

# Utjecaj novih oralnih antikoagulacijskih lijekova na probirne pretrage hemostaze

---

**Buben, Jelena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:251227>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-05**



*Repository / Repozitorij:*

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



Jelena Buben

**Utjecaj novih oralnih antikoagulacijskih lijekova  
na probirne pretrage hemostaze**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen u Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju Kliničkog zavoda za kemiju u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice pod vodstvom doc. dr. sc. Sandre Šuprahe Gorete i 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.“

*Zahvaljujem se mentoricama doc. dr. sc. Sandri Šuprahi Goreti i dr. sc. Sandri Margetić na stručnim savjetima, podršci i strpljivosti pri izradi i pisanju diplomskog rada.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Hemostaza .....	1
1.1.1. Uloga trombocita u procesu hemostaze.....	2
1.1.2. Čimbenici hemostaze .....	3
1.1.3. Stanični model aktivacije sustava zgrušavanja.....	4
1.1.4. Fiziološki inhibitori sustava zgrušavanja .....	6
1.1.5. Fibrinolitički sustav.....	7
1.2. Probirne pretrage hemostaze .....	8
1.2.1. Protrombinsko vrijeme (PV) .....	8
1.2.2. Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) .....	10
1.2.3. Trombinsko vrijeme (TV).....	12
1.2.4. Kvantitativno određivanje fibrinogena .....	13
1.3. Antikoagulacijska terapija.....	13
1.3.1. Direktni oralni antikoagulantni lijekovi .....	15
1.3.1.1. Utjecaj direktnih oralnih antikoagulansa na probirne pretrage hemostaze .....	18
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>22</b>
3.1. Ispitanici .....	22
3.2. Uzorci .....	22
3.3. Materijali .....	23
3.4. Metode.....	24
3.4.1. Određivanje koncentracije direktnih oralnih antikoagulacijskih lijekova .....	24
3.4.1.1. Određivanje koncentracije dabigatrana .....	24
3.4.1.2. Određivanje koncentracije rivaroksabana i apiksabana .....	25
3.4.2. Određivanje probirnih pretraga hemostaze .....	25
3.4.2.1. Određivanje protrombinskog vremena (PV).....	25
3.4.2.2. Određivanje aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTV).....	26
3.4.2.3. Određivanje trombinskog vremena (TV).....	27
3.4.2.4. Kvantitativno određivanje fibrinogena.....	27
3.5. Statistička obrada podataka.....	28

<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>30</b>
4.1. Rezultati vršnih i minimalnih koncentracija DOAC lijekova dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana.....	31
4.2. Utjecaj dabigatrana na rezultate probirnih pretraga hemostaze .....	32
4.3. Utjecaj rivaroksabana na rezultate probirnih pretraga hemostaze .....	34
4.4. Utjecaj apiksabana na rezultate probirnih pretraga hemostaze .....	36
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>44</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>45</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>50</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>51</b>

## POPIS KRATICA

- ADP – adenzin difosfat
- APC – aktivirani protein C
- APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
- AT – antitrombin
- CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)
- DIK – diseminirana intravaskularna koagulacija
- DNA – deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)
- DTI – izravni inhibitori trombina (engl. *direct thrombin inhibitors*)
- DOAC – direktni oralni antikoagulansi (engl. *direct oral anticoagulants*)
- DVT – duboka venska tromboza
- Gla –  $\gamma$ -karboksiglutamat
- GP – glikoprotein
- EPCR-1 – endotelni protein C receptor
- FDP – razgradni produkti fibrina (engl. *fibrin degradation products*)
- HCII – heparinski kofaktor II (engl. *heparin cofactor II*)
- HMWK – kininogen visoke molekulske mase (engl. *high molecular weight kininogen*)
- INR – Internacionalni normalizirajući omjer (engl. *international normalized ratio*)
- IRP – Međunarodni referentni pripravak (engl. *international reference preparation*)
- IQR – interkvartilni raspon (engl. *interquartile range*)
- ISI – Međunarodni indeks osjetljivosti (engl. *international sensitivity index*)
- LA – lupus antikoagulans
- LDL – lipoprotein niske gustoće (engl. *low density lipoprotein*)
- LMWH – niskomolekularni heparin (engl. *low molecular weight heparin*)
- MNPT – srednje normalno protrombinsko vrijeme (engl. *mean normal prothrombin time*)
- NO – dušikov oksid (engl. *nitric oxide*)
- NOAC – novi oralni antikoagulansi (engl. *novel oral anticoagulants*)
- PAF – faktor koji aktivira trombocite (engl. *platelet activating factor*)
- PAR – proteazama aktivirani receptor
- PC – protein C
- PGI<sub>2</sub> – prostaglandin I<sub>2</sub>
- PE – plućna embolija

PK – prekalikrein

PPP – plazma siromašna trombocitima (engl. *platelet poor plasma*)

PS – protein S

PV – protrombinsko vrijeme

RI – referentni interval

TF – tkivni faktor (engl. *tissue factor*)

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

TM – trombomodulin

TPA – aktivator tkivnog plazminogena

TV – trombinsko vrijeme

UFH – nefrakcionirani heparin (engl. *unfractionated heparin*)

UPA – urokinazni aktivator plazminogena

VKA – antagonisti vitamina K (engl. *vitamin K antagonists*)

VTE – venska tromboembolija

VWF – von Willebrandov faktor

# 1. UVOD

## 1.1. Hemostaza

Hemostaza se definira kao zaustavljanje krvarenja, a sam izraz je izveden iz grčkog jezika pri čemu *haeme* označava krv, a *stasis* znači zaustaviti. Hemostaza je složeni proces koji započinje ozljedom krvne žile što djeluje kao pokretač niza reakcija u kojima mnoštvo vaskularnih i ekstravaskularnih čimbenika zajedničkim međudjelovanjem potiče formaciju stabilnog krvnog ugruška s ciljem sprječavanja gubitka krvi iz oštećene krvne žile te otklanjanja štete nanesene vaskulaturi i okolnom tkivu. Istodobno s formiranjem ugruška, pokreću se i inhibitori hemostaze kako bi se veličina stvorenog ugruška ograničila na mjesto ozljede. Ukratko, hemostaza omogućuje popravak oštećenja krvne žile, očuvanje krvi u tekućem stanju te uklanjanje krvnog ugruška nakon obnove vaskularnog integriteta (Palta i sur., 2014; Rogers i sur., 2018; Versteeg i sur., 2013).

U normalnim fiziološkim uvjetima, u organizmu prisutna ravnoteža sprječava i hiper- i hipokoagulabilnost cirkulirajuće krvi. Takva se dinamička ravnoteža hemostatskog sustava održava složenim interakcijama brojnih komponenata koagulacijskog i fibrinolitičkog sustava, trombocita i stijenke krvnih žila (Bombeli i Spahn, 2004). Budući da poremećaj u funkciji hemostatskog sustava može biti usmjeren, ovisno o prirodi poremećaja, prema krvarenju (hipokoagulabilna stanja) ili trombozi (hiperkoagulabilna stanja), od velikog je značaja razumjeti fiziološke osnove hemostaze kako bi se nepravilnosti u procesima zgrušavanja mogle pravovremeno dijagnosticirati, a učinjeni dijagnostički testovi pravilno interpretirati (Palta i sur., 2014).

Funkcija hemostatskog sustava dijeli se na dva osnovna dijela, sustav zgrušavanja i sustav fibrinolize, a s patofiziološkog stajališta tri su međusobno povezane faze u cjelokupnom hemostatskom sustavu: primarna hemostaza, sekundarna hemostaza i fibrinoliza. Primarna hemostaza je proces nastanka trombocitnog ugruška na mjestu ozljede krvne žile. Sekundarna hemostaza obuhvaća aktivaciju komponenata plazmatske faze zgrušavanja (faktori zgrušavanja) i stvaranje stabilnog trombocitno-fibrinskog ugruška. Fibrinolitički sustav razgrađuje fibrinski ugrušak koji je ispunio svoju zadaću i ograničava stvaranje ugruška na mjestu ozljede (Margetić i Čaržavec, 2018).



### 1.1.1. Uloga trombocita u procesu hemostaze

Trombociti su stanične komponente promjera 2  $\mu\text{m}$  bez jezgre koje nastaju u koštanoj srži iz megakariocita, a imaju ključnu ulogu u hemostazi. U normalnim uvjetima, nakon otpuštanja iz koštane srži, u krvi odraslog čovjeka kontinuirano cirkulira velik broj trombocita čija je adhezija na endotel i agregacija minimalna zahvaljujući tvarima koje otpuštaju endotelne stanice, poput prostaglandina I<sub>2</sub> i dušikovog oksida (NO), a koje na trombocite djeluju inhibicijski, kao i tvarima koje inaktiviraju trombocitne agoniste poput adenzin-difosfata (ADP) i trombina. Za trombocite u stanju mirovanja je karakterističan diskoidni oblik. U citosolu trombocita nalaze se specifične granule,  $\alpha$ -granule i guste ( $\delta$ ) granule, čiji sadržaj ima ključnu ulogu u aktivaciji trombocita. Na svojoj površini trombociti eksprimiraju brojne površinske receptore od kojih su najznačajniji glikoproteini (GP), uključujući receptor GP IIb/IIIa za fibrinogen, receptore GP Ia/IIa i GP VI čiji je ligand kolagen te receptor GP Ib/IX/V koji veže von Willebrandov faktor (VWF). Trombociti imaju i membranske receptore koji su ključni za staničnu aktivaciju, poput receptora P2Y<sub>1</sub> i P2Y<sub>12</sub> za ADP, trombinskih receptora (PAR-1 i PAR-4) i adrenergičkih receptora.

Pri disfunkciji ili oštećenju endotela krvne žile, dolazi do brze i složene interakcije između vaskularnih i ekstravaskularnih komponenti, trombocita i ostalih sastavnih dijelova sustava zgrušavanja u cirkulaciji, što podrazumijeva brzo vezanje subendotelnih proteina izvanstaničnog matriksa, poput kolagena, fibronektina i VWF, na površinske receptore trombocita, rezultirajući adhezijom trombocita na oštećeni endotel. Veliki, multimerni protein, VWF, kojeg izlučuju endotelne stanice, omogućava adheziju na subendotel vezanjem na GP Ib/IX/V, nakon čega slijedi vezanje kolagena za GP Ia/IIa i GP VI. Aktivacija trombocita putem GP VI dovodi do interakcije GP IIb/IIIa i fibrinogena te čvrstog prijanjanja na fibrinogen vezan za vaskularnu stijenu. Nakon prijanjanja na subendotel, trombociti podliježu aktivaciji vezanjem trombina i kolagena na različite receptore. Aktivacija trombocita podrazumijeva promjenu morfologije iz diskoidnog u sferični oblik s izdancima, aktivaciju unutarstaničnih signalnih putova, povećavanje citosolnog kalcija te posljedične degranulacije specifičnih citosolnih granula. Degranulacijom se oslobađa sadržaj  $\alpha$ -granula (fibrinogen, VWF) i gustih granula (ADP, serotonin, kalcij) u izvanstanični prostor. Oslobađanje autokrinih agonista, ADP-a, trombokšana A<sub>2</sub> i serotonina, dolazi do nakupljanja velikog broja trombocita te njihove aktivacije i agregacije. Oslobađanje ADP-a iz gustih granula, zajedno s mobilizacijom kalcija, dovodi do molekularne reorganizacije GP IIb/IIIa, aktivacije receptora i posljedične agregacije trombocita, pri čemu se receptor GP IIb/IIIa na

jednom trombocitu povezuje sa susjednim trombocitima preko središnjeg fibrinskog mosta. Pored ADP-a, i drugi agonisti, poput epinefrina, trombina, kolagena i faktora koji aktivira trombocite (PAF), mogu potaknuti agregaciju trombocita putem interakcije s membranskim receptorima. Aktivirani trombociti dodatno izražavaju prokoagulantnu površinu koja djeluje kao spona između primarne hemostaze i sekundarne faze aktivacije zgrušavanja.

### 1.1.2. Čimbenici hemostaze

Osnovne sastavnice hemostatskog sustava su vaskularne endotelne stanice, trombociti, komponente plazmatske faze zgrušavanja (faktori zgrušavanja i fiziološki inhibitori zgrušavanja) i komponente fibrinolitičkog sustava (aktivatori i inhibitori fibrinolize) (Margetić i Čaržavec, 2018). Proces zgrušavanja krvi obuhvaća niz enzimskih reakcija u kojima primarno sudjeluju membranski i topljivi proteini, fosfolipidi staničnih membrana i kalcijevi ioni ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Aktivacija trombocita dovodi do njihove agregacije, a istovremeno se aktivira i sustav plazmatskih proteina koji dovode do tvorbe umreženog fibrinskog ugruška sa svrhom stabilizacije agregata trombocita. Ovi su plazmatski proteini većinom enzimi iz skupine serinskih proteaza, a u plazmi su prisutni kao zimogeni koji krvlju cirkuliraju u inaktivnom obliku kako ne bi spontano potaknuli zgrušavanje. Zimogeni se selektivnom hidrolizom jedne ili više peptidnih veza prevode u aktivne proteaze koje potom aktiviraju nizvodne proenzime.

Faktori zgrušavanja se pretežno sintetiziraju u hepatocitima, uz iznimku faktora IV ( $\text{Ca}^{2+}$ ), faktora VIII koji se proizvodi u retikuloendotelnom sustavu i tkivnog faktora (engl. *tissue factor*, TF) koji je prisutan na membrani većine tjelesnih stanica. Faktori II, VII, IX i X te fiziološki inhibitori u sustavu hemostaze, protein S i protein C, u početnim dijelovima molekulske strukture sadrže aminokiselinske ostatke  $\gamma$ -karboksigliutamata (Gla) koji vežu kalcijeve ione ( $\text{Ca}^{2+}$ ), te faktorima zgrušavanja omogućuju vezanje na membranske fosfolipide trombocita. Gla nastaju posttranslacijskom modifikacijom, karboksilacijom glutamata posredovanom  $\gamma$ -glutamil transferazom za čije je djelovanje potreban kofaktor, reducirani oblik vitamina K. Vitamin K se iz epoksidnog oblika prevodi u djelatni reducirani oblik djelovanjem enzima vitamin K epoksid reduktaze, na čijoj se inhibiciji temelji antikoagulantno djelovanje varfarina. Nedostatak vitamina K dovodi do poremećaja hemostaze koje se očituje povećanom sklonošću krvarenju jer se faktori II, VII, IX i X ne mogu pravilno karboksilirati nakon završene sinteze u jetri i stoga ostaju funkcionalno neaktivni (Blanco i Blanco, 2017).

### 1.1.3. Stanični model aktivacije sustava zgrušavanja

Prvotno razumijevanje sustava hemostaze temeljilo se na kaskadnom modelu zgrušavanja koji se tradicionalno dijeli na unutarnji i vanjski put zgrušavanja, s time da oba puta zgrušavanja konvergiraju ka zajedničkom putu zgrušavanja i aktivaciji faktora X. Prema kaskadnom modelu zgrušavanja, jednom kada je proces zgrušavanja aktiviran bilo kojim od dva puta zgrušavanja, dolazi do amplifikacijske kaskade koja podrazumijeva uzastopnu aktivaciju nizvodnih faktora zgrušavanja (Davie i Ratnoff, 1964; Macfarlane, 1964). Modeli „vodopada“ i „kaskade“ bili su ključni u napretku našeg razumijevanja osnovnih principa koagulacije *in vitro* što je rezultiralo razvojem koagulacijskih pretraga bitnih za identifikaciju nedostataka u vanjskom, unutarnjem i zajedničkom putu zgrušavanja. Međutim, danas je uvaženo da je klasična teorija unutarnjeg i vanjskog puta zgrušavanja korisna samo u razumijevanju *in vitro* principa koagulacijskih testova jer ova teorija ne uzima u obzir središnju ulogu stanične površine trombocita u procesu koagulacije *in vivo* (Bombeli i Spahn, 2004).

Suvremeni “stanični model koagulacije” kojeg su 2001. godine predložili Maureane Hoffman i Dougald M. Monroe predstavlja najvjerniji prikaz koagulacije *in vivo* te je isti zamijenio kaskadni model zgrušavanja. Prema ovome modelu, proces koagulacije se ne odvija kao "kaskada", već se može podijeliti u tri faze koje se međusobno nadovezuju: fazu inicijacije, amplifikacije i propagacije. Ovaj model dodatno naglašava značaj specifičnih staničnih površina u usmjeravanju procesa koagulacije (Hoffman i Monroe, 2001).

Faza inicijacije, u kojoj dolazi do pokretanja koagulacije, započinje na subendotelnoj stanici koja nosi TF, primjerice na fibroblastima. U ovoj će se fazi, ukoliko je prokoagulantni stimulans dovoljno snažan, generirati dovoljna količina FXa, FIXa i trombina (FIIa) za uspješno pokretanje procesa koagulacije. Tijekom amplifikacijske faze se proces koagulacije premješta sa stanica koje nose TF na staničnu površinu trombocita. Ova se faza odvija na trombocitu tijekom njegove aktivacije te u ovoj fazi dolazi do akumulacije aktiviranih faktora zgrušavanja na površini trombocita. U propagacijskoj fazi se aktivne proteaze udružuju sa svojim kofaktorima na površini aktiviranih trombocita, mjestu koje je najbolje prilagođeno za stvaranje obilne količine trombina, što u konačnici rezultira polimerizacijom fibrina (Hoffman i Monroe, 2001).

Koagulacija *in vivo* započinje oštećenjem krvne žile i izlaganjem TF cirkulirajućoj krvi gdje stvara kompleks s plazmatskom serinskom proteazom FVIIa, čime započinje faza inicijacije u kojoj nastaje tek mala količina trombina. Za formiranje koagulacijskog

kompleksa TF-FVIIa nužna je prisutnost fosfolipidne stanične membrane i kalcijevih iona ( $\text{Ca}^{2+}$ ), stoga je dovođenje FVIIa i TF u neposrednu blizinu aktivirane površine trombocita ključni korak za učinkovitu inicijaciju koagulacije. Smatra se da prokoagulantnu membranu *in vivo* čine aktivirani trombociti. Osim što prilikom aktivacije trombociti mijenjaju oblik, oni na svojoj površini izlažu i anionske fosfolipide, uglavnom fosfatidilserin. Ostale stanice kao što su monociti, stanice glatkih mišića i endotelne stanice, također mogu činiti prokoagulantnu površinu. Primjerice, u aterosklerotskim plakovima, stanice glatkih mišića i endotelne stanice eksprimiraju fosfatidilserin nakon izlaganja lipoproteinu niske gustoće (LDL), stoga takvi plakovi djeluju prokoagulantno. Smatra se da je kompleks TF-FVIIa jedini fiziološki aktivator koagulacije *in vivo*.

Nastali kompleks TF-FVIIa aktivira FIX u FIXa i FX u FXa. Faktor Xa može aktivirati plazmatski FV, a nastali FXa vrlo brzo bude inhibiran djelovanjem fizioloških inhibitora hemostaze, antitrombina (AT) i inhibitora puta tkivnog faktora (engl. *tissue factor pathway inhibitor*, TFPI), ukoliko se udalji od mjesta oštećenja endotela. Međutim, FXa koji ostane na staničnoj površini može s kofaktorom FVa stvoriti vrlo malu količinu trombina (FIIa) koji ima važnu ulogu u naknadnoj aktivaciji trombocita i FVIII tijekom faze amplifikacije, dok daljnji nastanak trombina ovisi o uspješnosti faze propagacije (Hoffman i Monroe, 2001; McMichael i sur., 2012). Čini se da je uloga FVIIa u plazmi nadzor nad oštećenjem endotela. Kod neznatnih oštećenja, male količine nastalog FXa i trombina daju povratnu informaciju da je došlo do oštećenja endotelne barijere, ali se njihova aktivnost odmah limitira djelovanjem AT i TFPI kako bi se spriječilo obilno stvaranje trombina bez stvarne potrebe za time. Prokoagulantna aktivacija se nastavlja samo ukoliko je TF izložen krvi u dovoljno visokoj koncentraciji koja će prevladati inhibitorni učinak TFPI i AT (McMichael i sur., 2012).

Tijekom faze amplifikacije, mala količina trombina stvorenog u fazi inicijacije može imati široko rasprostranjene učinke na daljnji tijek koagulacije jer će tako stvoreni trombin pojačati početni prokoagulantni signal poticanjem adhezije i aktivacije trombocita kao i aktivacije faktora V, VIII i XI te će omogućiti sastavljanje prokoagulantnih kompleksa na površini trombocita. Tijekom faze amplifikacije dolazi do aktivacije trombocita adheriranih na mjesto oštećenja endotela te posljedično izlaganja prokoagulantnih membranskih fosfolipida i oslobađanja sadržaja trombocitnih granula. Vezanje za proteine matriksa, kao i lokalizacija trombocita u neposrednoj blizini TF, djelomično aktivira trombocite. Dodatno, trombin vezanjem za PAR (proteazama aktivirani receptor) na staničnoj površini djeluje kao moćan aktivator trombocita. Tijekom aktivacije, trombociti na svoju površinu oslobađaju FV

iz  $\alpha$ -granula, koji se potom trombinom ili faktorom Xa aktivira u FVa. Dio trombina veže se za druge receptore, kao što je GP Ib/IX ili pak ostaje slobodan te kao takav može aktivirati ostale faktore zgrušavanja na površini trombocita. Trombin također oslobađa FVIII iz kompleksa s VWF te ga zatim aktivira u FVIIIa koji ostaje vezan na staničnoj površini. Trombociti koji su u ovoj fazi regrutirani na mjesto oštećenja endotela osiguravaju prokoagulantnu fosfolipidnu površinu za vezanje faktora zgrušavanja potrebnih u fazi propagacije. Kada su trombociti aktivirani, a aktivirani faktori V i VIII vezani za njihovu površinu, ostvareni su preduvjeti za sastavljanje prokoagulantnih kompleksa i velike količine trombina potrebne za tvorbu ugruška (Hoffman i Monroe, 2001; McMichael i sur., 2012).

Tijekom propagacijske faze se na površini trombocita sastavljaju "tenazni" i "protrombinazni" kompleksi te se generira velika količina trombina. Nakon aktivacije FIX i FX te kofaktora FV i FVIII koji se aktiviraju malom količinom trombina nastalog u fazi inicijacije, FIXa zajedno s FVIIIa na membrani trombocita tvori tenazni kompleks. Taj se kompleks sastoji od FIXa, FVIIIa, FX i  $Ca^{2+}$ , a ima ulogu aktivacije FX i brzog stvaranja FXa. Dakle, većina fiziološki proizvedenog FXa nastaje djelovanjem tenaznog kompleksa, a ne aktivacijom od strane TF-FVIIa kompleksa te je tenazni kompleks 50 puta učinkovitiji u aktivaciji FX od TF-FVIIa kompleksa. Aktivirani FX na površini trombocita potiče nastanak protrombinaznog kompleksa koji se sastoji od FXa, FVa i  $Ca^{2+}$ , a ima ulogu aktivacije protrombina u trombin. Aktivacija ovog kompleksa rezultira eksplozivnim nastankom trombina potrebnog za stvaranje fibrinskog ugruška (Hoffman i Monroe, 2001; McMichael i sur., 2012).

#### 1.1.4. Fiziološki inhibitori sustava zgrušavanja

Osim komponenata koje sudjeluju u aktivaciji sustava zgrušavanja, u cirkulaciji se nalaze i fiziološki inhibitori zgrušavanja kojima je zadaća spriječiti spontanu aktivaciju zgrušavanja i ograničiti aktivnost sustava zgrušavanja na područje ozljede. Ključni fiziološki inhibitori zgrušavanja su AT, protein C (PC), protein S (PS) i TFPI, a svaki inhibira određeni segment u sustavu zgrušavanja. Ostali, znatno manje važni fiziološki inhibitori zgrušavanja su  $\alpha$ 2-makroglobulin, heparinski kofaktor II (engl. *heparin cofactor II*, HCII),  $\alpha$ 1-antitripsin i inhibitor C1 esteraze (Margetić i Čaržavec, 2018).

AT je glikoprotein plazme koji neutralizira uglavnom trombin (FIIa) i FXa, a u manjoj mjeri i FIXa, FXIa i FXIIa. Funkcija AT kao inhibitora zgrušavanja znatno se (do 1000 puta) povećava u prisutnosti heparina (Margetić i Čaržavec, 2018). Trombin može biti inhibiran od

strane plazmatskog AT ili se može vezati na trombomodulin (TM), receptor za trombin koji je u velikoj mjeri izražen na intaktnim endotelnim stanicama, što rezultira gubitkom prokoagulantne aktivnosti trombina. Uslijed vezanja za TM, trombinu se mijenja funkcija na način da više ne potiče stvaranje fibrina i aktivaciju trombocita, već postaje puno učinkovitiji u aktivaciji PC na endotelnoj površini (Hoffman i Monroe, 2001).

PC se lokalizira na endotelnoj površini putem endotelnog protein C receptora (EPCR-1) koji olakšava njegovu aktivaciju putem kompleksa trombin/TM. PC aktiviran trombinom i TM na endotelnim stanicama, u svom aktivnom obliku, tj. kao aktivirani PC (APC) formira kompleks s kofaktorom PS koji veže APC na površini endotelnih stanica te nastali kompleks APC/PS inaktivira sav FVa i FVIIIa na površini endotelnih stanica. Ovaj mehanizam prevenira tvorbu prokoagulantnih enzima na mjestu gdje je endotel intaktan (Hoffman i Monroe, 2001).

Dodatno, endotelne stanice inaktiviraju faktore zgrušavanja putem AT i TFPI te imaju izraženu aktivnost površinske ADP-aze (CD39) koja inaktivira ADP otpušten iz aktiviranih trombocita te posljedično inhibira agregaciju trombocita. TFPI se oslobađa iz endotelnih stanica pod utjecajem trombina stvorenog aktivacijom zgrušavanja i djeluje inhibicijski stvaranjem inaktivnog kvaternog kompleksa s TF/FVIIa/FXa (Hoffman i Monroe, 2001).

U normalnim uvjetima, vaskularne endotelne stanice su nositeljice antitrombotske aktivnosti. Međutim, njihov odgovor na ozljedu ili upalu podrazumijeva promjenu u ekspresiji receptora čime poprimaju protrombotska svojstva. Citokini koji se otpuštaju prilikom ozljede ili upale potiču endotelne stanice na smanjenje ekspresije TM te povećanu ekspresiju TF i površinskih adhezijskih molekula na staničnoj površini. Pretpostavlja se da je to adaptivni mehanizam koji pokreće hemostazu na mjestu ozljede, međutim ovaj mehanizam doprinosi nastanku tromboze u raznim stanjima, uključujući aterosklerozu, tromboflebitis i vaskulitis (Hoffman i Monroe, 2001).

#### 1.1.5. Fibrinolitički sustav

Fibrinoliza je proces neophodan za razgradnju krvnog ugruška i popravak tkiva. U fiziološkim uvjetima, aktivnost fibrinolitičkog sustava je suprimirana zbog obilne količine inhibitora fibrinolize prisutnih u cirkulaciji. Također, fibrinoliza za optimalno funkcioniranje zahtijeva prisutnost fibrina, stoga je u odsutnosti formiranog ugruška fibrinoliza inhibirana. Fibrin potiče aktivaciju plazminogena, proteina sintetiziranog u jetri koji se djelovanjem aktivatora plazminogena transformira u plazmin. Dva fiziološka aktivatora plazminogena u

sisavaca su tkivni aktivator plazminogena (TPA) i urokinazni aktivator plazminogena (UPA). Smatra se da je TPA vodeći aktivator plazminogena u vaskularnom sustavu, a UPA u ekstravaskularnom tkivu. TPA izlučuju endotelne stanice kao odgovor na različite stimulanse uključujući bradikinin, histamin, acetilkolin,  $\alpha$ -adrenergičke agense i faktor aktivacije trombocita. Enzimska aktivnost TPA je vrlo slaba u odsutnosti fibrina. UPA sintetiziraju stanice slične fibroblastima, epitelne stanice, monociti i endotelne stanice te za razliku od TPA, UPA može aktivirati plazminogen i u odsutnosti fibrina (Chapin i Hajjar, 2015; Smith, 2011).

Plazmin, ključni enzim fibronolize koji nastaje aktivacijom plazminogena, razgrađuje polimerizirani fibrinski ugrušak pri čemu nastaju fragmenti zajednički nazivani produktima razgradnje fibrinogena (engl. *fibrin degradation products*, FDP) i fibrin. Konačni razgradni produkti fibrina su fragmenti D-dimera, čija prisutnost u cirkulaciji ukazuje na razgradnju umreženog fibrinskog ugruška. Za razliku od D-dimera, ostali FDP razgradni produkti mogu potjecati od fibrinogena, fibrinskih monomera ili umreženog fibrina (Chapin i Hajjar, 2015).

## 1.2. Probirne pretrage hemostaze

Probirne (engl. *screening*) pretrage hemostaze uključuju nekoliko osnovnih pretraga koje imaju svrhu orijentacijskog ispitivanja uzroka poremećaja u određenom dijelu hemostatskog sustava. Probirni testovi za procjenu primarne hemostaze uključuju određivanje broja trombocita i/ili ispitivanje funkcije trombocita. Probirnim laboratorijskim pretragama za procjenu sekundarne hemostaze ispituje se aktivnost faktora zgrušavanja. Probirne pretrage sekundarne hemostaze uključuju protrombinsko vrijeme (PV), aktivirano parcijalno trombotično vrijeme (APTV), trombinsko vrijeme (TV) i kvantitativno određivanje fibrinogena. Patološki rezultat pojedinih probirnih pretraga usmjerava daljnju dijagnostičku obradu prema ciljanim i složenijim pretragama kojima se specifično utvrđuje uzrok poremećaja u hemostatskom sustavu (McKenzie i Williams, 2015).

### 1.2.1. Protrombinsko vrijeme (PV)

PV je probirna pretraga hemostaze koja se koristi u praćenju terapije varfarinom, oralnim antikoagulacijskim lijekom iz skupine antagonista vitamina K (VKA), te kao prvi dijagnostički korak u otkrivanju nasljednog ili stečenog nedostatka određenih faktora

zgrušavanja koji su tradicionalno poznati kao komponente vanjskog i zajedničkog puta zgrušavanja, FII, FV, FVII, FX (McKenzie i Williams, 2015).

Pretraga PV mjeri vrijeme potrebno za stvaranje fibrinskog ugruška u ispitivanom uzorku plazme siromašne trombocitima (engl. *platelet poor plasma*, PPP) nakon dodatka tromboplastina, izvora fosfolipida i TF, i kalcijevog klorida (izvor  $\text{Ca}^{2+}$ ). Dostupni su različiti komercijalni pripravci tromboplastina koji mogu biti humanog ili životinjskog podrijetla kao i pripravci dobiveni rekombinantnom DNA tehnologijom. Najčešći izvori tromboplastina su mozak kunića i rekombinantni humani tkivni faktor, a međusobno se razlikuju u osjetljivosti na manjak pojedinih faktora zgrušavanja. Različita osjetljivost pojedinih tromboplastina proizlazi iz različitosti izvora životinjskog i tkivnog tromboplastina kao i metode pripreme reagensa. Tvorba ugruška može se detektirati automatiziranim instrumentom; optičkom ili elektromehaničkom metodom (Bronić i sur., 2019; McKenzie i Williams, 2015).

Rezultati PV-a uvelike ovise o tipu korištenog reagensa i koagulometra te se stoga mogu značajno razlikovati između različitih laboratorija. Kod PV-a se koagulometrijskom metodom mjeri vrijeme u sekundama potrebno za stvaranje fibrinskog ugruška te se pomoću kalibracijske krivulje dobivene primjenom kalibracijskih plazmi rezultat prevodi i izražava mjernim jedinicama kao što su postotak aktivnosti odnosno udjel ili omjer, a u bolesnika liječenih antagonistima vitamina K kao međunarodni normalizirajući omjer (engl. *International Normalized Ratio*, INR). Vrijednost INR-a predstavlja omjer (engl. *prothrombin ratio*, PR) vrijednosti PV-a u sekundama izmjenjenog u uzorku ispitanika i srednjeg normalnog protrombinskog vremena (engl. *mean normal prothrombin time*, MNPT), uz eksponent ISI za odgovarajući tromboplastinski reagens (Bronić i sur., 2019; McKenzie i Williams, 2015; Rogers i sur., 2018).

$$INR = PR^{ISI} \quad \text{pri čemu je } PR = \frac{\text{vrijednost PV-a izmjerena u uzorku PPP pacijenta}}{MNPT}$$

MNPT označava geometrijsku sredinu vrijednosti PV-a dobivenih od najmanje 20 zdravih dobrovoljaca, a određuje se za svaki serijski broj tromboplastina koristeći istu metodu i po mogućnosti isti koagulacijski analizator koji se koriste za određivanje PV-a u uzorku pacijentove PPP. Za svaki serijski broj PV reagensa, proizvođač utvrđuje međunarodni indeks osjetljivosti (engl. *International Sensitivity Index*, ISI) čija je vrijednost odraz osjetljivosti reagensa na faktore zgrušavanja ovisne o vitaminu K u odnosu na odgovarajući međunarodni referentni standard, tzv. međunarodni referentni pripravak (engl. *International Reference Preparation*, IRP). Za određivanje PV-a, preporučuje se koristiti rekombinantne



tromboplastine koji imaju vrijednost ISI manju od 1,2 te se preporučuje koristiti i/ili odrediti vrijednost ISI-ja specifičnu za kombinaciju tromboplastina i koagulometra koja se koristi u laboratoriju (Bronić i sur., 2019; McKenzie i Williams, 2015).

Povećana INR vrijednost upućuje na predoziranje oralnim antikoagulacijskim lijekovima iz skupine VKA, a smanjena INR vrijednost upućuje na subdoziranost lijekom. PV može biti produženo zbog nasljednog ili stečenog manjka faktora zgrušavanja FII (protrombin), FV, FVII, FX i fibrinogena (FI) ili zbog prisutnosti njihovih inhibitora. Najčešći stečeni uzroci nedostatka navedenih faktora zgrušavanja su bolesti jetre (smanjena sintetska sposobnost jetre), malapsorpcija (smanjena sinteza proteina), manjak vitamina K (avitaminoza K) ili terapija antikoagulacijskim lijekovima koji djeluju kao VKA. Produljeno PV u slučaju diseminirane intravaskularne koagulacije (DIK) odraz je povećane potrošnje i smanjene sinteze faktora zgrušavanja kao i aktivacije fibrinolitičkog sustava. Produljenje PV-a javlja se i u pacijenata na trombolitičkoj terapiji zbog pojačane fibrinolize. Fiziološki snižena aktivnost PV-a javlja se u novorođenčadi, a fiziološko povećana aktivnost PV-a prisutna je u trudnoći (fiziološko hiperkoagulabilno stanje uzrokovano pojačanom sintezom faktora zgrušavanja u jetri), primjene oralnih kontraceptiva i u vegetarijanaca zbog prehrane bogate vitaminom K (zeleno lisnato povrće) (Achneck i sur., 2010; Bronić i sur., 2019; McKenzie i Williams, 2015).

### 1.2.2. Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV)

APTV je osnovni probirni test u dijagnostici koagulacijskih poremećaja uzrokovanih nedostatkom faktora zgrušavanja FVIII, FIX, FXI i FXII kao i za otkrivanje njihovih inhibitora te u svrhu praćenja terapije nefrakcioniranim heparinom (engl. *unfractionated heparin*, UFH).

APTV se mjeri koagulometrijskom metodom kojom se mjeri vrijeme potrebno za stvaranje fibrinskog ugruška u PPP nakon dodatka sastavnih dijelova APTV reagensa, odnosno površinskog aktivatora (kaolin, silicijev dioksid, elaginska kiselina), fosfolipida i kalcijevog klorida. Naziva se parcijalnim tromboplastinskim vremenom jer reagens sadrži fosfolipide različitih izvora, ali ne sadži TF. Na negativno nabijenoj površini površinskog aktivatora odvija se aktivacija kontaktnih faktora FXII i prekalikreina (PK) nužna za pokretanje unutrašnjeg puta zgrušavanja. PPP dobivena uzorkovanjem venske krvi uz citratni antikoagulans i APTV reagens se inkubiraju na 37 °C tijekom određenog vremenskog perioda (nekoliko minuta) pri čemu dolazi do aktivacije kontaktnih faktora. Zatim se kao zasebni

reagens u reakcijsku smjesu dodaje kalcijev klorid kao izvor  $\text{Ca}^{2+}$  koji je neophodan za odvijanje koagulacijske kaskade te se mjeri vrijeme u sekundama potrebno za stvaranje fibrinskog ugruška (Bronić i sur., 2019; McKenzie i Williams, 2015; Rogers i sur., 2018).

APTV se mjeri i izražava u sekundama, optičkom ili mehaničkom metodom na automatiziranim koagulometrima, a rezultat se izražava u sekundama te kao računski parametar, omjer koji predstavlja kvocijent izmjerene vrijednosti APTV-a u sekundama dobivenog u ispitivanoj PPP i srednje vrijednosti referentnog intervala (RI) APTV-a za korišteni reagens (McKenzie i Williams, 2015).

APTV odražava aktivnost FVIII, FIX, FXI i FXII te može biti produženo zbog nasljednog ili stečenog nedostatka ovih faktora zgrušavanja ili zbog prisutnosti njihovih inhibitora. Za razliku od nedostatka FVIII, FIX i FXI, manjak FXII može rezultirati izrazito produljenim APTV-om uz izostanak pojačane sklonosti krvarenju. Pretraga APTV se koristi i kao osnovna probirna pretraga u dijagnostičkom protokolu kojim se ispituje prisutnost antifosfolipinih protutijela iz skupine lupus antikoagulansa (LA). Prisutnost ovih nespecifičnih inhibitora koagulacije, također rezultira produljenjem APTV-a ukoliko se koristi prikladana metoda, odnosno na LA osjetljiv APTV reagens. APTV će biti produženo i u slučaju von Willebrandove bolesti, nasljedne bolesti karakterizirane kvantitativnim ili kvalitativnim manjkom VWF, proteina nužnog za adheziju trombocita (McKenzie i Williams, 2015; Rogers i sur., 2018).

Rezultat pretrage APTV ovisi o kombinaciji upotrebljenog reagensa i koagulacijskog analizatora. Zbog različitog sastava aktivatora i fosfolipida u sastavu reagensa, APTV reagensi pokazuju različitu osjetljivost na manjak faktora zgrušavanja, terapiju nefrakcioniranim heparinom i LA.

APTV je osnovna laboratorijska pretraga za praćenje učinkovitosti terapije nefrakcioniranim heparinom pri čemu je produljenje vremena zgrušavanja proporcionalno koncentraciji heparina u plazmi. Za razliku od UFH, niskomolekularni heparin (engl. *low molecular weight heparin*, LMWH) ne zahtijeva rutinsko laboratorijsko praćenje. Izuzetak su bolesnici sa zatajenjem bubrega, pretigli bolesnici, djeca i trudnice te bilo koji bolesnik kod kojeg je izostao očekivani antikoagulacijski učinak. S obzirom da LMWH ima pretežno aktivnost usmjerenu na FX (anti-Xa aktivnost), a ne i na ostale faktore zgrušavanja (FVIII, FIX, FXI, FXII) čija aktivnost utječe na rezultat APTV-a, APTV nije prikladna pretraga za praćenje terapije LMWH-om, već je za procjenu terapijske učinkovitosti potrebno koristiti isključivo anti-Xa pretragu kalibriranu s LMWH (Bronić i sur., 2019).

Produljeno APTV, kao što je slučaj i s PV-om, javlja se kod DIK. Uzrok lažno produljenog PV-a i APTV-a mogu biti visoki hematokrit, kontaminacija uzorka heparinom te neispravan omjer krvi i antikoagulansa u epruveti s ispitivanim uzorkom. Skraćeno PV i APTV može se javiti kao posljedica aktivacije faktora zgrušavanja u predanalitičkoj fazi ili uslijed povećane aktivnosti faktora zgrušavanja, kao što je to slučaj s trudnoćom ili upalom uslijed koje dolazi do povećanja aktivnosti FVIII kao reaktanta akutne faze. Normalno PV i produljeno APTV ukazuje na problem s unutarnjim putem zgrušavanja (faktori XI, XII, VIII, IX), dok produljeno PV i normalno APTV ukazuje na poremećaj aktivnosti jednog ili više faktora vanjskog puta zgrušavanja (FII, FV, FVII ili FX). Valja napomenuti da se nedostatak vitamina K i uznapredovala jetrena bolest mogu očitovati produljenjem i PV-a i APTV-a (McKenzie i Williams, 2015).

### 1.2.3. Trombinsko vrijeme (TV)

TV je probirna pretraga hemostaze kojom se procjenjuje pretvorba fibrinogena u fibrin te se ova pretraga koristi za procjenu na kvalitativne i kvantitativne poremećaje fibrinogena, odnosno poremećaja formacije fibrina (hipo i disfibrinogenemije). TV je produženo i u stanjima prisutnosti inhibitora trombina (FIIa) u cirkulaciji, primjerice heparina i izravnog inhibitora trombina (dabigatran).

Pretraga TV mjeri se koagulometrijski na automatiziranim koagulometrima (optički ili elektromehanički) pri čemu se uzorku PPP-a dodaje trombinski reagens (goveđi ili ljudski trombin) u suvišku te se mjeri vrijeme stvaranja ugruška u sekundama. Dodatkom velike količine egzogenog trombina, vrijeme zgrušavanja ovisi primarno o aktivnosti fibrinogena (McKenzie i Williams, 2015).

Poremećena pretvorba fibrinogena u fibrin može biti posljedica hipofibrinogenemije ili disfibrinogenemije (kvantitativnog ili kvalitativnog poremećaja fibrinogena), prisutnosti inhibitora trombina (heparina ili dabigatrana) i FDP. U rijetkim slučajevima stvorena antitijela spram goveđeg trombina (npr. inducirana lokalnom primjenom trombina ili upotrebom fibrinskog ljepila) i paraproteini također mogu ometati stvaranje fibrina i rezultirati produljenjem TV-a. Izuzetno produljeno TV obično ukazuje na prisutnost heparina u uzorku PPP-a, stoga je TV koristan za potvrdu kontaminacije uzorka heparinom. Zbog svoje preosjetljivosti već na vrlo niske koncentracije heparina u plazmi, pretraga TV nije prikladna niti standardizirana za praćenje terapije nefrakcioniranim heparinom, a LMWH obično ne produžuje TV. Produženo TV može biti i posljedica trombolitičke terapije i

hiperfibrinolitičkih stanja poput DIK-a. Skraćeno TV javlja se kao posljedica hiperfibrinogenemije (McKenzie i Williams, 2015; Rogers i sur., 2018).

#### 1.2.4. Kvantitativno određivanje fibrinogena

Referentna metoda za određivanje funkcionalne aktivnosti fibrinogena je modificirana Claussova metoda koja se temelji na dodatku trombina u suvišku razrijeđenoj plazmi ispitanika pri čemu vrijeme potrebno za stvaranje ugruška uvelike ovisi o aktivnosti fibrinogena u uzorku plazme.

Određivanje fibrinogena se izvodi koagulometrijskom metodom i mjeri u sekundama, a rezultat se izražava kao koncentracija fibrinogena (g/L) pomoću kalibracijskog postupka uz primjenu komercijalnih kalibracijskih plazmi poznatih koncentracija fibrinogena.

Vrijednosti fibrinogena snižene su kod nasljedne ili stečene hipofibrinogenemije i afibrinogenemije. Stečeni deficit fibrinogena nastaje kao rezultat intravaskularne razgradnje fibrinogena primjenom trombolitičke terapije (streptokinaza, urokinaza i TPA) ili djelovanjem nekih zmijskih otrova. Hipofibrinogenemija se javlja u stečenim poremećajima kao što je smanjena sinteza fibrinogena u akutnoj i kroničnoj bolesti jetre, pri gubitku fibrinogena u ekstravaskularni prostor (ascites, akutno krvarenje i opekline) ili u slučaju povećane razgradnje (DIK, sepsa, hiperfibrinoliza, šok, karcinom). Povećane vrijednosti fibrinogena javljaju se kao rezultat djelovanja fibrinogena kao proteina akutne faze u akutnim i kroničnim upalnim stanjima, infekcijama, nakon operativnog zahvata, traume i infarkta miokarda. Povećane vrijednosti fibrinogena javljaju se tijekom trudnoće i korištenja oralnih kontraceptiva te u djece do 10. godine života (McKenzie i Williams, 2015; Rogers i sur., 2018).

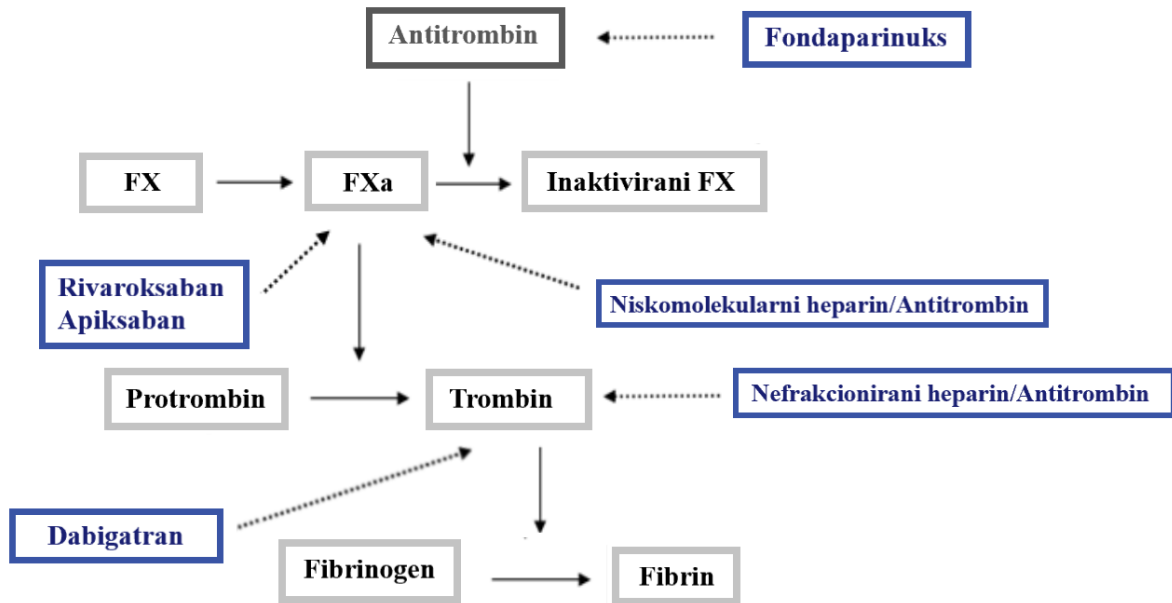
#### 1.3. Antikoagulacijska terapija

Osnovna primjena antikoagulacijske terapije je prevencija i liječenje tromboembolijskih stanja, uključujući i vensku i arterijsku trombozu (McKenzie i Williams, 2015). Ciljna mjesta djelovanja pojedinih antikoagulacijskih lijekova prikazana su na Slici 1.

U prevenciji i liječenju tromboze već se desetljećima koriste heparini. Ovi se lijekovi primjenjuju isključivo parenteralno, intravenski ili subkutano, pri tome ostvarujući brz i snažan antikoagulacijski učinak. UFH je heterogena smjesa sulfatiranih glikozaminoglikana koji nemaju direktan inhibicijski učinak na faktore zgrušavanja, već svoj antikoagulacijski

učinak postižu posredstvom AT-a, pri čemu nastali kompleks heparina i AT-a inhibira FIIa (trombin), FIX, FXI i FXII. Noviji lijekovi iz skupine heparina su LMWH koji se pripremaju kemijskom ili enzimskom depolimerizacijom UFH-a. Dok UFH katalizira AT-om posredovanu inhibiciju gore navedenih faktora zgrušavanja (trombin, FXa FXIa, FXIIa), LMWH najvećim dijelom inhibira FXa, također posredno prethodnim vezanjem na AT. Fondaparinuks je heparinu srodan lijek, sintetski pentasaharid koji oponaša djelovanje LMWH-a te također ostvaruje antikoagulacijsko djelovanje temeljem inhibicije FXa putem AT-a. Heparini i njima srodni lijekovi, smanjenjem stvaranja i/ili inaktivacijom trombina i ostalih aktiviranih faktora zgrušavanja sprječavaju trombinom posredovanu aktivaciju zgrušavanja i posljedično stvaranje fibrina te sudjeluju u razgradnji već stvorenog ugruška (Harter i sur., 2015; Weitz, 2017).

Najstariji i do danas najčešće korišteni antikoagulacijski lijekovi su oralni antikoagulansi iz skupine antagonista vitamina K (engl. *vitamin K antagonists*, VKA), po kemijskom sastavu kumarini (varfarin). Djelovanje varfarina se temelji na inhibiciji hepatičke posttranslacijske modifikacije,  $\gamma$ -karboksilacije glutaminske kiseline, u strukturi faktora zgrušavanja ovisnih o vitaminu K (FII, FVII, FIX, FX te fiziološki inhibitori zgrušavanja PC i PS) što rezultira smanjenom ili inhibiranom funkcionalnom aktivnošću navedenih faktora zgrušavanja u cirkulaciji. Početak antikoagulacijskog učinka varfarina je odgođen (3-5 dana nakon uvođenja terapije) jer je ovisan o vremenu poluživota ( $t_{1/2}$ ) već cirkulirajućih, biološki aktivnih faktora zgrušavanja ovisnih o vitaminu K. Varfarin se primjenjuje isključivo oralno, a liječenje ovim lijekom zahtijeva učestalo laboratorijsko praćenje koagulacije zbog uskog terapijskog raspona, različitog odgovora na lijek kod različitih bolesnika, kao i kod istog bolesnika, zbog utjecaja prehrane (hrana bogata vitaminom K), lijekova i genetskih čimbenika (brzina metaboliziranja lijeka). Stoga se doza varfarina prilagođava na temelju INR vrijednosti, laboratorijske pretrage koja se koristi za rutinsko praćenje antikoagulantnog učinka varfarina (Harter i sur., 2015).



Slika 1: Ciljana mjesta djelovanja različitih skupina antikoagulacijskih lijekova

### 1.3.1. Direktni oralni antikoagulantni lijekovi

Posljednjih godina, lijekove iz skupine VKA sve više zamjenjuju lijekovi potpuno nove generacije, tzv. novi oralni antikoagulantni lijekovi (engl. *new/novel oral anticoagulants*, NOAC) ili direktni oralni antikoagulansi (engl. *direct oral anticoagulents*, DOAC). Za razliku od VKA, DOAC lijekovi djeluju izravno na inhibiciju određenog aktiviranog faktora zgrušavanja u cirkulaciji te se prema mehanizmu djelovanja dijele u dvije osnovne skupine: izravni inhibitori trombina (engl. *direct thrombin inhibitors*, DTI) i izravni inhibitori aktiviranog faktora X (FXa).

Pojam NOAC je prvi puta upotrebljen za lijek dabigatran (Pradaxa<sup>®</sup>) koji djeluje kao DTI. U skupinu NOAC lijekova su kasnije uvršteni i lijekovi iz skupine izravnih inhibitora FXa: rivaroksaban (Xarelto<sup>®</sup>), apiksaban (Eliquis<sup>®</sup>) i edoksaban (Lixiana<sup>®</sup>) (How i sur., 2015). Iako je akronim NOAC u početku označavao nove oralne antikoagulanse i “ne-vitamin K antikoagulanse”, za iste je lijekove od 2015. godine, od strane ISTH (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*) u smjernicama za nomenklaturu oralnih antikoagulansa, predložen službeni naziv direktni oralni antikoagulansi ili DOAC (Barnes i sur., 2015, Kearon i sur., 2016). Pojam “direktni oralni antikoagulansi” preciznije odražava novi mehanizam djelovanja ovih lijekova, izravnim vezanjem na specifične faktore zgrušavanja (Harter i sur., 2015).

Odobrene kliničke indikacije za primjenu DOAC lijekova u Republici Hrvatskoj su: prevencija venske tromboembolije (VTE) u odraslih bolesnika koji se podvrgavaju elektivnom kirurškom zahvatu ugradnje umjetnog kuka ili koljena, prevencija moždanog udara i sistemske embolije u bolesnika s nevalvularnom fibrilacijom atriya, liječenje duboke venske tromboze (DVT) i plućne embolije (PE) i prevencija ponavljajućih DVT-a i PE-a u odraslih bolesnika, prevencija aterotrombotskih događaja u odraslih bolesnika koji imaju bolest koronarnih arterija ili simptomatsku bolest perifernih arterija s visokim rizikom od ishemijskih događaja i prevencija aterotrombotskih događaja u odraslih bolesnika nakon akutnog koronarnog sindroma s povišenim srčanim biomarkerima ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

DOAC lijekovi ostvaruju antikoagulacijski učinak ciljanom inhibicijom slobodnih i vezanih aktiviranih serinskih proteaza, FIIa ili FXa, ovisno o skupini kojoj lijek pripada. Kao i VKA, DOAC lijekovi se primjenjuju isključivo peroralno. Za razliku od VKA koje karakterizira spori početak i prestanak djelovanja, uska terapijska širina, brojne hrana – lijek i lijek – lijek interakcije te nepredvidiv farmakodinamički odgovor koji zahtijevaju rutinsko praćenje koagulacije i česte prilagodbe doze, DOAC lijekovi imaju razmjerno kratko vrijeme poluživota (8–15 sati), pa je njihov početak i prestanak djelovanja relativno brz, što olakšava primjenu lijeka. U odnosu na VKA, DOAC lijekovi imaju bolju bioraspoloživost, značajno manje interakcija s hranom i drugim lijekovima te predvidljivu farmakokinetiku i farmakodinamiku zbog čega se propisuju u fiksnim dozama bez potrebe za rutinskim praćenjem koagulacije (Mueck i sur., 2014; Bounameaux i Reber, 2010). Osnovna farmakološka svojstva pojedinih DOAC lijekova navedena su u Tablici 1.

Nakon oralne primjene, prolijek dabigatran eteksilat se *in vivo* brzo hidrolizira esterazama u crijevima, jetri i plazmi u svoj aktivni metabolit, dabigatran, koji ostvaruje antikoagulantni učinak djelujući kao kompetitivni direktni inhibitor trombina. Osim slobodnog trombina, dabigatran inhibira i trombin vezan na fibrin te agregaciju trombocita induciranu trombinom. Bioraspoloživost dabigatrana iznosi 3-7 %, a terapijski učinak se ispoljava ubrzo nakon primjene lijeka, pri čemu se vršna plazmatska koncentracija i maksimalni antikoagulacijski učinak postiže u roku od 1-3 sata nakon uzimanja lijeka. Hrana odgađa postizanje vršne koncentracije lijeka za otprilike 2 sata, ali nema utjecaja na bioraspoloživost lijeka i terapijski učinak. Vrijeme poluživota ( $t_{1/2}$ ) u zdravih ispitanika iznosi 12 - 17 sati. Dabigatran i dabigatran eteksilat se ne metaboliziraju putem sustava citokroma P450 te ga ne induciraju ili inhibiraju, stoga ne ostvaruju klinički značajne interakcije s drugim lijekovima. Dabigatran ima niski afinitet vezanja za proteine plazme (35%), stoga istiskivanje dabigatrana s proteina plazme neće značajno utjecati na njegovu farmakokinetiku

i farmakodinamiku. Lijek se najvećim dijelom (80%) izlučuje putem bubrega u nepromijenjenom obliku, stoga je za bubrežne bolesnike s klirensom kreatinina manjim od 30 mL/min potrebna prilagodba doze (van Ryn i sur., 2010; Vuga i sur., 2018).

Mehanizam djelovanja rivaroksabana temelji se na direktnoj inhibiciji slobodnog FXa kao i FXa vezanog u protrombinaznom kompleksu čime je inhibirana tvorba trombina. Rivaroksaban djeluje kao kompetitivni inhibitor FXa, a djelovanje mu je selektivno jer ima 10.000 puta veći afinitet za FXa u odnosu na druge serinske proteaze. Za razliku od indirektnih inhibitora FXa, fondaparinuksa i LMWH, rivaroksaban ne zahtijeva kofaktor AT za postizanje farmakološkog učinka. Apsorbira se vrlo brzo nakon oralne primjene te postiže vršnu plazmatsku koncentraciju nakon 2-4 sata. Lijek u dozi od 10 mg ima gotovo potpunu oralnu biorasploživost (80 - 100 %), dok u dozi od 20 mg ima biorasploživost od 66%. Primjena rivaroksabana u dozi od 15 mg i 20 mg uz hranu povećava biorasploživost lijeka. Vrijeme poluživota ( $t_{1/2}$ ) u mladih ispitanika je 5-9 sati nakon primjene, a u starijih 11-13 sati nakon primjene lijeka. Ima visok stupanj vezanja za proteine plazme (92–95 %), a veže se pretežno za albumin te je vezanje reverzibilno. Rivaroksaban se ne akumulira uslijed višestruke primjene te ne iskazuje klinički značajne interakcije s uobičajeno propisivanim lijekovima jer ne inhibira enzime sustava citokrom P450 niti transportne sustave za lijekove te ima višestruke puteve eliminacije. Otprilike trećina primjenjene doze (36 %) se izlučuje u nepromijenjenom obliku renalnim putem, a dvije trećine doze podliježu oksidativnoj biotransformaciji putem enzima sustava citokrom P450 (CYP 3A4, CYP2J2) te biotransformaciji CYP-neovisnim mehanizmima. Metaboliti rivaroksabana se izlučuju renalnim i hepatobilijarnim putem (Kreutz R, 2014; Mueck i sur., 2014).

Apiksaban, kao i rivaroksaban, djeluje mehanizmom direktne inhibicije slobodnog FXa i FXa vezanog u ugrušku. Nakon peroralne primjene postiže vršnu plazmatsku koncentraciju nakon 3-4 sata uz vrijeme poluživota ( $t_{1/2}$ ) od otprilike 12 sati. Biorasploživost apiksabana iznosi otprilike 50 % zbog nepotpune apsorpcije i metabolizma u intestinalnom sustavu i jetri, pri čemu hrana ne utječe na biorasploživost lijeka. Stupanj vezanja apiksabana za proteine plazme je 87%, pri čemu se dominantno veže za albumin. Farmakokinetika apiksabana je predvidljiva te ga karakterizira mali broj interakcija s drugim lijekovima. Otprilike 27 % apiksabana se eliminira renalnim putem, a ostatak se eliminira bilijarnom ekskrecijom ili direktnom intestinalnom ekskrecijom. Otprilike 25% primjenjene doze apiksabana se prevodi u metabolite te primarno podliježe metabolizmu putem CYP3A4 te u manjoj mjeri CYP1A2, 2C8, 2C9, 2C19 i 2J2 (Byon i sur., 2019, Douxfils i sur., 2013).



Tablica 1: Farmakološka svojstva direktnih oralnih antikoagulacijskih lijekova (*Preuzeto i prilagođeno prema Vuga i sur., 2018*)

Lijek	Dabigatran	Rivaroksaban	Apiksaban
Prolijek	Da	Ne	Ne
Mehanizam djelovanja	Direktna inhibicija FIIa (trombina)	Direktna inhibicija FXa	Direktna inhibicija FXa
Doziranje	Fiksna doza: 1 - 2 puta dnevno	Fiksna doza: 1 – 2 puta dnevno	Fiksna doza: 2 puta dnevno
Bioraspoloživost (%)	3 - 7 %	Doza od 10 mg: 80 – 100 % Doza od 15/20 mg: 66 %*	50 %
Vrijeme poluživota (sati)	12 – 17	5 - 9	12
Vrijeme vršne koncentracije (sati)	1-3	2 - 4	3 - 4
Eliminacija lijeka:			
bubregom	80 %	67 %	27 %
fecesom	20 %	33 %	73 %
Vežanje na proteine plazme (%)	35%	92 - 95 %	87 %
Uzimanje s hranom	Ne utječe na bioraspoloživost	Poboljšana bioraspoloživost za dozu od 15 mg i 20 mg	Ne utječe na bioraspoloživost

#### 1.3.1.1. Utjecaj direktnih oralnih antikoagulanasa na probirne pretrage hemostaze

Za razliku od starijih antikoagulacijskih lijekova, u prvom redu VKA, DOAC lijekovi se propisuju u fiksnim dozama, imaju brzi početak djelovanja, predvidljivu farmakokinetiku i farmakodinamiku, zbog čega je vrlo brzo nakon njihova uvođenja u kliničku praksu zavladao opće prihvaćeno mišljenje da se radi o „pametnim“ lijekovima koji ne zahtijevaju laboratorijsko praćenje. Međutim, istodobno s prvim kliničkim iskustvima u liječenju bolesnika DOAC lijekovima, postalo je jasno da je u određenim kliničkim stanjima, najčešće u sklopu hitne obrade bolesnika, potrebno procijeniti antikoagulacijski učinak DOAC lijekova, odnosno utvrditi prisutnost ili odsutnost lijeka u cirkulaciji (Tablica 2).

Tablica 2: Klinička stanja u kojima je potrebno procijeniti antikoagulacijski učinak DOAC lijekova

Klinička stanja u kojima je potrebno odrediti koncentraciju DOAC lijekova:
• prije hitnih operativnih zahvata ili invazivnih postupaka
• pri pojavi neželjenih učinaka tijekom liječenja (krvarenje ili tromboza)
• odluka o primjeni trombolitičke terapije u bolesnika s moždanim udarom
• sumnja na predoziranje lijekom
• indikacije za primjenu antidota
• bolesnici s oštećenjem bubrega (kronično zatajenje bubrega)

Budući da djeluju izravno na određeni segment hemostatskog sustava, DOAC lijekovi značajno utječu na rezultate pojedinih probirnih pretraga hemostaze uključujući PV, APTV, TV i fibrinogen, ovisno o tome kojoj skupini lijekova pripadaju (izravni inhibitori FIIa ili FXa). Stoga je, usporedno s uvođenjem DOAC lijekova u kliničku praksu, ispitivan i utjecaj ovih lijekova na pretrage hemostaze. Osjetljivost različitih komercijalnih reagensa za određenu probirnu pretragu može se značajno razlikovati. Pojedini DOAC lijekovi produljuju PV i APTV na način ovisan o koncentraciji i reagensu, a osjetljivost različitih reagensa je izrazito varijabilna, kako na pojedinačni lijek, tako i na različite lijekove iz skupine DOAC-lijekova (Gemen i sur., 2014; Turkoglu i sur., 2015; Van Blerk i sur., 2015; van Ryn i sur., 2010). Razlog različite osjetljivosti reagensa za određivanje PV-a i APTV-a proizlazi iz različitog sastava reagensa. Primjerice, ispitivanja su pokazala da će se osjetljivost PV-a na rivaroksaban povećati smanjenjem koncentracije tkivnog faktora ili povećanjem koncentracije fosfolipida u reagensu, s time da povećanje udjela fosfatidilserina općenito smanjuje osjetljivost na rivaroksaban, a fosfatidiletanolamin povećava osjetljivost na rivaroksaban. S druge strane, reagensi za APTV se razlikuju po tipu kontaktnog aktivatora (npr. elaginska kiselina, kaolin ili silika gel) te prema izvoru fosfolipida (npr. cefalin u mozgu kunića, fosfolipidi soje ili sintetske fosfolipidne smjese), ukupnoj koncentraciji fosfolipida i relativnom udjelu pojedine fosfolipidne komponente (fosfatidilserin, fosfatidilinozitol, fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin) (Van Blerk i sur., 2015).

Rezultati dosadašnjih ispitivanja upućuju da probirne pretrage hemostaze, s obzirom da nisu standardizirane za procjenu antikoagulacijskog učinka DOAC lijekova, nisu prikladne za procjenu antikoagulantnog učinka DOAC lijekova (Van Blerk i sur., 2015). S druge strane, iako su probirne pretrage hemostaze (PV, APTV, fibrinogen i TV) neadekvatne za procjenu antikoagulantnog učinka u bolesnika liječenih DOAC lijekovima, od izuzetne je važnosti poznavati utjecaj ovih lijekova na rezultate tih probirnih pretraga, u prvom redu zbog pravilne interpretacije rezultata (Gemen i sur., 2014; Turkoglu, 2015). Nadalje, važno je imati na umu da je zbog kratkog vremena poluživota DOAC lijekova u cirkulaciji, utjecaj na rezultate probirnih pretraga različit, odnosno ovisan o vremenu uzorkovanja u odnosu na vrijeme primjene posljednje doze lijeka.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Iako je u kliničkoj primjeni svih DOAC lijekova uvedenih u kliničku praksu opće prihvaćeno da ovi lijekovi ne zahtijevaju rutinsko laboratorijsko praćenje pretragama hemostaze, navedeni lijekovi ipak imaju značajan utjecaj na rezultate probirnih i specijalističkih koagulacijskih pretraga. Procjena učinka DOAC lijekova na rezultate koagulacijskih testova predstavlja izazov za većinu kliničkih laboratorija.

Cilj provedenog istraživanja bio je ispitati utjecaj pojedinih DOAC lijekova, dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana na rezultate probirnih pretraga hemostaze PV, APTV, TV i fibrinogen.

Specifični ciljevi rada su:

1. Određivanje vršnih i minimalnih koncentracija DOAC lijekova: dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana u plazmi bolesnika liječenih DOAC lijekovima
2. Ispitivanje utjecaja vršnih i minimalnih koncentracija sva tri DOAC lijeka na rezultate probirnih pretraga hemostaze (PV, APTV, fibrinogen i TV)

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

U ispitivanje je bilo uključeno 127 uzoraka bolesnika liječenih dabigatranom, 147 uzoraka bolesnika liječenih rivaroksabanom i 81 uzorak bolesnika liječenih apiksabanom. Svakom bolesniku zabilježeni su odgovarajući anamnestički podaci: dob, dijagnoza i korištena doza lijeka. Uzorci ispitanika analizirani su u Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju Kliničkog zavoda za kemiju, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Cjelokupna laboratorijska dijagnostika, uključujući određivanje koncentracije DOAC lijekova i probirne pretrage hemostaze; protrombinsko vrijeme (PV), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV), trombinsko vrijeme (TV) i kvantitativno određivanje fibrinogena, učinjeno je u sklopu istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-2016-06-8208 pod nazivom „Novi oralni antikoagulansi: ispitivanje povezanosti koncentracije lijeka i antikoagulantnog učinka“.

Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom. Svi bolesnici uključeni u istraživanje potpisali su informirani pristanak odobren od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice.

#### 3.2. Uzorci

U svrhu određivanja koncentracije DOAC lijekova i probirnih pretraga PV, APTV, TV i fibrinogena, bolesnicima su uzorkovane dvije epruvete venske krvi (Vacutainer, Becton Dickinson). Korištene su epruvete s plavim čepom koje se koriste za sve koagulacijske pretrage, a sadrže antikoagulans 3,2 %-tni (109 mM) natrijev-citrat. Analitički uzorak za sve navedene pretrage je plazma siromašna trombocitima (PPP, engl. *platelet poor plasma*), dobivena centrifugiranjem uzorka pune venske krvi pri 2000g u trajanju od 10 min. Nakon centrifugiranja, u svim uzorcima je određena koncentracija odgovarajućeg DOAC lijeka i probirne pretrage PV, APTV, TV i fibrinogen.

Uzorkovanje krvi u svrhu određivanja koncentracije sva tri DOAC lijeka te probirnih pretraga hemostaze PV, APTV, TV i fibrinogena učinjeno je kod svih bolesnika neposredno prije slijedeće doze lijeka (minimalna koncentracija lijeka, MIK) te dva sata nakon primjene lijeka (vršna koncentracija lijeka ili VRK).

### 3.3. Materijali

*Innovance*<sup>®</sup> *DTI* komercijalni reagens kit  
(Siemens Healthineers, Njemačka)

Dabigatran komercijalni kalibratori  
(Siemens Healthineers, Njemačka)

Dabigatran komercijalni kontrolni uzorci  
(Siemens Healthineers, Njemačka)

*Innovance*<sup>®</sup> *anti-FXa* komercijalni reagens kit  
(Siemens Healthineers, Njemačka)

Rivaroksaban komercijalni kalibratori  
(Hyphen BioMed, Francuska)

Apiksaban komercijalni kalibratori  
(Hyphen BioMed, Francuska)

Rivaroksaban komercijalni kontrolni uzorci  
(Hyphen BioMed, Francuska)

Apiksaban komercijalni kontrolni uzorci  
(Hyphen BioMed, Francuska)

*Dade Innovin*<sup>®</sup> komercijalni reagens, PV probirni test  
(Siemens Healthineers, Njemačka)

PT-Multi Calibrator 1 – 6  
(Siemens Healthineers, Njemačka)

*Dade Actin*<sup>®</sup> FS  
(Siemens Healthineers, Njemačka)

Otopina kalcijeva klorida (CaCl<sub>2</sub>) 0,025 mol/L  
(Siemens Healthineers, Njemačka)

*BC Thrombin*  
(Siemens Healthineers, Njemačka)

*Multifibren U*  
(Siemens Healthineers, Njemačka)

*Fibrinogen Calibrator kit 1-6*  
(Siemens Healthineers, Njemačka).

Komercijalna kontrolna plazma N za pretrage PV, APTV, TV i fibrinogen  
(Siemens Healthineers, Njemačka)

Komercijalna kontrolna plazma P za pretrage PV, APTV, TV i fibrinogen  
(Siemens Healthineers, Njemačka)

BCS reakcijske kivete, Behring Coagulation System  
(Siemens Healthineers, Njemačka)

### 3.4. Metode

#### 3.4.1. Određivanje koncentracije direktnih oralnih antikoagulacijskih lijekova

Koncentracije sva tri DOAC lijeka (dabigatran, rivaroksaban i apiksaban) određene su na automatiziranom analitičkom sustavu Behring Coagulation System XP (*BCS XP*, Siemens Healthineers, Njemačka). Analizator *BCS XP* je optički automatizirani koagulometar koji određuje pretrage hemostaze koagulometrijskim, kromogenim i imunokemijskim metodama. 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.

Za centrifugiranje pune krvi u svrhu dobivanja analitičkog uzorka PPP-a korištena je centrifuga Hettich Universal 320R (Hettich, Njemačka).

##### 3.4.1.1. Određivanje koncentracije dabigatrana

Koncentracija DTI dabigatrana određena je upotrebom *Innovance<sup>®</sup>DTI* komercijalnog testa (Siemens Healthineers, Njemačka) koji omogućuje kvantitativno određivanje dabigatrana kromogenom metodom u humanoj citratnoj plazmi uz mjerni raspon koncentracije lijeka do 500 ng/mL. Načelo metode temelji se na dodatku trombinskog reagensa u suvišku uzorku PPP. Ukoliko je u ispitivanoj plazmi prisutan lijek dabigatran, dio trombinskog reagensa se inaktivira, a višak neinhibiranog trombina (ostatni ili rezidualni trombin) se potom određuje uz dodatak specifičnog kromogenog supstrata, te se nastala promjena obojenja mjeri spektrofotometrijski na 405 nm. Porast apsorbanacije razmjernan je količini nastalog obojenog produkta i obrnuto razmjernan koncentraciji lijeka u uzorku PPP-a.

Komercijalni *Innovance<sup>®</sup>DTI* test je višekomponentni te se sastoji od sljedećih sastavnica: *Innovance<sup>®</sup>DTI* reagens, *Innovance<sup>®</sup>DTI* diluent i *Innovance<sup>®</sup>DTI* supstrat. Reagens se za analizu priprema otapanjem liofiliziranog *Innovance<sup>®</sup>DTI* reagensa u 5 mL *Innovance<sup>®</sup>DTI* diluenta. *Innovance<sup>®</sup>DTI* supstrat je u tekućem obliku i spreman za uporabu.

Reagens i supstrat se mogu koristiti neposredno nakon pripreme, a stabilni su tijekom 8 tjedana na temperaturi hladnjaka (2-8°C).

#### 3.4.1.2. Određivanje koncentracije rivaroksabana i apiksabana

Koncentracije izravnih inhibitora faktora Xa, rivaroksabana i apiksabana, određene su uporabom *Innovance*<sup>®</sup> anti-FXa komercijalnog testa (*Innovance* heparin, Siemens Healthineers, Njemačka) uz kalibracijske plazme specifične za pojedini lijek (rivaroksaban kalibratori i apiksaban kalibratori, Hyphen BioMed, Francuska). Načelo metode temelji se na kromogenoj metodi mjerenja pri čemu se uzorku plazme ispitanika dodaje reagens koji sadrži poznatu količinu FXa. Prisutnost lijeka rivaroksabana, odnosno apiksabana u ispitivanoj plazmi rezultira inhibicijom aktivnosti FXa, a preostala količina neinhibiranog FXa određuje se dodatkom specifičnog kromogenog supstrata pri čemu nastaje produkt p-nitroanalin (p-NA), koji se određuje spektrofotometrijski na 405 nm. Količina nastalog p-NA obrnuto je razmjerna koncentraciji lijeka u ispitivanom uzorku.

*Innovance*<sup>®</sup> heparin anti-FXa je dvokomponentni reagens koji se sastoji od reagensa FXa i kromogenog supstrata koji sadrži p-NA. Obje sastavnice reagensa su u tekućem obliku i spremne za uporabu nakon otvaranja originalnog pakiranja reagensa, a stabilne su 8 tjedana na temperaturi hladnjaka (2-8°C).

#### 3.4.2. Određivanje probirnih pretraga hemostaze

##### 3.4.2.1. Određivanje protrombinskog vremena (PV)

Pretraga PV je određena primjenom *Dade Innovin*<sup>®</sup> komercijalnog reagensa (Siemens Healthineers, Njemačka) koji sadrži tromboplastin, pročišćeni rekombinantni humani TF u smjesi sa sintetskim fosfolipidima i kalcijevim ionima. Za kalibraciju pretrage korišten je *PT-Multi Calibrator*<sup>®</sup> (*Siemens Healthineers*, Njemačka). Kalibracija pretrage je provedena prilikom uvođenja novog serijskog broja (lot) *Dade Innovin*<sup>®</sup> reagensa. Načelo mjerenja temelji se na koagulometrijskoj metodi pri čemu se nakon inkubacije PPP s optimalnom količinom tkivnog tromboplastina i kalcijevih iona pokreće vanjski put zgrušavanja, te se turbidimetrijski pri 405 nm mjeri vrijeme potrebno za stvaranje fibrinskog ugruška. Vrijeme zgrušavanja se mjeri u sekundama, te se temeljem kalibracijske krivulje dobivene primjenom kalibracijskih plazmi poznatih vrijednosti PV-a i INR-a prevodi u mjerne jedinice u kojima se



izražava rezultat, a to su postotak aktivnosti (% aktivnosti) i INR (za bolesnike na antikoagulacijskoj terapiji VKA). Brzina stvaranja ugruška je izravno razmjerna aktivnosti PV-a u uzorku plazme.

*Dade® Innovin* reagens je jednokomponentan, a priprema se otapanjem liofiliziranog oblika reagensa u 10 mL destilirane vode. Pripremljeni reagens se ostavlja 15 minuta na sobnoj temperaturi prije upotrebe. Nakon otapanja, reagens se stavlja u analizator na nosač za reagense koji se hladi pri temperaturi od 15°C. Pripremljeni reagens je stabilan 24 sata na 37 °C, 5 dana na 15–25 °C i 10 dana na 2-8 °C.

Za kontrolu dobivenih vrijednosti PV-a korištene su komercijalna kontrolna plazma N s vrijednostima koagulacijskih parametara unutar RI (Siemens Healthineers, Njemačka) i komercijalna kontrolna plazma P s patološkim vrijednostima koagulacijskih parametara (Siemens Healthineers, Njemačka).

#### 3.4.2.2. Određivanje aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTV)

Pretraga APTV je određena korištenjem *Dade Actin® FS* komercijalnog reagensa (Siemens Healthineers, Njemačka) koji sadrži smjesu pročišćenih fosfolipida iz soje i kontaktnog aktivatora (elaginska kiselina), a kao zaseban reagens koristi se otopina kalcijeva klorida u koncentraciji od 0,025 mol/L.

Načelo metode temelji se na koagulometrijskoj metodi mjerenja pri čemu se inkubacijom plazme s optimalnom količinom fosfolipida i površinskog aktivatora (elaginska kiselina) sadržanim u *Dade Actin® FS* reagensu te uz naknadni dodatak kalcijevih iona ( $\text{CaCl}_2$ ) pokreće aktivacija faktora unutarnjeg puta zgrušavanja što rezultira pretvorbom fibrinogena u fibrin. Vrijeme (u sekundama) potrebno za stvaranje fibrinskog ugruška mjeri se turbidimetrijski pri 405 nm. Rezultat se izražava u sekundama te kao APTV omjer, računski parametar dobiven kao kvocijent APTV-a izmjenjenog u sekundama u plazmi ispitanika i srednje vrijednosti RI APTV-a za korišteni reagens.

Reagens za određivanje APTV-a je dvokomponentan pri čemu su korišteni *Dade Actin® FS* (10 mL) i otopina kalcijeva klorida 0,025 mol/L. *Dade Actin® FS* reagens se prije upotrebe izvadi iz hladnjaka, te ostavi 15 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je spreman za uporabu. Reagens se stavlja u analizator na nosač za reagense koji se hladi te je nakon otvaranja stabilan 7 dana na temperaturi od 2-15 °C. Otopina kalcijeva klorida (0,025 mol/L) se prije upotrebe ostavlja na sobnoj temperaturi 15 minuta. Reagens se stavlja u

analizator na nosač za reagense koji se hladi te je nakon otvaranja stabilan 8 tjedana na temperaturi od 2-25 °C.

Za kontrolu dobivenih vrijednosti APTV-a korištene su komercijalna kontrolna plazma N s vrijednostima koagulacijskih parametara unutar RI (Siemens Healthineers, Njemačka) i komercijalna kontrolna plazma P s patološkim vrijednostima koagulacijskih parametara (Siemens Healthineers, Njemačka).

#### 3.4.2.3. Određivanje trombinskog vremena (TV)

Određivanje TV-a učinjeno je primjenom komercijalnog reagensa *BC Thrombin* (Siemens Healthineers, Njemačka) koji sadrži goveđi trombin. Načelo mjerenja temelji se na koagulometrijskoj metodi pri čemu trombin iz reagensa prevodi fibrinogen u fibrin te se turbidimetrijski pri 405 nm mjeri vrijeme potrebno za stvaranje fibrinskog ugruška u plazmi. Rezultat mjerenja izražava se izravno u sekundama.

Reagens za određivanje TV-a se u originalnom pakiranju sastoji od liofiliziranog oblika reagensa i puferske otopine za reagens. Reagens se priprema otapanjem liofilizata u 5 mL puferske otopine. Nakon otapanja, reagens se stavlja u analizator na nosač za reagense koji se hladi. Pripremljeni reagens je stabilan 8 sati na 37 °C, 48 sati na 15 °C i 7 dana na 2–8 °C.

Za kontrolu dobivenih vrijednosti TV-a korištena je komercijalna kontrolna plazma N s vrijednostima koagulacijskih parametara unutar RI (Siemens Healthineers, Njemačka).

#### 3.4.2.4. Kvantitativno određivanje fibrinogena

Za određivanje fibrinogena korišten je komercijalni reagens *Multifibren* (Siemens Healthineers, Njemačka) koji sadrži goveđi trombin i kalcijev klorid. Načelo mjerenja temelji se na koagulometrijskoj metodi (po Claussu), pri čemu se uzorku plazme ispitanika dodaje trombinski reagens u suvišku što dovodi do pretvorbe fibrinogena u fibrin i tvorbe fibrinskog ugruška. Mjeri se vrijeme zgrušavanja u sekundama pri čemu vrijeme potrebno za stvaranje ugruška ovisi o aktivnosti fibrinogena u uzorku, te je brzina stvaranja ugruška razmjerna aktivnosti fibrinogena u plazmi. Analizator automatski preračunava izmjereno vrijeme u koncentraciju (g/L) na temelju kalibracijske krivulje dobivene primjenom komercijalnih kalibracijskih plazmi poznatih vrijednosti fibrinogena. U svrhu kalibracije je korišten *Fibrinogen Calibrator kit 1-6* (Siemens Healthineers, Njemačka).

Reagens *Multifibren* za kvantitativno određivanje fibrinogena je jednokomponentan, a priprema se otapanjem liofilizata u 5 mL destilirane vode. Nakon otapanja, reagens se ostavlja na sobnoj temperaturi 15-30 minuta prije stavljanja u analizator na nosač za reagense koji se hladi. Pripremljeni reagens je stabilan 8 sati na 37 °C, 24 sata na 15-25 °C i 5 dana na 2–8 °C i dva mjeseca zamrznut na  $\leq 20$  °C.

Za kontrolu dobivenih vrijednosti fibrinogena korištene su komercijalna kontrolna plazma N s vrijednostima koagulacijskih parametara unutar RI (Siemens Healthineers, Njemačka) i komercijalna kontrolna plazma P s patološkim vrijednostima koagulacijskih parametara (Siemens Healthineers, Njemačka).

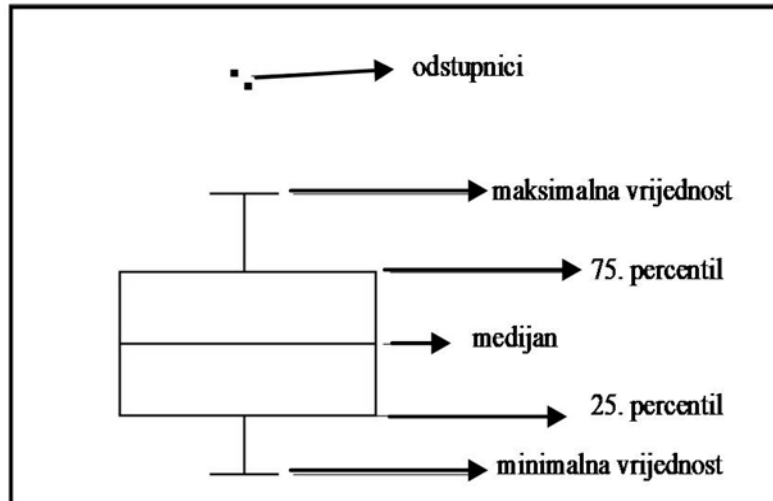
### 3.5. Statistička obrada podataka

Pohrana podataka kao i njihova priprema za statističku obradu načinjena je u programu Excel 2010, u sklopu Microsoft Office programskog paketa (Microsoft Corporation, Redmond, Washington). Statistička obrada podataka učinjena je u statističkom programskom paketu Med Calc 11.5.1. za Windows (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

Svi su rezultati ispitani korištenjem deskriptivne (opisne) analize koja je pokazala osnovne značajke varijabli: srednju vrijednost, standardnu devijaciju (SD), medijan uz 95% -tni interval pouzdanosti (95% CI) i interkvartilni raspon između prvog i trećeg kvartila (IQR, Q1-Q3).

Statistička značajnost razlike između skupina brojčanih podataka testirana je studentovim t-testom za podatke s normalnom raspodjelom, odnosno neparametrijskim Mann-Whitneyevim testom između dvije skupine podatakačija je raspodjela bila asimetrična. Vrijednost  $p < 0,050$  smatrana je statistički značajnom.

Podatci koji opisuju izmjerene vrijednosti grafički su prikazane grafikonom okvira s ručicama (engl. *Box and Whisker*), kako je prikazano na Slici 2. Ucertani pravokutnik na grafikonu označava izmjerene vrijednosti između 25. i 75. percentila (interkvartilni raspon Q1-Q3), crta unutar pravokutnika označava medijan, a pripadajuće ručice minimalnu i maksimalnu izmjerenu vrijednost za određenu skupinu brojčanih podataka. Točka izvan pravokutnika s ručicama označava vrijednost koja odstupa ili tzv. odstupnik (engl. *outlier*).



Slika 2. Prikaz grafikona okvira s ručicama (engl. *Box and Whisker*)

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom diplomskom radu je sudjelovalo 56 bolesnika liječenih rivaroksabanom, 42 bolesnika liječena dabigatranom i 24 bolesnika liječena apiksabanom Klinike za neurologiju, Klinike za bolesti srca i krvnih žila i Klinike za traumatologiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Od ukupno 24 ispitanika liječena apiksabanom, 13 bolesnika je liječeno na Klinici za neurologiju i 11 bolesnika na Klinici za bolesti srca i krvnih žila. Od 56 ispitanika liječenih rivaroksabanom, 35 bolesnika liječeno je na Klinici za traumatologiju, 16 bolesnika na Klinici za bolesti srca i krvnih žila i 5 bolesnika na Klinici za neurologiju. Od ukupno 42 ispitanika liječena dabigatranom, 17 bolesnika je liječeno na Klinici za traumatologiju, 11 na Klinici za bolesti srca i krvnih žila i 14 bolesnika na Klinici za neurologiju. Za sve bolesnike uključene u istraživanje, uzorci su prikupljeni višekratno (navedeno u odjeljku Materijali i metode podnaslov Uzorci) te su analizirana ukupno 294 uzorka bolesnika liječenih rivaroksabanom, 248 uzorka bolesnika liječenih dabigatranom i 162 uzorka bolesnika liječenih apiksabanom (Tablica 3). Svi bolesnici liječeni su standardnim dozama DOAC lijekova (dabigatran 2x150 ili 2x110 mg/dan; rivaroksaban 1x20 ili 1x15 mg/dan i apiksaban 2x5 mg/dan).

Svakom bolesniku zabilježeni su klinički podatci, uključujući životnu dob, osobnu anamnezu i terapiju. Ukupan broj bolesnika i analiziranih uzoraka te spol i životna dob ispitanika liječenih DOAC lijekovima dabigatranom, apiksabanom i rivaroksabanom uključenih u provedeno istraživanje navedeni su u Tablici 3.

U svim ispitivanim uzorcima određena je koncentracija DOAC lijeka, te probirne pretrage hemostaze PV % aktivnosti, INR, APTV (s), APTV-omjer, TV i fibrinogen. Za sve ispitanike uzorci venske krvi za navedene pretrage uzeti su 2 sata nakon primjene lijeka što odgovara vremenu vršne koncentracije lijeka (VRK) te neposredno prije sljedeće doze lijeka, odnosno u vrijeme minimalne koncentracije lijeka (MIK). Tako je od ukupno 248 uzoraka bolesnika liječenih dabigatranom, 124 uzorka odgovaralo VRK-u, a preostala 124 uzorka MIK-u dabigatrana. Od ukupnog broja obrađenih uzoraka bolesnika liječenih apiksabanom, po 81 uzorak odnosio se na VRK i MIK za lijek apiksaban. Nadalje, obrađeno je 294 uzorka pacijenata liječenih rivaroksabanom, od čega je 147 uzorak sadržao VRK lijeka, a 147 uzorak se odnosio na MIK rivaroksabana.

Tablica 3: Ukupan broj bolesnika i analiziranih uzoraka, životna dob i spol ispitanika liječenih DOAC lijekovima dabigatranom, apiksabanom i rivaroksabanom.

DOAC lijek	Ukupan broj analiziranih uzoraka	Ukupan broj ispitanika	Ukupan broj (udio) ženskih ispitanika	Ukupan broj (udio) muških ispitanika	Životna dob	
					muškarci	žene
Dabigatran	248	42	28 (0,67)	14 (0,33)	69 (48 – 80)	78 (58 – 90)
Apiksaban	162	24	12 (0,50)	12 (0,50)	70 (47 – 84)	76 (48 – 89)
Rivaroksaban	294	56	27 (0,48)	29 (0,52)	70 (31 – 85)	72 (36 – 83)

#### 4.1. Rezultati vršnih i minimalnih koncentracija DOAC lijekova dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana

U Tablici 4 i na Slici 3 prikazane su VRK i MIK ispitivanih DOAC lijekova. Za sva tri ispitivana DOAC lijeka vršne koncentracije su bile statistički značajno veće u odnosu na minimalne koncentracije istog lijeka ( $P < 0,001$ ).

Tablica 4: Vršne i minimalne koncentracije DOAC lijekova dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana.

Lijek	P*	Srednja vr. $\pm$ SD	Medijan (95% CI) IQR	P**	P***
Dabigatran VRK (ng/mL)	0,134	167 $\pm$ 112	/	< 0,001	VRK API-DABI = 0,066 API-RIVA = 0,901 DABI-RIVA = 0,058
Dabigatran MIK (ng/mL)	0,002	/	59 (48 - 69) 25 - 116		
Rivaroksaban VRK (ng/mL)	0,098	182 $\pm$ 86	/	< 0,001	MIK API-DABI = 0,001 API RIVA <0,001 DABI-RIVA <0,001
Rivaroksaban MIK (ng/mL)	<0,001	/	15 (13 - 16) 9 - 29		
Apiksaban VRK (ng/mL)	0,703	177 $\pm$ 75	/	< 0,001	
Apiksaban MIK (ng/mL)	0,529	101 $\pm$ 52	/		

\*Normalnost raspodjele ispitana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom (vrijednost  $P < 0,05$  označava normalnu raspodjelu podataka)

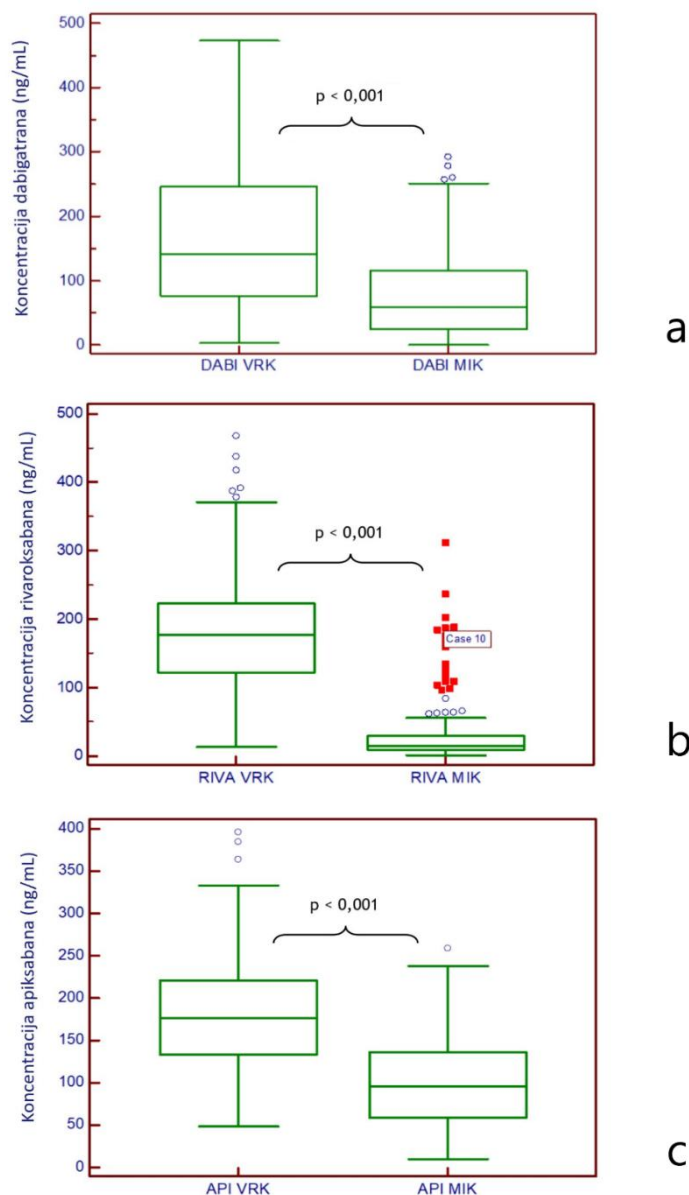
\*\*Statistička značajnost razlike između vršne i minimalne koncentracije istog DOAC lijeka

\*\*\*Statistička značajnost razlike između vršnih koncentracija različitih DOAC lijekova te između minimalnih koncentracija različitih DOAC lijekova

Podaci koji slijede normalnu raspodjelu prikazani su srednjom vrijednošću i standardnom devijacijom, a podaci koji slijede asimetričnu raspodjelu opisani su medijanom uz 95%-tni interval pouzdanosti (95% CI) i interkvartilni raspon (IQR)

VRK = vršna koncentracija; MIK = minimalna koncentracija; SD = standardna devijacija

VRK pojedinih DOAC lijekova nisu se statistički značajno razlikovale ( $P > 0,05$ ). MIK lijeka bile su značajno veće za lijek apiksaban u odnosu na dabigatran i rivaroksaban ( $P < 0,001$  i  $P = 0,001$ ), a MIK dabigatrana bile su značajno veće u odnosu na rivaroksaban ( $P < 0,001$ ).



Slika 3: Grafički prikaz VRK i MIK DOAC lijekova dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana

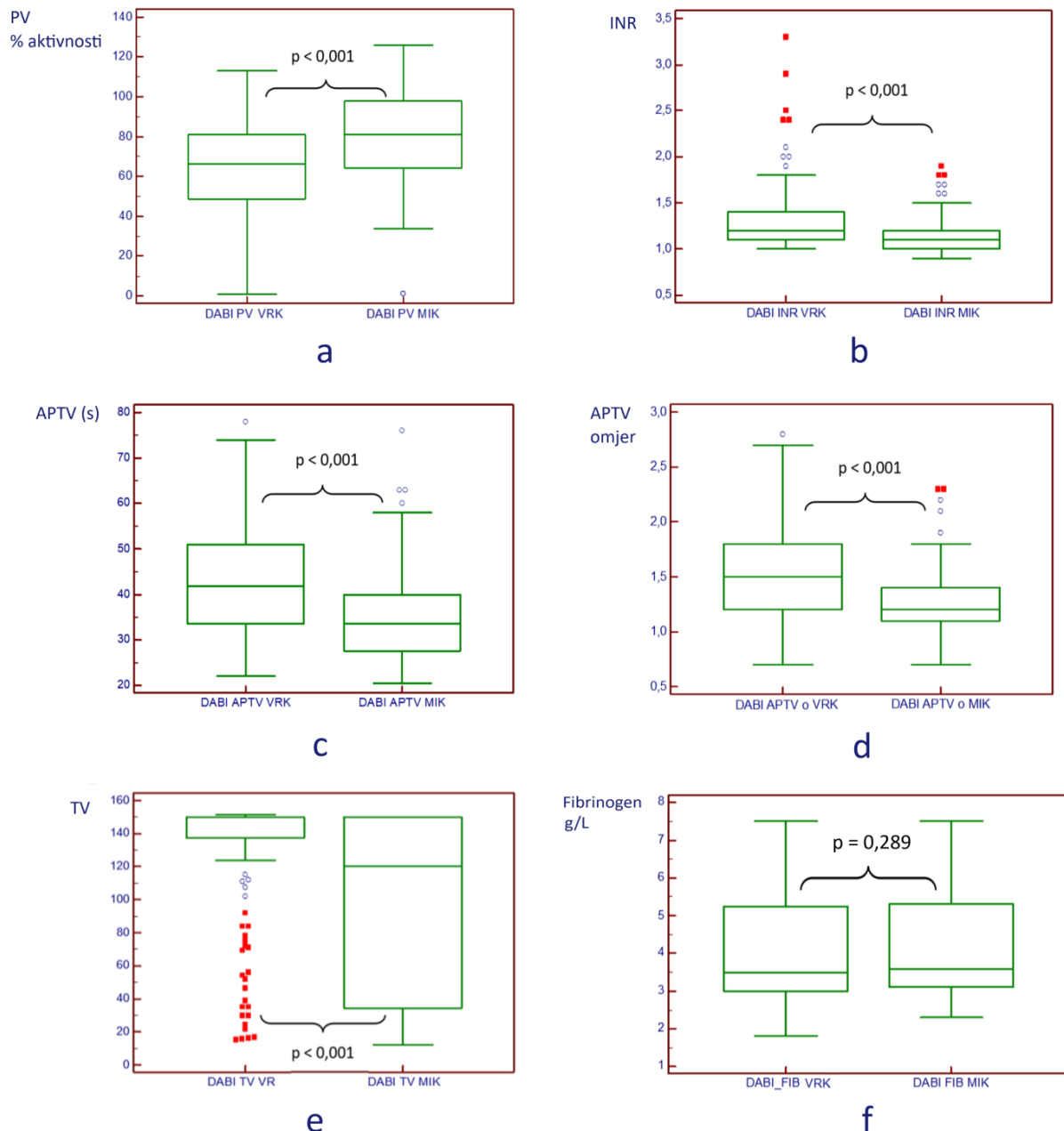
#### 4.2. Utjecaj dabigatrana na rezultate probirnih pretraga hemostaze

Rezultati provedenog ispitivanja pokazali su da dabigatran statistički značajno utječe ( $p < 0,001$ ) na vrijednosti PV % aktivnosti, PV INR-a, APTV-a i TV-a, a nema utjecaja na rezultat fibrinogena ( $p = 0,289$ ). Nadalje, dobiveni rezultati pretrage PV % aktivnosti i INR-a

pokazuju da se utjecaj dabigatrana statistički značajno razlikuje ( $p < 0,001$ ) kod VRK-a i MIK-a lijeka, pri čemu je utjecaj dabigatrana na PV značajno veći kod VRK-a lijeka u odnosu na MIK lijeka ( $p < 0,001$ ). Kod MIK-a dabigatrana, PV % aktivnosti je unutar RI ( $\geq 70\%$ ), dok je kod VRK-a dabigatrana vrijednost PV-a ispod donje granice RI (Tablica 5).

U slučaju APTV-a, i VRK i MIK značajno utječu na rezultat pretrage te uzrokuju produljenje APTV-a (referentni interval iznosi 23 – 32 s), ali se u slučaju ove pretrage utjecaj MIK i VRK lijeka statistički značajno razlikuje ( $p < 0,001$ ), pri čemu je APTV značajno više produženo kod VRK-a u odnosu na MIK lijeka. U slučaju APTV omjera, dobivene vrijednosti za MIK su unutar RI (0,8 – 1,2), dok su pri VRK dobivene statistički značajno veće vrijednosti. Lijek dabigatran ima snažan utjecaj na rezultat pretrage TV, pri čemu i MIK i VRK lijeka značajno produžuju TV, iako i u ovom slučaju postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) ovisno o koncentraciji lijeka u cirkulaciji. Od ukupnog broja ispitanih uzoraka s VRK-om dabigatrana ( $n=124$ ), 90 uzoraka (73%) je imalo nemjerljiv rezultat TV-a ( $>150$  s). Kod MIK-a dabigatrana, nemjerljiv rezultat TV-a ( $>150$  s) je dobiven u 56 od ukupno ispitanih 124 uzoraka (45 %), dok je u 46 od ukupno 124 (37%) mjerenja rezultat TV-a bio produljen ( $>21$  s), ali unutar mjernog raspona ( $<150$  sekundi). Rezultati ovog ispitivanja pokazali su da lijek dabigatran nema utjecaja na rezultat pretrage kvantitativnog određivanja fibrinogena ( $p = 0,289$ ), kako je prikazano u Tablici 5.



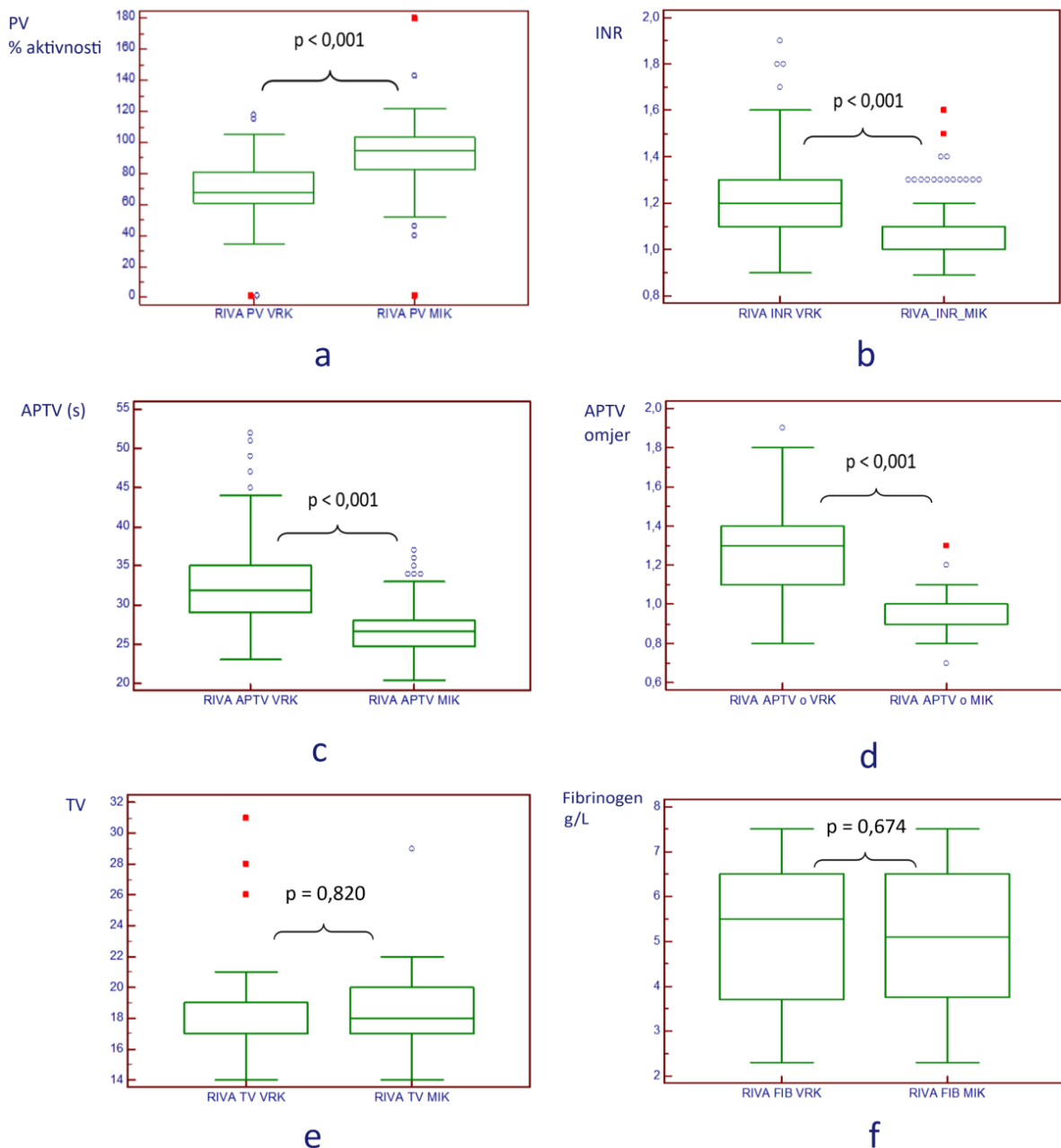


Slika 4: Grafički prikaz utjecaja vršne i minimalne koncentracije dabigatrana na probirne pretrage hemostaze

#### 4.3. Utjecaj rivaroksabana na rezultate probirnih pretraga hemostaze

U Tablici 6 i na Slici 5 prikazan je utjecaj lijeka rivaroksabana na rezultate probirnih pretraga hemostaze. Lijek rivaroksaban statistički značajno utječe ( $p < 0,001$ ) na vrijednosti PV % aktivnosti, INR-a, i APTV-a, a nema utjecaja na rezultat pretrage TV ( $p = 0,820$ ) i fibrinogen ( $p = 0,674$ ). Dobiveni rezultati za pretragu PV % aktivnosti i INR pokazali su da postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) kod VRK-a i MIK-a lijeka. Dobivene

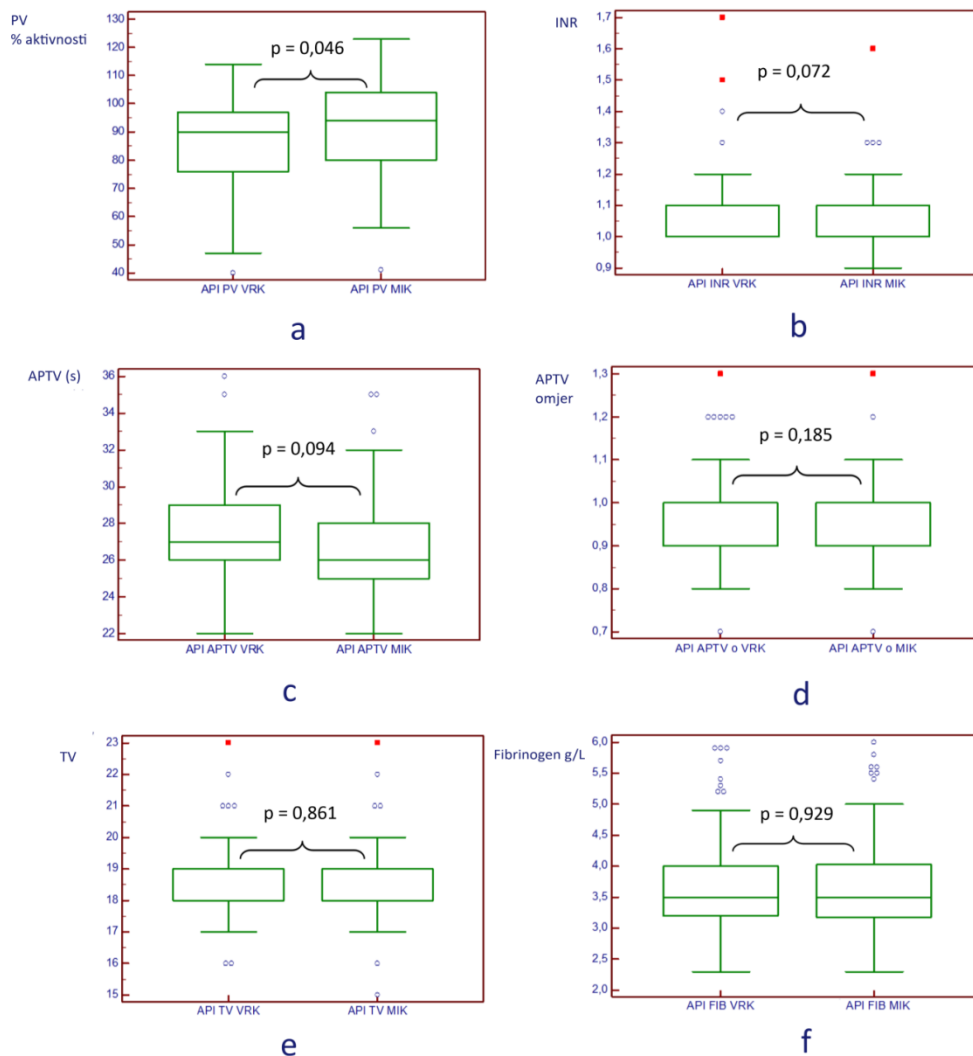
vrijednosti pretrage PV % aktivnosti se kod MIK-a rivaroksabana nalaze unutar RI, a snižene su samo kod VRK-a lijeka. Nadalje, VRK rivaroksabana rezultira produljenjem APTV-a, za razliku od MIK-a kod koje su vrijednosti APTV (s) i APTV omjera unutar RI (Tablica 6). Lijek rivaroksaban ne utječe značajno na vrijednost fibrinogena i TV-a, niti kod vršnih koncentracija lijeka.



Slika 5: Grafički prikaz utjecaja vršne i minimalne koncentracije rivaroksabana na probirne pretrage hemostaze.

#### 4.4. Utjecaj apiksabana na rezultate probirnih pretraga hemostaze

Iz dobivenih rezultata prikazanih u Tablici 7 i na Slici 6 vidljivo je da lijek apiksaban statistički značajno utječe ( $p = 0,046$ ) na vrijednosti PV % aktivnosti, a nema utjecaja na pretrage INR ( $p = 0,072$ ), APTV (s) i APTV omjer ( $p = 0,094$  i  $p = 0,185$ ), TV ( $p = 0,861$ ) i fibrinogen ( $p = 0,929$ ). Za lijek apiksaban rezultat PV % aktivnosti je unutar referentnih vrijednosti i kod VRK-a i kod MIK-a, ali se utjecaj koncentracije lijeka statistički značajno razlikuje ( $p = 0,046$ ).



Slika 6: Grafički prikaz utjecaja vršne i minimalne koncentracije apiksabana na probirne pretrage hemostaze.

Tablica 5. Prikaz utjecaja vršne i minimalne koncentracije dabigatrana na probirne pretrage hemostaze.

Lijek/ VRK ili MIK	PV % aktivnosti	P	INR	P	APTV s	P	APTV omjer	P	Fibrinogen g/L	P	TV s	P
Dabigatran VRK(ng/mL)	65±21	<0,001	1,2 (1,2-1,3) 1,1-1,4	<0,001	43±11	<0,001	1,6±0,4	<0,001	3,5 (3,3-3,8) 3,0 – 5,3	0,289	>150 (>150) 137 ->150	<0,001
Dabigatran MIK (ng/mL)	80±23		1,1 (1,1-1,1) 1,1-1,2		35±10		1,2 (1,2-1,3) 1,1-1,4		3,6 (3,5-3,9) 3,1 – 5,3		120 94 ->150	

Tablica 6. Prikaz utjecaja vršne i minimalne koncentracije rivaroksabana na probirne pretrage hemostaze.

Lijek/ VRK ili MIK	PV % aktivnosti	P	INR	P	APTV s	P	APTV omjer	P	Fibrinogen g/L	P	TV s	P
Rivaroksaban VRK (ng/mL)	69±18	<0,001	1,2 (1,2-1,2) 1,1-1,3	<0,001	33±5	<0,001	1,3 (1,2-1,3) 1,1-1,4	<0,001	5,2±1,6	0,674	19 (18-19) 17 – 19	0,820
Rivaroksaban MIK (ng/mL)	95 (91-96) 83 - 104		1,0 (1,0-1,1) 1,0 - 1,1		27±3		1,0 (1,0-1,0) 1,0 - 1,1		5,1±1,6		18±2	

Tablica 7. Prikaz utjecaja vršne i minimalne koncentracije apiksabana na probirne pretrage hemostaze.

Lijek/ VRK ili MIK	PV % aktivnosti	P	INR	P	APTV s	P	APTV omjer	P	Fibrinogen g/L	P	TV s	P
Apiksaban VRK ng/mL	87±15	0,046	1,1 (1,1- 1,1)	0,072	27 (26- 27) 26 - 29	0,094	0,9 (0,9-1,0) 0,9-1,0	0,185	3,5 (3,4-3,7) 3,2 – 4,0	0,674	18 (18-19) 18-19	0,820
Apiksaban MIK ng/mL	91±16		1,1 (1,0- 1,1) 1,0 - 1,1		27±3		0,9 (0,9-0,9) 0,9-1,0		3,7±0,8		18 (18-19) 18-19	

Iako primjena DOAC lijekova ne zahtijeva rutinsko laboratorijsko praćenje antikoagulacijske terapije, prisutnost ovih lijekova u plazmi ima značajan utjecaj na rezultate brojnih pretraga hemostaze, uključujući one osnovne ili probirne, kao i one specijalističke. Poznavanje utjecaja DOAC lijekova na pojedine koagulacijske pretrage preduvjet je pravilne interpretacije rezultata ovih pretraga. Nadalje, poznavanjem utjecaja DOAC lijekova na rezultate specijalističkih pretraga, kao što su pretrage probira na trombofiliju, sprječavaju se lažno pozitivni ili lažno negativni rezultati koji bi mogli imati negativan utjecaj na liječenje bolesnika.

U sklopu ovoga rada ispitan je utjecaj tri DOAC lijeka koji se primjenjuju u kliničkoj praksi, dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana, na rezultate probirnih pretraga hemostaze: PV, APTV, TV i fibrinogen. U svrhu ispitivanja utjecaja same koncentracije lijeka u plazmi na rezultate navedenih probirnih pretraga, u svih bolesnika su izmjerene i VRK i MIK odgovarajućeg DOAC lijeka, te su ispitivane probirne pretrage hemostaze određene za sve bolesnike u uzorcima s VRK-om i MIK-om odgovarajućeg DOAC lijeka.

Rezultati provedenog ispitivanja pokazali su da ispitivani DOAC lijekovi imaju značajan utjecaj na rezultate pojedinih probirnih koagulacijskih pretraga. Nadalje, utvrđeno je da je utjecaj različitih DOAC lijekova na pojedine probirne pretrage hemostaze različit ovisno o skupini lijeka (DTI i izravni inhibitori FXa), kao i o plazmatskoj koncentraciji lijeka.

Provedeno ispitivanje je pokazalo da lijek dabigatran značajno utječe na rezultate pretraga APTV i TV te u manjoj mjeri i na rezultate PV-a, dok nema utjecaja na pretragu kvantitativnog određivanja fibrinogena. Na prisutnost dabigatrana u ispitivanom uzorku, najosjetljivija je pretraga TV te je kod većine bolesnika liječenih dabigatranom TV produženo izvan gornje granice mjernog raspona ( $TV > 150$  sekundi). Osjetljivost pretrage TV na dabigatran proizlazi iz samog mehanizma djelovanja ovoga lijeka koji se temelji na izravnoj inhibiciji trombina. Dabigatran značajno utječe na rezultat pretrage TV već i kod MIK-a lijeka, a posebice kod VRK-a lijeka. Pretraga TV je jednostavna za izvedbu i dostupna u svim bolničkim laboratorijima, a većina TV reagensa je veoma osjetljiva na lijek dabigatran. Neki od autora drugih istraživanja navode da bi zbog velike osjetljivosti na dabigatran, pretraga TV bi mogla biti korisna u procjeni antikoagulacijske aktivnosti dabigatrana. Međutim, prevelika osjetljivost pretrage TV na lijek dabigatran očituje se produženjem TV-a izvan granica mjernog raspona već i kod vrlo niskih koncentracija dabigatrana (već kod  $> 25$  ng/mL), što ovu pretragu čini neprikladnom za procjenu koncentracije i antikoagulacijskog učinka dabigatrana (Douxflis i sur., 2012b, van Ryn i sur., 2010). S druge strane, s obzirom da je pretraga TV izrazito osjetljiva na prisutnost dabigatrana, normalna vrijednost TV-a je

pokazatelj odsutnosti klinički značajne koncentracije dabigatrana u plazmi (Dager i sur., 2012).

Dabigatran i kod MIK-a i kod VRK-a lijeka značajno utječe na pretragu APTV. Intenzitet utjecaja na pretragu APTV se razlikuje ovisno o koncentraciji lijeka, pri čemu je APTV više produženo kod VRK-a u odnosu na MIK dabigatrana. Rezultati provedenog ispitivanja utjecaja dabigatrana na pretragu APTV su u skladu s rezultatima većine drugih studija, pri čemu je utvrđeno da i MIK i VRK dabigatrana rezultiraju produljenjem APTV-a, ali se utjecaj MIK-a i VRK-a dabigatrana na APTV statistički značajno razlikuje. Dodatno, neke su studije pokazale da je produljenje APTV-a razmjerno s povećanjem plazmatske koncentracije dabigatrana (Gemen i sur., 2014; Turkoglu, 2015). Rezultati jednog istraživanja pokazuju da su kod VRK-a lijeka gotovo svi ispitanici liječeni dabigatranom imali značajno produženo APTV bez obzira na korišteni reagens (Lindahl i sur., 2011). Ovo je važno imati na umu jer se osjetljivost različitih APTV reagensa značajno razlikuje u sastavu iz čega proizlazi da različiti reagensi mogu imati različitu podložnost utjecaju dabigatrana, odnosno APTV nije jednako produženo kod iste koncentracije dabigatrana u cirkulaciji (Van Blerk i sur., 2015; van Ryn i sur., 2010). Unatoč navedenim ograničenjima, jedno istraživanje navodi da se u slučaju normalnih vrijednosti APTV-a može pretpostaviti da u cirkulaciji nije postignuta terapijska koncentracija dabigatrana, međutim ne može se u potpunosti isključiti odsutnost klinički značajne koncentracije lijeka (Turkoglu, 2015). Na temelju vrijednosti APTV-a ne mogu se pouzdano razlikovati terapijske od subterapijskih koncentracija dabigatrana te se rezultati pretrage APTV uvijek trebaju tumačiti s oprezom u bolesnika liječenih dabigatranom, a sama pretraga nije prikladna za procjenu terapijske koncentracije i učinka lijeka (van Ryn i sur., 2010).

Rezultati drugih ispitivanja potvrđuju da dabigatran ima najveći utjecaj na rezultate pretraga TV i APTV, pri čemu je pretraga TV izrazito osjetljiva već i na niske koncentracije dabigatrana (Gemen i sur., 2014; van Ryn i sur., 2010). Izrazit utjecaj dabigatrana na pretrage TV i APTV može se objasniti činjenicom da se radi o lijeku koji svoj antikoagulacijski učinak ostvaruje kao DTI. Lijekovi koji djeluju kao inhibitori trombina, bilo izravni ili neizravni (heparini i srodni lijekovi), imaju značajan utjecaj na navedene pretrage zbog mehanizma svog djelovanja.

Dabigatran ima statistički značajan utjecaj na pretragu PV, pri čemu taj utjecaj uvelike ovisi o plazmatskoj koncentraciji lijeka jer se dobiveni rezultati PV-a značajno razlikuju kod VRK-a i MIK-a dabigatrana. U ispitivanim uzorcima je kod VRK-a dabigatrana aktivnost PV-a smanjena, dok se dobivene vrijednosti PV-a kod MIK-a dabigatrana uglavnom nalaze

unutar RI. Ipak, utjecaj dabigatrana na pretragu PV je manje izražen u odnosu na utjecaj dabigatrana na pretragu APTV te je posebice manje izražen u odnosu na utjecaj dabigatrana na pretragu TV. Kao i u slučaju APTV-a, utjecaj dabigatrana na pretragu PV ovisi o tipu upotrebljenog reagensa, s time da je utjecaj dabigatrana na sve ispitivane PV reagense značajno manji od utjecaja na APTV reagense (Lindahl i sur., 2011). Dabigatran utječe i na pretragu INR, pri čemu taj utjecaj također ovisi o plazmatskoj koncentraciji (VRK ili MIK) lijeka. Rezultati provedenog ispitivanja su u skladu s rezultatima drugih autora koji su demonstrirali da dabigatran ima relativno mali utjecaj na pretrage PV i INR pri klinički značajnim plazmatskim koncentracijama lijeka (Lindahl i sur., 2011; van Ryn i sur., 2010). Jedno od ranijih istraživanja navodi da je kod preporučene profilaktičke doze dabigatran eteksilata nakon ortopedске operacije (2x110 mg/dan), pretraga INR, koja se koristi kao specifična pretraga za praćenje terapije varfarinom, relativno neosjetljiva na dabigatran te zbog toga nije prikladna za procjenu antikoagulacijskog učinka ili koncentracije dabigatrana (van Ryn i sur., 2010). Rezultati drugih ispitivanja su pokazali da porast INR-a pri visokim koncentracijama dabigatrana nije linearan, već se pri suprat terapijskim koncentracijama dabigatrana ostvaruje tek blagi porast INR-a (Lindahl i sur., 2011; van Ryn i sur., 2010). Zaključno, terapijske koncentracije dabigatrana rezultiraju tek blagim porastom INR-a te INR nije prikladna pretraga za procjenu terapijskog učinka DOAC lijekova (Lindahl i sur., 2011; Turkoglu, 2015; van Ryn i sur., 2010).

Provedeno ispitivanje utjecaja dabigatrana na pretragu kvantitativnog određivanja fibrinogena primjenom komercijalnog reagensa *Multifibren* (Siemens Healthineers, Njemačka) je pokazalo da liječenje dabigatranom nema utjecaja na ovu pretragu te se dobiveni rezultati nisu značajno razlikovali kod VRK-a i MIK-a dabigatrana. S druge strane, jedno od istraživanja navodi da je primjena reagensa *Multifibren* u svrhu određivanja fibrinogena u uzorcima PPP-a s dodanom poznatom koncentracijom dabigatrana rezultirala izrazito sniženim vrijednostima fibrinogena (Lindahl i sur., 2011). Autori ove studije navode da je tako niska koncentracija fibrinogena povezana s povećanim rizikom od krvarenja, a s obzirom da je za kliničara koji liječi pacijenta s krvarenjem važno imati točan podatak o koncentraciji fibrinogena, metode koje daju lažno niske rezultate ne bi se smjele koristiti.

Za razliku od dabigatrana, lijekovi rivaroksaban i apiksaban ne utječu na pretragu TV, niti kod VRK-a niti kod MIK-a lijeka, što se objašnjava činjenicom da ovi lijekovi djeluju drugačijim mehanizmom inhibicije hemostatskog sustava, odnosno djeluju kao izravni inhibitori FXa. Lijek rivaroksaban utječe na PV i APTV isključivo kod VRK-a lijeka. Kod MIK-a rivaroksabana je njegov utjecaj na PV i APTV značajno manji i zanemariv te se

dobiveni rezultati nalaze unutar RI. Utjecaj rivaroksabana na fibrinogen ne ovisi o plazmatskoj koncentraciji lijeka te su i kod VRK-a i kod MIK-a lijeka dobivene vrijednosti fibrinogena iznad gornje granice RI i bez značajnih razlika u vrijednostima. Za razliku od dabigatrana i rivaroksabana, lijek apiksaban ne utječe na rezultate probirnih pretraga hemostaze, niti kod VRK-a niti kod MIK-a lijeka. Apiksaban ostvaruje statistički značajan utjecaj samo na pretragu PV (% aktivnosti) i to isključivo kod VRK-a lijeka. Iako su i u slučaju MIK-a i VRK-a apiksabana vrijednosti PV-a unutar RI, utvrđena je statistički značajna razlika između utjecaja MIK-a i VRK-a lijeka na PV. Dobiveni rezultati ispitivanja utjecaja apiksabana na probirne pretrage hemostaze su unutar granica RI i kod VRK-a i kod MIK-a apiksabana.

Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima drugih ispitivanja koja su pokazala da DOAC lijekovi koji djeluju kao izravni inhibitori FXa ostvaruju najveći utjecaj na PV. Terapijske koncentracije apiksabana imaju tek blagi utjecaj na PV te ne utječu na APTV, dok rivaroksaban često uzrokuje produljenje kako PV-a, tako i APTV-a, pri čemu utječe na PV u većoj mjeri nego na APTV (Dale i sur., 2014; Douxfils i sur., 2012a; Francart i sur., 2014). Zbog slabe osjetljivosti PV-a na apiksaban, rezultati su pri terapijskim koncentracijama lijeka najčešće unutar RI. U dvjema studijama se pokazalo da su pretrage PV i APTV slabo osjetljive na prisutnost apiksabana te su kod VRK-a apiksabana dobivene vrijednosti PV-a bile unutar RI ili tek blago produljene (Douxfils i sur., 2013, Hillarp i sur., 2014). Rezultati jednog istraživanja pokazuju da je produljenje APTV-a razmjerno s porastom koncentracije apiksabana na nelinearan način, međutim čak i pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji apiksabana (1000 ng/mL), rezultat APTV-a je bio na gornjoj granici RI (Hillarp i sur., 2014). Autori jednog istraživanja sugeriraju da je temeljem rezultata pretrage PV moguće razlikovati VRK od MIK-a rivaroksabana, pri čemu rezultat PV-a unutar RI u većini slučajeva otklanja sumnju na visoku plazmatsku koncentraciju lijeka, ali ne isključuje prisutnost klinički značajne koncentracije (>30 ng/mL) rivaroksabana u plazmi (Francart i sur., 2014). Iz navedenog proizlazi da PV može poslužiti za kvalitativnu i grubu procjenu rizika od krvarenja prilikom terapije rivaroksabanom, ali ne i za procjenu koncentracije i antikoagulacijskog učinka rivaroksabana. Dobiveni rezultati su u skladu s drugim studijama koje su također pokazale da je utjecaj rivaroksabana na rezultate probirnih pretraga hemostaze izraženiji u prisutnosti visokih plazmatskih koncentracija lijeka (Douxfils i sur., 2013; Gerotziafas i sur., 2012). Zaključno, rezultat pretrage PV i APTV ovisi o koncentraciji lijeka u ispitivanom uzorku, o korištenom reagensu, kao i o samom lijeku (rivaroksaban ili apiksaban) kojim se pacijent liječi (Samama i Guinet, 2011).



Provedeno ispitivanje potvrđuje zapažanja dobivena prethodnim ispitivanjima koja su pokazala da probirne pretrage hemostaze nisu prikladne za procjenu koncentracije odgovarajućeg DOAC lijeka, njegova antikoagulantnog učinka niti rizika od neželjenih nuspojava u određenim kliničkim stanjima bolesnika liječenih ovim lijekovima. Ove su pretrage nedovoljno osjetljive i specifične za DOAC lijekove, njihov je utjecaj različit ovisno o plazmatskoj koncentraciji lijeka te su nestandardizirane za primjenu u praćenju liječenja bolesnika na DOAC lijekovima. S druge strane, ovo ispitivanje jasno upućuje da je poznavanje utjecaja različitih DOAC lijekova na pojedine probirne pretrage hemostaze od izuzetne važnosti u svakodnevnoj laboratorijskoj i kliničkoj praksi kako bi se rezultati ovih pretraga mogli pravilno interpretirati. Značajan utjecaj koncentracije DOAC lijekova na rezultate probirnih pretraga hemostaze može se objasniti relativno kratkim vremenom poluživota ovih lijekova (u prosjeku 8-15 sati), što ima za posljedicu brzi početak i brzi prestanak djelovanja lijeka. Relativno kratko vrijeme poluživota ovih lijekova objašnjava i značajne razlike u intenzitetu utjecaja na probirne pretrage hemostaze, ovisno o vremenu uzorkovanja u odnosu na posljednju primjenu doze lijeka. Ranije provedena istraživanja su pokazala da se rezultati probirnih pretraga hemostaze dobiveni iz uzoraka krvi uzetih u vrijeme vršne plazmatske koncentracije lijeka (u prosjeku otprilike 2 sata nakon primjene lijeka) značajno razlikuju u odnosu na rezultate probirnih pretraga dobivene u vrijeme minimalne plazmatske koncentracije lijeka (neposredno prije primjene sljedeće doze lijeka) (Gemen i sur., 2014; van Ryn i sur., 2010). Rezultati našeg ispitivanja su u skladu s navedenim zaključcima iz čega proizlazi da je prilikom tumačenja rezultata probirnih koagulacijskih pretraga bitno raspolagati informacijom kada je DOAC lijek primijenjen u odnosu na vrijeme uzorkovanja krvi za izvođenje pretraga.

Suprotno DOAC lijekovima, kod terapije oralnim antikoagulantom iz skupine VKA, varfarinom, vrijeme uzorkovanja krvi u odnosu na zadnju primjenu doze lijeka ne utječe značajno na rezultat probirne pretrage PV INR, koja se specifično primjenjuje za praćenje terapije, zbog znatno duljeg terapijskog učinka na aktivnost faktora zgrušavanja ovisnih o vitaminu K koji proizlazi iz njihovog duljeg vremena poluživota.

Do danas su objavljeni brojni radovi u kojima je ispitivan učinak DOAC lijekova na rezultate probirnih i specijalističkih koagulacijskih pretraga. Međutim, u velikom broju ovih radova korišteni su uzorci plazme zdravih dobrovoljaca kojima je *in vitro* dodana poznata koncentracija odgovarajućeg DOAC lijeka kako bi se ispitaio utjecaj na rezultate koagulacijskih pretraga. U našem radu, utjecaj DOAC lijekova na rezultate pretraga hemostaze ispitivan je izravno u bolesnika liječenih ovim lijekovima. Ovako provedeno

ispitivanje se može smatrati prikladnijim u odnosu na ispitivanja u kojima je lijek *in vitro* dodavan uzorcima plazme zdravih dobrovoljaca, s obzirom da je već ranije pokazano da dva navedena načina ispitivanja utjecaja DOAC lijekova na rezultate probirnih pretraga pokazuju različit utjecaj te se svakako preporučuje svako ispitivanje ove vrste provoditi isključivo u plazmi bolesnika liječenih DOAC lijekovima.

## 5. ZAKLJUČCI

Provedenim ispitivanjem utvrđeno je da ispitivani DOAC lijekovi, dabigatran, apiksaban i rivaroksaban, utječu na rezultate probirnih pretraga hemostaze. Utjecaj DOAC lijekova na rezultate probirnih pretraga razlikuje se među pojedinim skupinama lijekova (izravni inhibitori trombina i izravni inhibitori FXa), ali i između lijekova iste skupine (rivaroksaban i apiksaban). Utjecaj DOAC lijekova na rezultate probirnih pretraga hemostaze značajno se razlikuje kod vršnih i minimalnih koncentracija lijeka pri čemu je utjecaj na navedene pretrage značajno veći kod vršnih plazmatskih koncentracija lijeka u odnosu na minimalne koncentracije.

Lijek dabigatran značajno utječe na rezultate pretrage TV i APTV te u manjoj mjeri na PV, a nema utjecaja na rezultat fibrinogena. Utjecaj dabigatrana na TV i APTV prisutan je i kod vršnih i minimalnih koncentracija lijeka, uz značajno veći utjecaj na obje pretrage kod vršnih koncentracija. Suprotno tome, na rezultat pretrage PV utječu samo vršne koncentracije dabigatrana.

Lijek rivaroksaban značajno utječe na rezultate pretraga PV i APTV, ali je taj utjecaj prisutan samo kod vršnih koncentracija lijeka. Kod minimalnih koncentracija rivaroksabana, vrijednosti PV-a i APTV-a su unutar referentnog intervala. Lijek rivaroksaban ne utječe na rezultate pretraga TV i fibrinogen.

Lijek apiksaban je, u odnosu na dabigatran i rivaroksaban, pokazao najmanji utjecaj na rezultate probirnih pretraga hemostaze. Vrijednosti svih ispitanih probirnih pretraga su unutar referentnog intervala i kod vršnih i kod minimalnih koncentracija apiksabana. Za pretragu PV je kod vršnih koncentracija lijeka izmjerena značajno veća aktivnost u odnosu na minimalnu koncentraciju apiksabana, iako su vrijednosti i kod vršne i kod minimalne koncentracije apiksabana bile unutar referentnog intervala.

Ispitivanje utjecaja DOAC lijekova na rezultate pojedinih probirnih pretraga hemostaze upućuje da navedene pretrage nisu prikladne za procjenu antikoagulacijskog učinka i/ili koncentracije odgovarajućeg DOAC lijeka u cirkulaciji zbog nedovoljne osjetljivosti i specifičnosti ovih pretraga za DOAC lijekove te zbog značajne ovisnosti koncentracije lijeka na rezultate navedenih pretraga.

Ovo ispitivanje potvrdilo je da je poznavanje utjecaja DOAC lijekova na pojedine probirne pretrage važno u svakodnevnoj laboratorijskoj i kliničkoj praksi zbog pravilne interpretacije rezultata ovih pretraga u bolesnika liječenih navedenim lijekovima.

## 6. LITERATURA

Achneck HE, Sileshi B, Parikh A, Milano CA, Welsby IJ, Lawson JH. Pathophysiology of bleeding and clotting in the cardiac surgery patient from vascular endothelium to circulatory assist device surface. *Circulation*, 2010, 122, 2068-2077.

Barnes GD, Ageno W, Ansell J, Kaatz S, Subcommittee on the Control of Anticoagulation of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Recommendation on the nomenclature for oral anticoagulants: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*, 2015, 13, 1154-1156.

Blanco A, Blanco G. Hemostasis. U: Medical Biochemistry, 1<sup>st</sup> edition. Versteeg-Buschman L, urednik, London, *Elsevier*, 2017, str. 781-789.

Bombeli T, Spahn DR. Updates in perioperative coagulation: physiology and management of thromboembolism and haemorrhage. *Br J Anaesth*, 2004, 93, 275-287.

Bounameaux H, Reber G. New oral anticoagulants: a need for laboratory monitoring. *J Thromb Haemost*, 2010, 8, 627–630.

Bronić A, Coen Herak D, Margetić S, Milić M. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: National recommendations for blood collection, processing, performance and reporting of results for coagulation screening assays prothrombin time, activated partial thromboplastin time, thrombin time, fibrinogen and D-dimer. *Biochem Med*, 2019, 29(2), 1-22.

Byon W, Garonzik S, Boyd RA, Frost CE. Apixaban: A Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Review. *Clin Pharmacokinet*, 2019, 58, 1265–1279.

Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev*, 2015, 29, 17–24.

Dager WE, Gosselin RC, Kitchen S, Dwyre D. Dabigatran effects on the international normalized ratio, activated partial thromboplastin time, thrombin time, and fibrinogen: a multicentre, in vitro study. *Ann Pharmacother*, 2012, 46, 1627–1636.

Dale BJ, Ginsberg JS, Johnston M, Hirsh J, Weitz JI, Eikelboom JW. Comparison of the effects of apixaban and rivaroxaban on prothrombin and activated partial thromboplastin times using various reagents. *J Thromb Haemost*, 2014, 12, 1810–1815.

Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, 1964, 145, 1310–1312.

Douxflis J, Chatelain C, Chatelain B, Dogné JM, Mullier F. Impact of apixaban on routine and specific coagulation assays: a practical laboratory guide. *Thromb Haemost*, 2013, 110, 283-294.

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

Douxflis J, Mullier F, Séverine R, Chatelain C, Chatelain B, Dogné JM. Impact of dabigatran on a large panel of routine or specific coagulation assays. Laboratory recommendations for monitoring of dabigatran etexilate. *Thromb Haemost*, 2012b, 107, 985-997.

Francart SJ, Hawes EM, Deal AM, Adcock DM, Gosselin R, Jeanneret C, Friedman KD, Moll S. Performance of coagulation tests in patients on therapeutic doses of rivaroxaban. A cross-sectional pharmacodynamic study based on peak and trough plasma levels. *Thromb Haemost*, 2014, 111, 1133-1140.

Gemen EFA, Kariman MA, van Dijk JHAW, van Eck JWM, Péquériaux NCV. Impact of dabigatran on routine and specific coagulation assays in patients treated by dabigatran. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk*, 2014, 39, 156-157.

Gerotziafas GT, Baccouche H, Sassi M, Galea V, Chaari M, Hatmi M, Samama MM, Elalamy I. Optimisation of the assays for the measurement of clotting factor activity in the presence of rivaroxaban. *Thromb Res*, 2012, 129, 101–103.

Harter K, Levine M, Henderson SO. Anticoagulation Drug Therapy: A Review. *West J Emerg Med*, 2015, 16, 11–17.

Hillarp A, Gustafsson KM, Faxalv L, Strandberg K, Baghaei F, Fagerberg Blixter I, Berndtsson M, Lindahl TL. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor apixaban on routine coagulation assays and anti-FXa assays. *J Thromb Haemost*, 2014, 12, 1545–1553.

Hoffman M, Monroe DM. A Cell-based Model of Hemostasis. *Thromb Haemost*, 2001, 85, 958–965.

How CH. Novel oral anticoagulants for atrial fibrillation. *Singapore Med J*, 2015, 56, 657-658.

Kreutz R. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Rivaroxaban – An Oral, Direct Factor Xa Inhibitor. *Current Clinical Pharmacology*, 2014, 9, 75-83.

Lindahl TL, Baghaei F, Blixter IF, Gustafsson KM, Stigendal L, Sten-Linder M, Strandberg K, Hillarp A, Expert Group on Coagulation of the External Quality Assurance in Laboratory Medicine in Sweden. Effects of the oral, direct thrombin inhibitor dabigatran on five common coagulation assays. *Thromb Haemost*, 2011, 105, 371-378.

MacFarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, 1964, 202, 498–499.

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, str. 349-87.

McKenzie SB, Williams JL. Hemostasis: Laboratory Testing and Instrumentation. U: Clinical Laboratory Hematology. Gockel-Blessing EA, urednica, *Pearson Education*, New Jersey, 2015, str. 750 – 782.

McMichael M. New Models of Hemostasis. *Topics in Compan An Med*, 2012, 27, 40-45.

Mueck W, Stampfuss J, Kubitza D, Becka M. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Rivaroxaban. *Clin Pharmacokinet*, 2014, 53, 1–16.

Rogers HJ, Nakashima MO, Kottke-Marchant K. Hemostasis and Thrombosis. U: Hemopathology, 3<sup>rd</sup> edition. Hsi ED, urednik, Philadelphia, *Elsevier*, 2018, str. 57-105.

Samama MM, Guinet C. Laboratory assessment of new anticoagulants. *Clin Chem Lab Med*, 2011, 49, 761–772.

Turkoglu EI. NOACs and routine coagulation assays. How to interpret? *International Journal of the Cardiovascular Academy*, 2015, 41–42.

van Ryn J, Stangier J, Haertter S, Liesenfeld KH, Wienen W, Feuring M, Clemens A. Dabigatran etexilate – a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: Interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. *Thromb Haemost*, 2010, 103, 1116-1127.

Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol Rev*, 2013, 93, 327–358.

Vodič za liječnike s informacijama o primjeni lijeka Xarelto (rivaroksaban), 2019., <https://www.halmed.hr/>, pristupljeno 17.09.2020.

Vuga I, Šupraha Goreta S, Margetić S. Direktni oralni antikoagulacijski lijekovi. *Farmaceutski glasnik*, 2018, 74(9), 633-652.

Weitz JI. Blood coagulation and anticoagulant, fibrinolytic, and antiplatelet drugs. U: Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. Brunton LL, urednici, New York, *McGraw Hill Medical*, 2017, 211, 848-876.



## 7. SAŽETAK

Izravni oralni antikoagulansi (engl. *direct oral anticoagulants*, DOAC) posljednjih se godina sve više primjenjuju u prevenciji i liječenju tromboembolijskih bolesti. Terapija DOAC lijekovima se, zahvaljujući njihovoj predvidljivoj farmakokinetici, provodi u fiksnim dozama pa ne zahtijevaju rutinsko laboratorijsko praćenje. S druge strane, DOAC lijekovi, zbog izravnog inhibicijskog djelovanja na aktivnost određenog segmenta hemostatskog sustava, imaju utjecaj na rezultate brojnih pretraga hemostaze, kako probirnih tako i specijalističkih. Poznavanje utjecaja DOAC lijekova na pojedine pretrage hemostaze od izuzetne je važnosti zbog pravilne interpretacije rezultata te sprečavanja lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata koji bi mogli imati negativan utjecaj na samo liječenje bolesnika.

Cilj provedenog istraživanja bio je ispitati utjecaj tri DOAC lijeka, dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana, na rezultate probirnih pretraga hemostaze: PV, APTV, TV i fibrinogen. U uzorcima bolesnika liječenih DOAC lijekovima, dabigatranom (n=248), rivaroksabanom (n=294) i apiksabanom (n=142), određene su vršne (2 sata nakon primjene zadnje doze) i minimalne koncentracije (neposredno prije slijedeće doze) odgovarajućeg DOAC lijeka te probirne pretrage hemostaze PV, APTV, TV i fibrinogen.

Rezultati provedenog ispitivanja pokazali su da DOAC lijekovi utječu na rezultate probirnih pretraga hemostaze. Taj se utjecaj značajno razlikuje ovisno o vrsti lijeka i vremenu uzorkovanja u odnosu na zadnju dozu lijeka. Utjecaj DOAC lijekova na navedene pretrage značajno je veći kod vršnih koncentracija lijeka u cirkulaciji u odnosu na minimalne. Dabigatran značajno utječe na rezultate pretrage TV i APTV te u manjoj mjeri na PV, a nema utjecaja na fibrinogen. Rivaroksaban utječe na PV i APTV, ali samo kod vršnih koncentracija lijeka te nema utjecaja na TV i fibrinogen. Apiksaban ima najmanji utjecaj na rezultate probirnih pretraga hemostaze, a vrijednosti svih ispitanih pretraga su unutar referentnog intervala i kod vršnih i kod minimalnih koncentracija lijeka. Ovo ispitivanje upućuje da probirne pretrage hemostaze nisu prikladne za procjenu antikoagulacijskog učinka i/ili koncentracije odgovarajućeg DOAC lijeka, ali i da je poznavanje utjecaja DOAC lijekova na pojedine probirne pretrage preduvjet pravilne interpretacije rezultata ovih pretraga u svakodnevnoj laboratorijskoj i kliničkoj praksi.

## 7. SUMMARY

Direct oral anticoagulants (DOACs) have been increasingly used in the recent years for the prevention and treatment of thromboembolic disease. Due to their predictable pharmacokinetics, DOAC drug therapy is performed in fixed doses and does not require routine laboratory monitoring. On the other hand, due to their direct inhibitory effect on the activity of a certain segment of the haemostatic system, DOACs have a significant impact on the results of numerous haemostasis assays, both screening and specific. Understanding the influence of DOACs on a particular haemostasis assay is extremely important for correct interpretation of the results, as well as prevention of false positive or false negative results that could have a negative impact on the patient treatment.

The aim of this study was to examine the effect of three DOACs, dabigatran, rivaroxaban and apixaban, on the results of routine screening haemostasis tests: PV, APTV, TV and fibrinogen. In the samples of patients treated with DOACs, dabigatran (n = 248), rivaroxaban (n = 294) and apixaban (n = 142), peak (2 hours after administration of the last dose) and trough concentrations (shortly before taking the next dose) of a certain DOAC were determined and screening haemostasis tests, PV, APTV, TV and fibrinogen, were conducted.

The results of the conducted study showed that DOACs affect the results of haemostasis screening tests. This effect differs significantly depending on the type of DOAC used and the time of blood sampling in relation to the time of the administration of the last dose. The influence of DOACs on these assays is significantly larger at peak plasma concentrations of the drug when compared to the trough drug concentration. Dabigatran significantly affects TV and APTV test results and to a lesser extent PV, whilst it has no effect on fibrinogen assay. Rivaroxaban affects PV and APTV, but only at peak drug concentrations and has no effect on TV and fibrinogen. Apixaban has the lowest effect on the results of haemostasis screening tests, and the obtained values of all examined samples were within the reference interval at both peak and trough drug concentrations. This study indicates that haemostasis screening tests are not suitable for assessment of the anticoagulant effect and/or the concentration of a certain DOAC, whereas understanding the impact of DOACs on individual screening tests is essential for proper interpretation of obtained test results in everyday laboratory and clinical practice.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### UTJECAJ NOVIH ORALNIH ANTIKOAGULACIJSKIH LIJEKOVA NA PROBIRNE PRETRAGE HEMOSTAZE

**Jelena Buben**

#### SAŽETAK

Izravni oralni antikoagulansi (engl. *direct oral anticoagulants*, DOAC) posljednjih se godina sve više primjenjuju u prevenciji i liječenju tromboembolijskih bolesti. Terapija DOAC lijekovima se, zahvaljujući njihovoj predvidljivoj farmakokinetici, provodi u fiksnim dozama pa ne zahtijevaju rutinsko laboratorijsko praćenje. S druge strane, DOAC lijekovi zbog izravnog inhibicijskog djelovanja na aktivnost određenog segmenta hemostatstskog sustava, imaju utjecaj na rezultate brojnih pretraga hemostaze, kako probirnih tako i specijalističkih. Poznavanje utjecaja DOAC lijekova na pojedine pretrage hemostaze od izuzetne je važnosti zbog pravilne interpretacije rezultata te sprečavanja lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata koji bi mogli imati negativan utjecaj na samo liječenje bolesnika.

Cilj provedenog istraživanja bio je ispitati utjecaj tri DOAC lijeka, dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana, na rezultate probirnih pretraga hemostaze: PV, APTV, TV i fibrinogen. U uzorcima bolesnika liječenih DOAC lijekovima, dabigatranom (n=248), rivaroksabanom (n=294) i apiksabanom (n=142), određene su vršne (2 sata nakon primjene zadnje doze) i minimalne koncentracije (neposredno prije slijedeće doze) DOAC lijeka te probirne pretrage hemostaze PV, APTV, TV i fibrinogen.

Rezultati provedenog ispitivanja pokazali su da DOAC lijekovi utječu na rezultate probirnih pretraga hemostaze. Taj se utjecaj značajno razlikuje ovisno o vrsti lijeka i vremenu uzorkovanja u odnosu na zadnju dozu lijeka. Utjecaj DOAC lijekova na navedene pretrage značajno je veći kod vršnih koncentracija lijeka u cirkulaciji u odnosu na minimalne. Dabigatran značajno utječe na rezultate pretrage TV i APTV te u manjoj mjeri na PV, a nema utjecaja na fibrinogen. Rivaroksaban utječe na PV i APTV, ali samo kod vršnih koncentracija lijeka te nema utjecaja na TV i fibrinogen. Apiksaban ima najmanji utjecaj na rezultate probirnih pretraga hemostaze, a vrijednosti svih ispitanih pretragasu unutar referentnog intervala i kod vršnih i kod minimalnih koncentracija lijeka. Ovo ispitivanje upućuje da probirne pretrage hemostaze nisu prikladne za procjenu antikoagulacijskog učinka i/ili koncentracije odgovarajućeg DOAC lijeka, ali i da je poznavanje utjecaja DOAC lijekova na pojedine probirne pretrage preduvjet pravilne interpretacije rezultata ovih pretraga svakodnevnoj laboratorijskoj i kliničkoj praksi.

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

Rad sadrži: 51 stranica, 6 grafičkih prikaza, 7 tablica i 36 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: DOAC, rutinske pretrage, hemostaze, PV, APTV, TV, fibrinogen

Mentor: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Sandra Margetić**, *znanstvena suradnica, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Sandra Margetić**, *znanstvena suradnica, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb.*  
**Dr. sc. Ivana Ćelap**, *znanstvena suradnica, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb*

Rad prihvaćen: studeni 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Biochemistry and Molecular Biology  
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### IMPACT OF DIRECT ORAL ANTICOAGULANTS ON ROUTINE HAEMOSTASIS ASSAYS

**Jelena Buben**

#### SUMMARY

Direct oral anticoagulants (DOACs) have been increasingly used in the recent years for the prevention and treatment of thromboembolic disease. Due to their predictable pharmacokinetics, DOAC drug therapy is performed in fixed doses and does not require routine laboratory monitoring. On the other hand, due to their direct inhibitory effect on the activity of a certain segment of the haemostatic system, DOACs have a significant impact on the results of numerous haemostasis assays, both screening and specific. Understanding the influence of DOACs on a particular haemostasis assay is extremely important for correct interpretation of the results, as well as prevention of false positive or false negative results that could have a negative impact on the patient treatment.

The aim of this study was to examine the effect of three DOACs, dabigatran, rivaroxaban and apixaban, on the results of routine screening haemostasis tests; PV, APTV, TV and fibrinogen. In the samples of patients treated with DOACs, dabigatran (n = 248), rivaroxaban (n = 294) and apixaban (n = 142), peak (2 hours after administration of the last dose) and trough concentrations (shortly before taking the next dose) of a certain DOAC were determined and screening haemostasis tests, PV, APTV, TV and fibrinogen, were conducted.

The results of the conducted study showed that DOACs affect the results of haemostasis screening tests. This effect differs significantly depending on the type of DOAC used and the time of blood sampling in relation to the time of the administration of the last dose. The influence of DOACs on these assays is significantly larger at peak plasma concentrations of the drug when compared to the trough drug concentration. Dabigatran significantly affects TV and APTV test results and to a lesser extent PV, whilst it has no effect on fibrinogen assay. Rivaroxaban affects PV and APTV, but only at peak drug concentrations and has no effect on TV and fibrinogen. Apixaban has the lowest effect on the results of haemostasis screening tests, and the obtained values of all examined samples were within the reference interval at both peak and trough drug concentrations. This study indicates that haemostasis screening tests are not suitable for assessment of the anticoagulant effect and/or the concentration of a certain DOAC, whereas understanding the impact of DOACs on individual screening tests is essential for proper interpretation of obtained test results in everyday laboratory and clinical practice.

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

Thesis includes: 51 pages, 6 figures, 7 tables and 36 references. Original is in Croatian language.

Keywords: DOAC, screening, routine, assays, hemostasis, PV, APTV, TV, fibrinogen

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

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

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

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

**Ivana Čelap, Ph.D.**, *Sestre Milosrdnice University Hospital Center, Zagreb.*

The thesis was accepted: November 2020.