Stoga se zaključuje da su metode prikladne za uvođenje u redovnu laboratorijsku praksu.

2. Ispitivanje metoda za određivanje koncentracije rivaroksabana na analitičkim sustavima BCSXP i Compact MAX pokazalo je zadovoljavajuće i prihvatljive kriterije ponovljivosti, unutarlaboratorijske preciznosti i linearnosti metoda. Metode su prikladne za uvođenje u redovnu laboratorijsku praksu.

3. Ispitivanje metoda za određivanje koncentracije apiksabana na analitičkim sustavima BCSXP i Compact MAX pokazalo je zadovoljavajuće i prihvatljive kriterije ponovljivosti, unutarlaboratorijske preciznosti i linearnosti metoda. Metode su prikladne za uvođenje u redovnu laboratorijsku praksu.

6. LITERATURA

Ansell J, Hirsh J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M, Palareti G. The pharmacology and management of the vitamin K antagonists. American College of Chest Physicians Evidence - Based Clinical Practice Guidelines (8th edition). *Chest* 2008, 133 (suppl6), 160-198.

Bauer, KA. Pros and cons of new oral anticoagulants. *American Society of Hematology*, 2013, 464–470.

Bahuleyan B. Hemostasis: a cell based model. *J Phys Pharm Adv*, 2015, 5, 638-642.

Becker RC, Yang H, Barrett Y, Mohan P, Wang J, Wallentin L, Alexander JH. Chromogenic laboratory assays to measure the factor Xa-inhibiting properties of apixaban - an oral, direct and selective factor Xa inhibitor. *J Thromb Thrombol*, 2011, 32, 183-187.

Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, Arcelus JI, Bergqvist D, Brecht JG, Greer IA, Heit JA, Hutchinson JL, Kakkar AK, Mottier D, Oger E, Samama MM, Spannagl M. VTE Impact Assessment Group in Europe (VITAE). Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost*, 2007, 98, 756-757

Danesh J., Whincup P., Walker M., Lennon L., Thomson A., Appleby P. Fibrin D-Dimer and Coronary Heart Disease: Prospective Study and Meta-Analysis. *Circulation*, 2001, 103, 2323-2327.

Douxflis J, Mullier F, Loosen C, Chatelain C, Chatelain B, Dogne JM. Assessment of the impact of rivaroxaban on coagulation assays: Laboratory recommendations for the monitoring of rivaroxaban and review of the literature. *Thromb. Res* 2012, 130, 956 – 966.

Fareed J. New Oral Anticoagulants. London, Future Medicine, 2012, str. 3–7.

Dynamic Clots Make for Dynamic Research, 2012.,
<https://www.pennmedicine.org/news/news-blog/2012/december/dynamic-clots-make-for-dynamic>, pristupljeno 27.2.2018.

Gouin – Thibault I, Freyburger G, de Maistre E, Susen S, Delavenne X, Golmard JL, Gruel Y, Sié P. Evaluation of dabigatran, rivaroxaban and apixaban target – specific assays in a multicenter French study. *Thromb Res*, 2017, 158, 126-133.

Kitchen S, Olson JD, Preston FE. Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis. Hoboken, Wiley Blackwell, 2013, str. 264 – 270.

Kottke-Marchant K, Davis BH. Laboratory hematology practice. Hoboken, Wiley-Blackwell, 2012, str. 302-304.

Kralj V, Hrabak-Žerjavić V, Brkić I. Javnozdravstveni značaj kardiovaskularnih bolesti u Hrvatskoj. *Liječ Vjesn*, 2007, 129 (suppl.1), 45.

Labar B, Hauptmann E. Hematologija. Zagreb, Školska knjiga, 2007, str. 70-73.

Laux V, Perzborn E, Kubitza D, Misselwitz F. Preclinical and clinical characteristics of rivaroxaban – a novel, oral, direct factor Xa inhibitor. *Semin Thromb Hemost*, 2007, 33, 515 - 523.

Mannucci PM, Franchini M. Old and new anticoagulant drugs: a minireview. *Ann Med*, 2011, 43, 116–123.

Margetić S. Laboratory investigation of thrombophilia. *J Med Biochem*, 2014, 33, 28-46.

Margetić S, Čaržavec D. Bolesti hemostaze. U: Topić E. i sur., Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi, 2. izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2017, 351-385.

Samama MM, Amiral J, Guinet C, Perzborn E, Depasse F. An optimised, rapid chromogenic assay, specific for measuring direct factor Xa inhibitors (rivaroxaban) in plasma. *Thromb Haemost*, 2010, 104, 1078-1079.

Saračević A. Validacija i verifikacija metoda. U: Šimundić i sur., Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 7-20.

Tripodi A. The laboratory and the new oral anticoagulants. *Clin Chem*, 2013, 59, 353-362.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

Novi oralni antikoagulansi (NOAK) su lijekovi koji se posljednjih nekoliko godina sve više koriste u prevenciji i liječenju venske i arterijske tromboze. Metode kvantitativnog određivanja koncentracije NOAK lijekova tek postaju predmetom uvođenja u specijalizirane laboratorije za pretrage hemostaze i za sada još uvijek nisu sastavni dio laboratorijske dijagnostike.

Cilj ovog rada bio je ispitati ključna analitička obilježja kvantitativnih metoda određivanja koncentracije NOAK lijekova na dva različita analitička sustava kako bi se procijenilo jesu li ispitivane metode prikladne za uvođenje u svakodnevni rad.

Ispitivanja metoda za određivanje koncentracije dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana na analitičkim sustavima BCSXP (Siemens, Njemačka) i Compact MAX (Stago, Francuska) pokazala su zadovoljavajuće i prihvatljive kriterije ponovljivosti, unutarlaboratorijske preciznosti i linearnosti metoda. Stoga se zaključuje da su metode prikladne za uvođenje u redovnu laboratorijsku praksu.

Ispitivana preciznost pokazala se nižom kod niskih koncentracija lijekova, što se može objasniti manjom preciznošću i točnošću mjerenja pri koncentracijama oko graničnih koncentracija kvantifikacije u odnosu na veće koncentracije lijeka.

Ključne riječi: novi oralni antikoagulansi, verifikacija, preciznost, linearnost, ponovljivost

7.2. Summary

New oral anticoagulants (NOACs) are drugs that have been increasingly used for the prevention and treatment of arterial and venous thrombosis in recent years. The methods for quantitative determination of concentration of NOAC drugs are just being introduced into specialized hemostasis laboratories and are currently not in routine laboratory use.

The aim of this study was to examine the key analytical characteristics of the quantitative methods for determination of NOACs on two different analytical systems in order to determine their suitability for routine laboratory use.

The methods for the determination of concentration of dabigatran, rivaroxaban and apixaban on analytical systems BCSXP (Siemens, Germany) and Compact MAX (Stago, France) have met the criteria of repeatability, intralaboratory precision and linearity. Therefore, it is concluded that the methods are suitable for routine laboratory use.

The determined precision, which included repeatability and intralaboratory precision, was found out to be lower in the range of low drug concentrations, which can be explained by worse precision and measurement accuracy in the range of concentrations around the limit of quantification compared to higher drug concentrations.

Keywords: new oral anticoagulants, verification, precision, linearity, repeatability

8. PRILOZI

8.1. Popis kratica

vVF – von Willebrandov čimbenik (engl. von Willebrand factor)

TF – tkivni čimbenik (engl. tissue factor)

FVIIIa – aktivirani čimbenik VIII

FIXa – aktivirani čimbenik IX

FXa – aktivirani čimbenik X

FVa – aktivirani čimbenik V

FII – čimbenik II

FV – čimbenik V

FVIII – čimbenik VIII

FIX – čimbenik IX

FXI – čimbenik XI

FXIII – čimbenik XIII

PC – protein C

PS – protein S

AT – antitrombin

TFPI – inhibitor puta tkivnog čimbenika (engl. tissue factor pathway inhibitor)

FXIa – aktivirani čimbenik XI

FXIIa – aktivirani čimbenik XII

tPA – tkivni aktivator plazminogena (engl. tissue plasminogen activator)

uPA – urokinazni aktivator plazminogena (engl. urokinase plasminogen activator)

PAI – 1 – inhibitor aktivatora plazminogena – 1 (engl. plasminogen activator inhibitor – 1)

TAFI – trombinom aktivirani inhibitor fibrinolize (engl. thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor)

VTE – venska tromboembolija

DVT – duboka venska tromboza

PE – plućna embolija

LA – lupus antikoagulans

aCL – antikardiolipinska antitijela

anti- β 2-GPI – anti-beta2-glikoproteinska I antitijela
AIM – akutni infarkt miokarda
MU – moždani udar
LMWH – niskomolekularni heparin (engl. low molecular weight heparin)
UFH – nefrakcionirani heparin (engl. unfractionated heparin)
APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
HIT – heparinom inducirana trombocitopenija
PIVKA – proteini inducirani u nedostatku vitamina K (engl. proteins induced in vitamin K absence)
PV – protrombinsko vrijeme
INR – internacionalizirani normalni omjer (engl. International Normalized Ratio)
NOAK – novi oralni antikoagulansi
SE – sistemna embolija
NVAf – nevalvularna fibrilacija atrija (engl. nonvalvular atrial fibrillation)
dTT – razrijeđeno trombinsko vrijeme (engl. dilute thrombin time)
LOD – donja granica detekcije (engl. limit of detection)
LOB – granica praznine (engl. limit of blank)
DTI – direktni inhibitori trombina (engl. direct thrombin inhibitors)
pNA – paranitroanilin
VKK – vanjska kontrola kvalitete
ECAT – Vanjska kontrola kvalitete dijagnostičkih metoda i testova (engl. External quality Control of diagnostic Assays and Tests)
EU – Europska unija

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

VERIFIKACIJA METODA ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NOVIH ORALNIH ANTIKOAGULANSA: DABIGATRANA, RIVAROKSABANA I APIKSABANA

Ana-Katarina Kralj

SAŽETAK

Novi oralni antikoagulansi (NOAK) su lijekovi koji se posljednjih nekoliko godina sve više koriste u prevenciji i liječenju venske i arterijske tromboze. Metode kvantitativnog određivanja koncentracije NOAK lijekova tek postaju predmetom uvođenja u specijalizirane laboratorije za pretrage hemostaze i za sada još uvijek nisu sastavni dio laboratorijske dijagnostike.

Cilj ovog rada bio je ispitati ključna analitička obilježja kvantitativnih metoda određivanja koncentracije NOAK lijekova na dva različita analitička sustava kako bi se procijenilo jesu li ispitivane metode prikladne za uvođenje u svakodnevni rad. Ispitivanja metoda za određivanje koncentracije dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana na analitičkim sustavima BCSXP (Siemens, Njemačka) i Compact MAX (Stago, Francuska) pokazala su zadovoljavajuće i prihvatljive kriterije ponovljivosti, unutarlaboratorijske preciznosti i linearnosti metoda. Stoga se zaključuje da su metode prikladne za uvođenje u redovnu laboratorijsku praksu. Ispitivana preciznost pokazala se nižom kod niskih koncentracija lijekova, što se može objasniti manjom preciznošću i točnošću mjerenja pri koncentracijama oko graničnih koncentracija kvantifikacije u odnosu na veće koncentracije lijeka.

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

Rad sadrži: 60 stranica, 19 grafičkih prikaza, 24 tablice i 22 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Novi oralni antikoagulansi, verifikacija, preciznost, linearnost, ponovljivost

Mentor: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Sandra Margetić, *znanstvena suradnica, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb*

Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: ožujak 2018.

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

VERIFICATION OF METHODS FOR THE DETERMINATION OF NEWER ORAL ANTICOAGULANTS: DABIGATRAN, RIVAROXABAN AND APIXABAN

Ana-Katarina Kralj

SUMMARY

New oral anticoagulants (NOACs) are drugs that have been increasingly used for the prevention and treatment of arterial and venous thrombosis in recent years. The methods for quantitative determination of concentration of NOAC drugs are just being introduced into specialized hemostasis laboratories and are currently not in routine laboratory use.

The aim of this study was to examine the key analytical characteristics of the quantitative methods for determination of NOACs on two different analytical systems in order to determine their suitability for routine laboratory use. The methods for the determination of concentration of dabigatran, rivaroxaban and apixaban on analytical systems BCSXP (Siemens, Germany) and Compact MAX (Stago, France) have met the criteria of repeatability, intralaboratory precision and linearity. Therefore, it was concluded that the methods are suitable for routine laboratory use. The determined precision was found out to be lower in the range of low drug concentrations, which can be explained by worse precision and measurement accuracy in the range of concentrations around the limit of quantification compared to higher drug concentrations.

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

Thesis includes: 60 pages, 19 figures, 24 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: New oral anticoagulants, verification, precision, linearity, repeatability

Mentor: **Nada Vrkić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Nada Vrkić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Sandra Margetić, Ph.D. Research Associate, Sestre Milosrdnice University Hospital Center, Zagreb

Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2018.