

# Laboratorijska dijagnostika kod primjene direktnih oralnih antikoagulanata

---

**Gluščić, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*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:163:760990>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-29**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Petra Gluščić**

**Laboratorijska dijagnostika kod primjene  
direktnih oralnih antikoagulanasa**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Klinička biokemija s hematologijom, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Marije Grdić Rajković.

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mariji Grdić Rajković na stručnom vodstvu, pomoći i razumijevanju tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem i svojoj mentorici u javnoj ljekarni, mag. pharm. Mireli Žonji Olujić na svemu pruženom tijekom šest mjeseci stručnog osposobljavanja, najviše na ljubavi za struku i prijateljstvu.*

*Najveće hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj ljubavi, pomoći i podršci pruženoj tijekom svih godina studija.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. KOAGULACIJA I LIJEČENJE TROMBOEMBOLIJSKIH BOLESTI .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Pojavnost i značaj tromboembolijskih bolesti .....	1
1.1.2. Hemostaza i koagulacijska kaskada .....	1
1.1.3. Antikoagulansi - definicija i podjela .....	4
<b>1.2. TRADICIONALNI ANTIKOAGULANSI.....</b>	<b>5</b>
1.2.1. Povijesni razvoj prvih antikoagulansa .....	5
1.2.1.1. Razvoj heparina i njegovih derivata.....	5
1.2.1.2. Razvoj varfarina i kumarinskih antikoagulansa.....	5
1.2.2. Kemijska svojstva i mehanizam djelovanja.....	5
1.2.2.1. Heparini.....	5
1.2.2.2. Varfarin .....	6
1.2.3. Ograničenja ranijih antikoagulansa.....	7
1.2.3.1 Heparini.....	7
1.2.3.2 Varfarin .....	7
<b>1.3. UVOĐENJE DIREKTNIH ORALNIH ANTIKOAGULANSA (DOAK-a) .....</b>	<b>8</b>
1.3.1. Razvoj DOAK-a.....	8
1.3.2. Dabigatran eteksilat mesilat .....	9
1.3.3. Direktni inhibitori FXa .....	10
1.3.3.1. Rivaroksaban .....	10
1.3.3.2. Apiksaban.....	11
1.3.3.3. Edoksaban.....	12
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME .....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>14</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>15</b>
4.1. INDIKACIJE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DOAK-a .....	15
4.2. TRADICIONALNE PRETRAGE KOAGULACIJE.....	18
4.2.1. PROTROMBINSKO VRIJEME .....	18
4.2.2. AKTIVIRANO PARCIJALNO TROMBOPLASTINSKO VRIJEME .....	20
4.2.3. TROMBINSKO VRIJEME.....	21
4.3. UTJECAJ DOAK-A NA TRADICIONALNE PRETRAGE HEMOSTAZE .....	22

4.3.1. Utjecaj direktnih inhibitora trombina.....	23
4.3.2. Utjecaj direktnih inhibitora FXa .....	24
4.3.3. Utjecaj DOAK-a na druge koagulacijske testove .....	25
4.4. METODE ODREĐIVANJA DOAK-a .....	27
4.4.1. METODE ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE DABIGATRANA .....	28
4.4.1.1. Diluirano trombinsko vrijeme (dTV) .....	28
4.4.1.2. Ekarinska kromogena metoda (ECA) .....	29
4.4.1.3. Ekarinski koagulometrijski test (ECT) .....	29
4.4.1.4. Anti-FIIa test.....	31
4.4.2. METODE ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE RIVAROKSABANA, APIKSABANA I EDOKSABANA .....	32
4.4.2.1. Anti-Xa test .....	32
4.5. OSTALE METODE ZA ODREĐIVANJE DOAK-a.....	34
5. ZAKLJUČAK.....	36
6. POPIS KRATICA, SIMBOLA I OZNAKA.....	37
7. LITERATURA.....	38
8. SAŽETAK .....	44
8. SUMMARY .....	45

## 1. UVOD

### 1.1.KOAGULACIJA I LIJEČENJE TROMBOEMBOLIJSKIH BOLESTI

#### 1.1.1. Pojavnost i značaj tromboembolijskih bolesti

Venska tromboembolija (VTE), uključujući duboku vensku trombozu (DVT) i plućnu emboliju (PE), predstavlja značajan zdravstveni problem u svijetu te je treća najčešća kardiovaskularna bolest zapadnih zemalja. Iako PE i DVT pokazuju poprilično različite kliničke manifestacije, najčešće se PE razvije kad se tromb iz dubokih vena donjih ekstremiteta (karakteristično za DVT) odvoji i dospije u plućne arterije te se ova dva stanja smatraju istom patofiziološkom bolesti vena. Incidencija VTE je u porastu čemu je djelomično razlog povećana svijest i napredak dijagnostičkih metoda. Prema jednoj studiji procijenjena incidencija VTE u europskim zemljama iznosi 131/100 000 stanovnika te je ustanovljeno da incidencija raste sa starijom dobi. Iako je PE ozbiljna klinička manifestacija VTE i mortalitet povezan s PE unutar 3 mjeseca od razvoja iznosi između 8.7 % i 17.4 %, klinička slika PE uvelike se razlikuje među pacijentima; od asimptomatske PE do fatalne PE. Temelj liječenja i sekundarne prevencije VTE jest antikoagulantna terapija. Glavni napredak u liječenju VTE u posljednjem stoljeću bilo je uvođenje direktnih oralnih antikoagulansa (DOAK-a) koji ne samo da pružaju alternativu korištenju antagonista vitamina K već i otvaraju mogućnost potencijalnih različitih strategija liječenja. (Yamashita i sur., 2022)

#### 1.1.2. Hemostaza i koagulacijska kaskada

Hemostaza je fiziološki odgovor na ozljedu krvne žile, pojam dolazi od latinskog *hemostasis* što znači prevenirati gubitak krvi. Riječ je o kompleksnom procesu međusobno povezanih reakcija koje sudjeluju u zaustavljanju krvi prilikom ozljede krvne žile. U cjelokupnom hemostatskom sustavu tri su međusobno povezane faze; primarna hemostaza, sekundarna hemostaza i fibrinoliza.. (Guyton i Hall, 2016; Margetić i Čaržavec, 2018)

Primarna hemostaza predstavlja proces stvaranja trombocitnog ugruška na mjestu ozljede krvne žile. Nakon ozljede endotela, dolazi do oslobađanja proteina subendotelnog matriksa poput kolagena, von Willenbrandovog faktora (vWF), fibrinogena, laminina i fibronektina. Oni se vežu na glikoproteinske (GP) receptore na površini trombocita i time odmah pokreću primarnu hemostazu koja uključuje tri koraka:

1. Adhezija trombocita
2. Aktivacija trombocita
3. Stvaranje trombocitnog ugruška (Repetto i De Re, 2017; Margetić i Čaržavec, 2018)

Sekundarna hemostaza predstavlja aktivaciju faktora zgrušavanja (FZ) i nastanak stabilnog trombocitno-fibrinskog ugruška.

Prema staničnom modelu, zgrušavanje se dijeli u tri faze:

1. Inicijacija
2. Amplifikacija
3. Propagacija

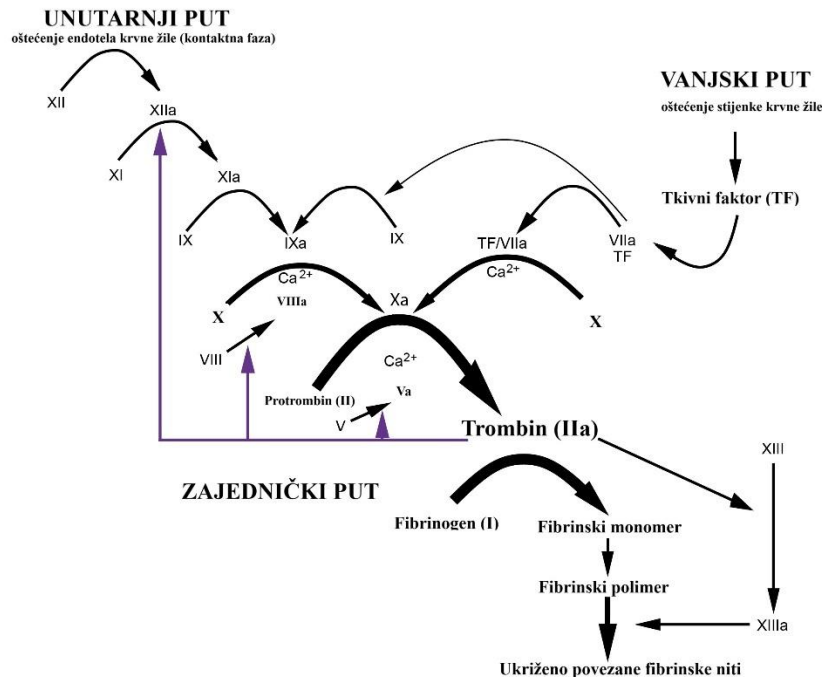
Faza inicijacije započinje oštećenjem krvne žile kad se subendotelne stanice poput glatkih mišićnih stanica i fibroblasta izlože krvotoku. Te stanice sadrže tkivni faktor (TF) koji veže faktor VII (FVII). TF djeluje kao kofaktor za FVII, potičući njegovu proteolitičku aktivaciju u FVIIa. Zatim kompleks TF/FVIIa aktivira faktor IX (FIX) i faktor X (FX) pretvarajući ih u njihove aktivne oblike, FIXa i FXa. FXa ulazi u interakciju s aktiviranim faktorom V (FVa), tvoreći kompleks protrombinaze na površini stanica koje izražavaju TF. Ovaj kompleks pretvara protrombin (FII) u trombin (FIIa).

Trombin koji se polako nakuplja u fazi inicijacije dodatno aktivira trombocite koji su adherirali na mjesto ozljede. Dodatno, trombin pretvara FV u FVa, čime pojačava protrombinaznu aktivnost i pretvara faktor VIII (FVIII) u FVIIIa. FVIIIa djeluje kao kofaktor za FIXa na površini aktiviranih trombocita i podržava generaciju FXa. Nadalje, trombin aktivira faktor XI (FXI) u FXIa i time dodatno pojačava zgrušavanje.

Faza propagacije odvija se na površinama s prokoagulantnim fosfolipidima, kao što su aktivirani trombociti. FXIa pretvara FIX u FIXa, koji se nakon toga povezuje s trombinom aktiviranim FVIIIa. Tenazni kompleks (FIXa/FVIIIa) katalizira pretvorbu FX u FXa. Zatim kompleks FXa/FVa proizvodi dovoljnu količinu trombina za masivno stvaranje fibrinskih niti. Posljednji korak uključuje transglutaminazu FXIIIa aktiviranu trombinom, koja katalizira stvaranje kovalentnih veza između susjednih fibrinskih lanaca što rezultira elastičnim, polimeriziranim fibrinskim ugruškom. (Versteeg i sur., 2013; Margetić i Čaržavec, 2018)

Iako se danas zgrušavanje tumači na temelju staničnog modela, kaskadni model se zadržao jer se s pomoću njega tumače globalni koagulacijski testovi. U kaskadnom modelu razlikujemo vanjski put koji se pokreće s TF koji se izlože u krvotoku nakon oštećenja krvne žile, unutarnji put koji se pokreće kontaktnim putem nakon što određeni faktori u krvi dođu u doticaj s oštećenim kolagenom i zajednički put u kojem se aktivira trombin koji pretvara fibrinogen u

fibrin i tako omogućava stvaranje stabilnog krvnog ugruška. (Guyton i Hall, 2016; Katzung i sur., 2020; Versteeg i sur., 2013)



Slika 1.: Shematski prikaz koagulacijske kaskade

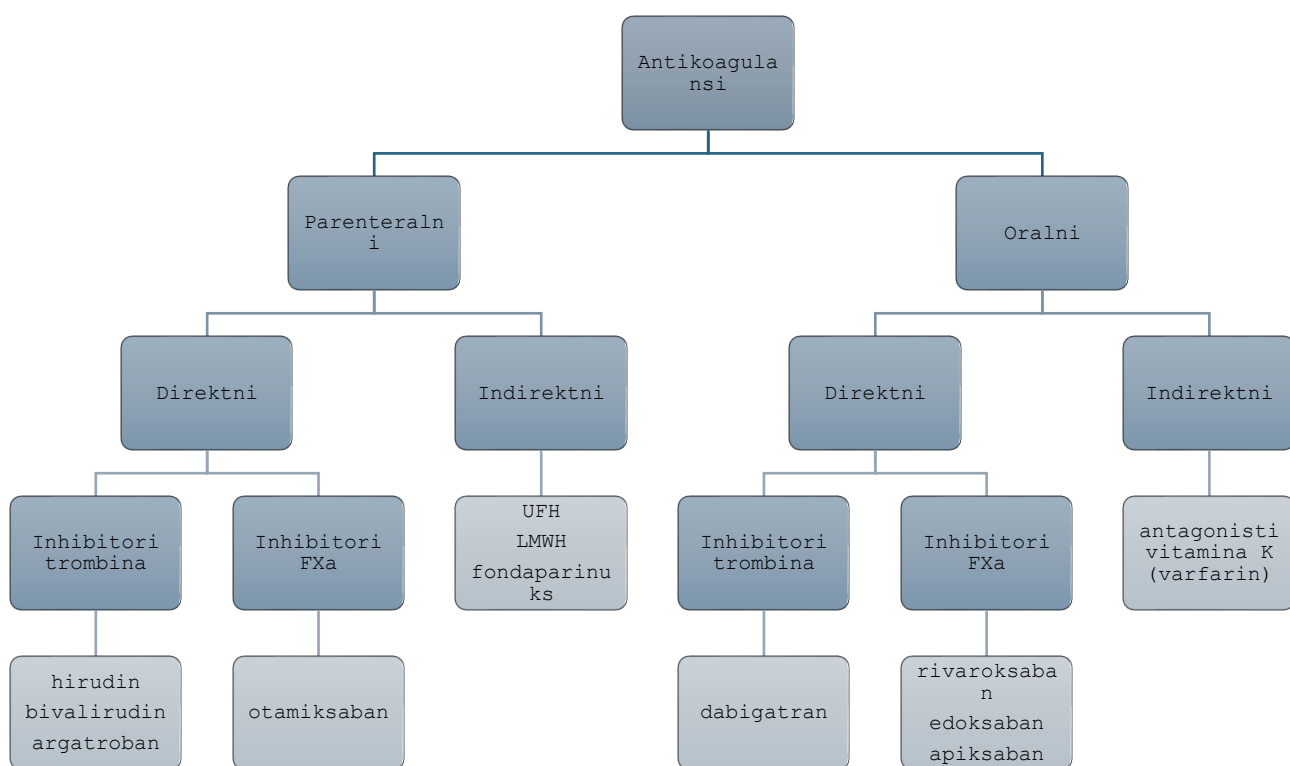
(preuzeto i prilagođeno prema Screening Tests in Haemostasis: The Thrombin Time (practical-haemostasis.com))

Fibrinoliza je proces odgovoran za razgradnju fibrinskog ugruška, a koji djeluje kroz dva suprotstavljena mehanizma koji reguliraju aktivaciju plazminogena u plazmin. Plazmin je fibrin-specifična serinska proteaza koja otapa fibrinski ugrušak u topljive produkte razgradnje fibrina. Dva su značajna aktivatora; tkivni aktivator plazminogena (t-PA) i urokinazni aktivator plazminogena (u-PA). S druge strane, ključni inhibitori su inhibitor fibrinolize aktiviran trombinom (TAFI), inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1) i  $\alpha$ -2 antiplazmin. (Katzung i sur., 2020; Franchini i Manucci, 2018)



### 1.1.3. Antikoagulansi - definicija i podjela

Antikoagulansi su lijekovi koji svoj učinak ostvaruju interferiranjem s koagulacijskom kaskadom. Postoji više načina podjele antikoagulansa; najčešće ih dijelimo prema načinu primjene na oralne i parenteralne, ali se dijele i prema mehanizmu djelovanja s obzirom na dio koagulacijske kaskade u kojem djeluju i ostvaruju li učinak direktno ili indirektno. Kad govorimo o njihovom dolasku na tržište, možemo ih podijeliti na starije i novije antikoagulanse. (Katzung i sur., 2020)



Slika 2. Podjela antikoagulansa prema načinu primjene i mehanizmu djelovanja (prilagođeno prema De Caterina i sur., 2013)

## 1.2. TRADICIONALNI ANTIKOAGULANSI

### 1.2.1. Povijesni razvoj prvih antikoagulansa

#### 1.2.1.1. Razvoj heparina i njegovih derivata

Heparin je otkrio McLean radeći kao student medicine 1915. godine u potrazi za čistim prokoagulansom u jetri psa. Njegov izvorni nečisti materijal donekle se razlikovao od današnjeg heparina, ali pročišćeni heparin brzo je prihvaćen za veliki broj kliničkih primjena. (Mueller i Scheidt, 1994) Danas razlikujemo nefrakcionirani heparin (engl. *unfractionated heparin*, UFH) poznat i kao heparin velike molekulske mase (engl. *high molecular weight heparin*, HMWH), heparine male molekulske mase (engl. *low-molecular-weight-heparins*, LMWH) te sintetski pentasaharid fondaparinuks. (Katzung i sur., 2020) LMW heparini razvijeni su u osamdesetim godinama 20. stoljeća, a dobivaju se cijepanjem nefrakcioniranog heparina izoliranog iz sluznice svinjskog crijeva ili pluća goveda. (Hao i sur., 2019)

#### 1.2.1.2. Razvoj varfarina i kumarinskih antikoagulansa

Do otkrića kumarinskih antikoagulansa došlo je nakon veterinarskih istraživanja hemoragijske bolesti goveda koja se razvila u životinja izloženih pokvarenim zalihama usladištenog žutog kokotca (lat. *Melilotus officinalis*), a u kojih je otkrivena antikoagulantna tvar. Nakon zahtjeva lokalnih farmera, kemičar Karl Link i njegov tim na Sveučilištu Wisconsin otkrivaju otrovnu tvar i identificiraju je kao bishidroksikumarin. U početku su njegov sintetski derivat dikumarol i srodni spojevi, a prije svega varfarin primjenjivani kao rodenticidi. Varfarin je dobio ime prema Sveučilištu na kojem je otkriven, na engleskom je poznat kao *warfarin* što dolazi od Wisconsin Alumni Research Foundation uz dodatak nastavka „arin“ za identifikaciju kumarinskog podrijetla. U humanu medicinu u službi antitrombotske tvari uveden je tijekom 1950-ih godina, a danas je jedan od najpropisivanijih lijekova. (Katzung i sur., 2020; Mueller i Scheidt, 1994)

### 1.2.2. Kemijska svojstva i mehanizam djelovanja

#### 1.2.2.1. Heparini

Heparin predstavlja heterogenu smjesu anionskih sulfatnih glikozaminoglikanskih polimera čija je molekulska masa u rasponu od 3000 do 30 000 Da i koja se veže za površinu endotelnih stanica te brojnih plazmatskih proteina. Heparin pripada skupini antikoagulansa koju nazivamo indirektnim inhibitorima trombina jer svoj antitrombotski učinak temelje na interakciji s endogenim antikoagulansom antitrombinom. Antitrombin inhibira koagulacijske proteaze, posebno trombin (IIa), IXa i Xa tako što s njima tvori stabilne ekvimolarne komplekse. Riječ

je o sporom procesu koji je u prisutnosti heparina ubrzan i do tisuću puta. (Katzung i sur., 2020; [www.go.drugbank.com](http://www.go.drugbank.com))

LMWH se od UFH-a razlikuju po sljedećem: prosječna molekulska masa LMWH-a je 4.5 kDa dok je za UFH ta vrijednost 15 kDa; UFH zahtijevaju kontinuiranu infuziju; prilikom primjene UFH-a potrebno je praćenje APTV (aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena); UFH imaju veći rizik od krvarenja i veći rizik od razvoja osteoporoze kod dugotrajne primjene. Učinci UFH-a mogu se poništiti primjenom specifičnog antidota protamin sulfata. ([www.go.drugbank.com](http://www.go.drugbank.com)) U usporedbi s UFH-om, LMWH pokazuju otprilike jednaku djelotvornost te bolju bioraspoloživost nakon supkutane primjene, a zbog duljeg poluvremena života primjenjuju se manje često (jednom ili dva puta dnevno). (Katzung i sur., 2020; Hao i sur., 2019) U Republici Hrvatskoj registrirani su enoksaparin, nadroparin i dalteparin. ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr))

#### **1.2.2.2. Varfarin**

Varfarin je racemična smjesa dvaju enantiomera u omjeru 1:1 pri čemu je S-varfarin potentniji od R-varfarina što je ključno za razumijevanje stereoselektivne prirode određenih interakcija varfarina s drugim lijekovima. Otprilike je 99 % varfarina vezano za albumine plazme. Uglavnom se primjenjuje u obliku natrijeve soli, a ima apsolutnu bioraspoloživost od 100 %. (Katzung i sur., 2020)

Kumarinski antikoagulansi, poznati i kao antagonisti vitamina K, bili su prvi oralni antikoagulansi što im je dalo znatnu prednost u odnosu na parenteralne heparine. Donedavno, bili su zlatni standard za oralnu terapiju antikoagulansima. (Heestermans i sur., 2022) Blokiraju  $\gamma$ -karboksilaciju određenih glutaminskih ostataka na protrombinu, FVII, FIX i FX te antikoagulantnim proteinima C i S koji se sintetiziraju u jetri što rezultira stvaranjem nepotpunih, biološki inaktivnih faktora zgrušavanja. Reakcija karboksilacije direktno je povezana uz oksidaciju vitamina K do inaktivnog vitamin K epoksida. Vitamin K se tada, da bi se reaktivirao, mora reducirati do aktivnog hidrokinonskog oblika. Upravo je taj korak takozvanog ciklusa vitamina K osjetljiv na varfarin koji onemogućuje redukciju epoksida do hidrokinona. Za individualizaciju terapije varfarinom značajna su dva gena sklona polimorfizmima; gen za enzim vitamin K epoksid reduktazu (VKORC1) te gen za enzim CYP2C9. (Katzung i sur., 2020)

### **1.2.3. Ograničenja ranijih antikoagulansa**

#### **1.2.3.1 Heparini**

Primarni sigurnosni problem primjene svih antikoagulansa, pa tako i heparina, jest rizik od razvoja krvarenja. Pažljivim probirom bolesnika, doziranjem i strogom kontrolom učinka taj se rizik može smanjiti. (Katzung i sur., 2020) U pacijenata koji primaju UFH potrebno je redovito praćenje aktivirano parcijalno tromboplastinskog vremena (APTV). (Katzung i sur., 2020)

Veliki je nedostatak heparina, ujedno i razlog velike popularnosti oralnih antagonista vitamina K nakon dolaska na tržište, njihova parenteralna primjena; riječ je o intravenskoj ili supkutanoj primjeni. (Heestermans i sur., 2023)

Heparinom inducirana trombocitopenija (HIT) životno je ugrožavajuće, imunološki posredovano stanje povezano s primjenom heparina i predstavlja njihov najveći nedostatak. Iako se češće veže uz primjenu UFH, postoje podatci o pojavi HIT-a u pacijenata koji su primali LMWH. HIT karakterizira razvoj protutijela na FIV vezan za heparin što dovodi do trombocitopenije, arterijske tromboze i/ili venske tromboze. Čak i uz rano otkrivanje i intervenciju, morbiditet i mortalitet iznose 7.4 % i 1.1 %. (Heestermans i sur., 2022; Yen Ng i sur., 2024) Kod svakog pacijenta liječenog heparinom potrebna je redovita kontrola broja trombocita, a svaka trombocitopenija koja se javi unutar vremena u kojemu nastaju imunoreakcije na heparin treba se smatrati suspektom na HIT te svaka pojava novog tromba može značiti potencijalni razvoj HIT-a. Kod bolesnika u kojih se HIT razvio, heparin se isključuje iz terapije i primjenjuje se fondaparinuks ili direktni inhibitor trombina. (Katzung i sur., 2020)

#### **1.2.3.2 Varfarin**

Iako je oralna primjena velik napredak, antagonisti vitamina K imaju brojne nedostatke. Za početak, varfarinu je potrebno 3-7 dana da ostvari svoj optimalni terapijski učinak. Liječenje se započinje standardnom dozom 5-10 mg/dan, a nakon početne prilagodbe protrombinskog vremena uvodi se doza održavanja 5-7 mg/dan. Osim toga, doziranje varfarina valja redovito provjeravati provođenjem koagulacijskih pretraga kojima se određuje INR na temelju PV testa. Prema vrijednostima INR-a prilagođava se doza lijeka. (Heestermans i sur., 2022; Katzung i sur., 2020)

Varfarin je lijek uske terapijske širine koji ulazi u brojne interakcije s drugim lijekovima i hranom. Komercijalno dostupan varfarin je racemična smjesa dva aktivna stereoisomera: pet puta potentnijeg S-enantiomera metaboliziranog putem CYP2C9 enzima i R-izomera, primarno

metaboliziranog putem CPY3A4. Lijek-lijek interakcije vezane uz varfarin najčešće uključuju umjerene do snažne inhibitore/induktore CYP enzima. (Mar i sur., 2023)

Iako većinu hrane, biljnih pripravaka i suplemenata pacijenti na varfarinu mogu sigurno primjenjivati u umjerenim količinama, važno je biti svjestan povećanog rizika od krvarenja kod konzumacije određene hrane i biljnih pripravaka, a što uključuje: gospinu travu, ginkgo, zeleni čaj, brusnicu, čaj od kamilice, sushi, kanabis, đumbir i pušenje duhana. Pacijente valja upozoriti da se savjetuju sa zdravstvenim djelatnikom prije uvođenja nove hrane, biljnih pripravaka ili suplemenata. (Tan i Lee, 2021)

### **1.3. UVOĐENJE DIREKTNIH ORALNIH ANTIKOAGULANSA (DOAK-a)**

#### **1.3.1. Razvoj DOAK-a**

Antagonisti vitamina K, prije svega varfarin, bili su uporište antikoagulantne terapije tijekom prošlog stoljeća dok se, u prvom desetljeću 21. stoljeća nije pojavila nova klasa oralnih antikoagulanasa. Riječ je o lijekovima koji su postali poznati kao novi oralni antikoagulansi (*new oral anticoagulants*, NOAC/NOAK), kasnije preimenovani u ne-vitamin K oralne antikoagulanse (*non-vitamin K anticoagulants*), a danas, utemeljeno na njihovoj farmakodinamici, zvane direktnim oralnim antikoagulasnima (*direct oral anticoagulants*, DOAC/DOAK). (Olie i sur., 2024) Prema Međunarodnom društvu za trombozu i hemostazu (*International Society on Thrombosis and Hemostasis*), DOAK je preferirani termin. (Umerah i Momodu, 2023)

DOAK-e dijelimo prema načinu djelovanja u dvije skupine, direktne inhibitore FXa (rivaroksaban, apiksaban, edoksaban, betriksaban) i direktne inhibitore trombina (dabigatran). U 2010. američka Udruga za hranu i lijekove (FDA, *Food and Drug Administration*) odobrila je prvi DOAK, dabigatran, a u godinama iza i inhibitore FXa. (Chen i sur., 2020)

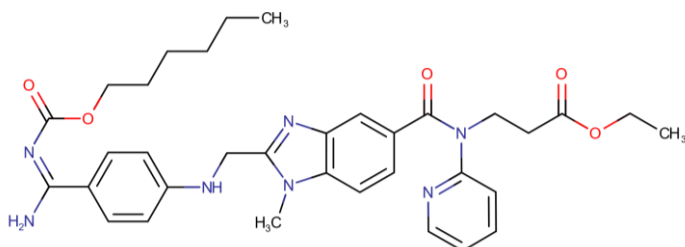
U Republici Hrvatskoj registrirani su dabigatran, rivaroksaban, edoksaban i apiksaban, ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr))

Direktni oralni antikoagulansi dizajnirani su kako bi mogli biti primjenjivani u fiksnim dozama bez potrebe za rutinskim praćenjem; imaju manju sklonost za interakcije s hranom i drugim lijekovima u odnosu na antagoniste vitamina K i u randomiziranim kontroliranim studijama u koje je bilo uključeno oko 250 000 pacijenata pokazalo se da su barem jednako učinkoviti u prevenciji i liječenju tromboza te su bili povezani s manjim rizikom od životno ugrožavajućeg

krvarenja. Apsolutni benefiti DOAK-a u odnosu na antagoniste vitamina K su skromni; ipak, smjernice ih preferiraju za većinu indikacija zbog jednostavne primjene i dobrog sigurnosnog profila. Zbog pojave sve većeg broja generičkih pripravaka očekuje se daljnji porast upotrebe DOAK-a, posebice u zemljama u kojima trenutno nisu u širokoj primjeni iz financijskih razloga. (Chan i sur., 2020)

DOAK-i su kontraindicirani u pacijenata s mehaničkim srčanim zaliscima i trebaju se primjenjivati uz oprez ili izbjegavati u pacijenata s oštećenjem bubrežne ili jetrene funkcije. (Chan i sur., 2020)

### 1.3.2. Dabigatran eteksilat mesilat



Slika 3. Prikaz kemijske strukture dabigatran eteksilat mesilata

(izvor: <https://go.drugbank.com/structures/DB06695/image.svg>)

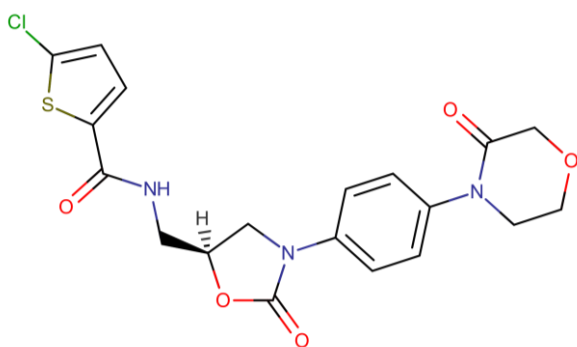
Dabigatran eteksilat mesilat prvi je odobreni direktni oralni antikoagulans i jedini lijek iz skupine direktnih inhibitora trombina u medicinskoj upotrebi. (Katzung i sur., 2020) Indiciran je u primarnoj prevenciji venskih tromboembolijskih događaja (VTE-a) u odraslih bolesnika podvrgnutih kirurškom zahvatu ugradnje totalne endoproteze kuka ili koljena, prevenciji moždanog udara u bolesnika s nevalvularnom fibrilacijom atriya (NVAf), liječenju i prevenciji duboke venske tromboze (DVT) i plućne embolije (PE) te liječenju i prevenciji VTE-a u pedijatrijskoj populaciji. ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu))

Riječ je o prolijeku koji je nakon oralne primjene hidroliziran intestinalnim i hepatskim karboksilesterazama do aktivnog dabigatrana. Dabigatran je reverzibilni kompetitivni inhibitor trombina koji izravno inhibira konverziju fibrinogena u fibrin čime narušava proces zgrušavanja. ([www.go.drugbank.com](http://www.go.drugbank.com))

Bioraspoloživost dabigatrana je 3-7 %, a eliminira se većinski bubrežima zbog čega je potrebna prilagodba doze u bubrežnih bolesnika. Supstrat je P-glikoproteina pa ulazi u interakcije s inhibitorima i induktorima P-gp. Glavni je štetni učinak, kao i u ostalih antikoagulansa, krvarenje. U slučajevima potrebe za hitnim prekidom antitrombinskog djelovanja, intravenski se primjenjuje antidot idarucizumab, Fab fragment humaniziranog monoklonskog protutijela protiv dabigatana. (Katzung i sur., 2020)

### 1.3.3. Direktni inhibitori FXa

#### 1.3.3.1. Rivaroksaban



Slika 4. Prikaz kemijske strukture rivaroksabana

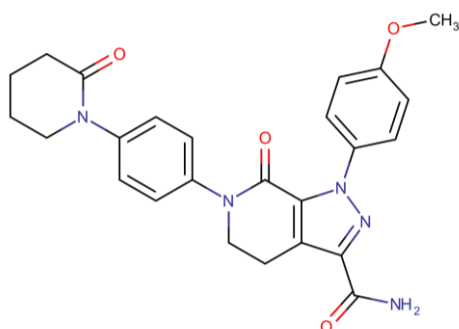
(izvor: <https://go.drugbank.com/structures/DB06228/image.svg>)

Rivaroksaban je inhibitor FXa odobren za prevenciju VTE u odraslih bolesnika podvrgnutih elektivnom kirurškom zahvatu ugradnje umjetnog kuka ili koljena, liječenje i sekundarnu prevenciju DVT-a i PE-a, prevenciju moždanog udara i sistemske embolije u odraslih bolesnika s NVAF te u kombinaciji samo s acetilsalicilatnom kiselinom (ASK) ili s ASK-om uz klopido­gre­l ili tiklopidin, indiciran je za prevenciju aterotrombotskih incidenata u odraslih pacijenata nakon akutnog koronarnog sindroma s povišenim srčanim biomarkerima. ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu))

Nakon oralne primjene, rivaroksaban se brzo apsorbira i postiže vršnu koncentraciju unutar 2-4 sata. Bioraspoloživost doze od 10 mg iznosi više od 80 %, a doze od 15 i 20 mg imaju nižu bioraspoloživost pa se moraju uzimati s hranom. ([www.go.drugbank.com](http://www.go.drugbank.com)) Supstrat je za CYP3A4 i P-gp pa ulazi u interakcije s induktorima i inhibitorima istih. Lijekovi koji ih istovremeno inhibiraju uvelike će povećati učinak rivaroksabana. (Katzung i sur., 2020) Otprilike se dvije trećine lijeka izluči nepromijenjeno urinom, a ostatak urinom i stolicom. Poluvijek eliminacije dulji je u starijih bolesnika i onih s oštećenjem funkcije bubrega ili jetre.

(Katzung i sur., 2020; [www.go.drugbank.com](http://www.go.drugbank.com)) U pacijenata s teškim oštećenjem funkcije bubrega (klirens kreatinina < 30 mL/min) potreban je oprez i prilagodba doze lijeka zbog mogućeg povećanja razine rivaroksabana u plazmi i posljedično većeg rizika od krvarenja. Primjena lijeka ne preporučuje se u bolesnika s klirensom kreatinina < 15 mL/min. ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu))

### 1.3.3.2. Apiksaban



Slika 5. Prikaz kemijske strukture apiksabana

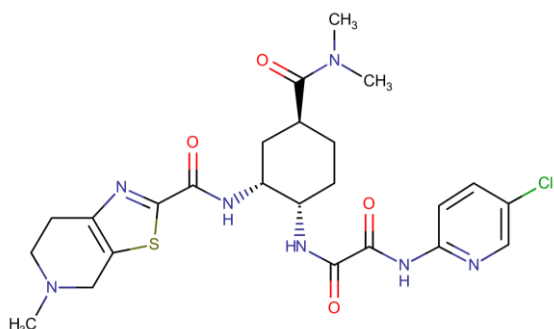
(izvor: <https://go.drugbank.com/structures/DB06605/image.svg>)

Apiksaban, lijek iz skupine inhibitora FXa, odobren je za prevenciju VTE u odraslih ljudi podvrgnutih ugradnji endoproteze zgloba kuka ili koljena, prevenciju moždanog udara i sistemske embolije u bolesnika s NVAF te za liječenje i prevenciju ponavljajućih DVT i PE. ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu))

Nakon oralne primjene bioraspoloživost iznosi 50 %, uzima se neovisno o hrani, a vršne koncentracije postižu se nakon 2.5-4 sata. (Hindley B i sur., 2023) Inhibicija CYP3A4 i P-gp te oštećena jetrena i bubrežna funkcija povećavaju bioraspoloživost apiksabana, time učinak i rizik od krvarenja. (Katzung i sur., 2020) U bolesnika s teškom oštećenom funkcijom bubrega (klirens kreatinina 15-29 mL/min) u slučaju primjene lijeka za indikaciju prevencije moždanog udara i sistemske embolije u bolesnika s NVAF doza se smanjuje na 2,5 mg dvaput na dan, a u slučaju ostalih indikacija lijek se nastavlja primjenjivati uz oprez. U bolesnika s klirensom kreatinina < 15 mL/min primjena apiksabana se ne preporučuje. Kontraindiciran je u odraslih bolesnika s bolešću jetre udruženom s koagulopatijom i klinički značajnim rizikom od krvarenja. ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu))



### 1.3.3.3. Edoksaban



Slika 6. Prikaz kemijske strukture edoksabana

(izvor: <https://go.drugbank.com/structures/DB09075/image.svg>)

Edoksaban je indiciran za liječenje i prevenciju ponavljajućih DVT i PE te za prevenciju moždanog udara i sistemske embolije u odraslih pacijenata s NVAf. ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu))

Apsolutna oralna bioraspoloživost iznosi približno 60 %, uzima se neovisno o hrani, a vršne koncentracije postižu se nakon 1-2 sata. Eliminira se nepromijenjen bubrezima pa je u slučaju oštećene bubrežne funkcije potrebna prilagodba doze. (Hindley B i sur., 2023) Bubrežnu funkciju treba procijeniti u svih bolesnika prije početka terapije edoksabanom izračunavanjem klirensa kreatinina kako bi se isključili bolesnici u terminalnom stadiju bubrežne bolesti (klirens kreatinina < 15 mL/min) te ispravno odredila doza za one s klirensom kreatinina 15-50 mL/min. ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu))

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Tromboembolijske bolesti zbog visoke pojavnosti i visokog morbiditeta i mortaliteta predstavljaju velik problem javnog zdravstva svih razvijenih zemalja svijeta. Primarni način prevencije i liječenja ovih bolesti čine antikoagulantni lijekovi pa ne čude stalni naponi za napretkom i pronalaženjem novijih, naprednijih lijekova kako bi se pacijentima pružila što bolja skrb. Zadnjih desetak godina, nakon otkrića i uvođenja DOAK-a na tržište oni zbog svoje jednostavne primjene i dobrog sigurnosnog profila polako zamjenjuju antagoniste vitamina K koji, iako učinkoviti, imaju brojna ograničenja. Antagonisti vitamina K ulaze u brojne interakcije s hranom i drugim lijekovima, imaju usku terapijsku širinu i zahtijevaju redovito laboratorijsko praćenje. Kao jedna od prednosti DOAK-a često se navodi činjenica da njihova primjena ne zahtijeva redovito praćenje jer se doziranje ne temelji na rezultatima koagulacijskih pretraga. Ipak, dosadašnja klinička iskustva pokazuju da je u određenim kliničkim stanjima i populacijama bolesnika potrebno odrediti koncentraciju DOAK-a u plazmi, prije svega kao pomoć prilikom donošenja odluka u hitnim stanjima, ali i za procjenu antikoagulantnog učinka lijeka u određenih pacijenata. Ovaj rad donosi pregled razvoja antikoagulantnih lijekova, njihove karakteristike i ograničenja te opisuje utjecaj DOAK-a na probirne koagulacijske pretrage kao i pretrage koje se koriste u svrhu određivanja koncentracije ove nove skupine lijekova.

### 3. MATERIJALI I METODE

U svrhu pisanja ovog preglednog diplomskog rada pretraživane su bibliografske baze podataka PubMed Central, Web Of Science, Drugbank, Hrčak prema ključnim riječima: *anticoagulant, apixaban, edoxaban, rivaroxaban, dabigatran, DOACs, NOACs, direct oral anticoagulants, oral anticoagulants, warfarin, heparin, HIT, prothrombin time, INR, aPTT, activated partial prothrombin time, thrombin time, coagulation tests, laboratory diagnostics of DOACs, laboratory monitoring of DOACs, dTT, ecarin assays, anti FIIa test, anti FXa test...* Proučavana je i stručna literatura na temu farmakoloških karakteristika antikoagulansa te fiziologije koagulacije. Pregledane su mrežne stranice hrvatske Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), Europske agencije za lijekove (EMA) te Svjetske zdravstvene organizacije (WHO).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. INDIKACIJE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DOAK-a

Iako je općenito prihvaćeno da kod pacijenata liječenih DOAK-ima nije potrebno rutinsko laboratorijsko praćenje, postoje kumulativni dokazi prikaza slučajeva pacijenata s teškim krvarenjem i regulatorni dokumenti povezani sa supratrapeutskim koncentracijama DOAK-a i krvarenjem te je prepoznata potreba za mjerenjem koncentracije DOAK-a u plazmi u posebnim kliničkim situacijama. (Margetić i sur., 2022)

Preporuka je odrediti koncentraciju DOAK-a u plazmi u nekih situacija koje nisu hitne, a uključuju stariju životnu dob pacijenta, teško zatajenje bubrega, pacijente na dijalizi, prije intervencije s visokim rizikom od krvarenja, ekstremitetima u tjelesnoj masi ( $BMI > 40 \text{ kg/m}^2$ ) i lijek-lijek interakcije. Nadalje, koncentraciju DOAK-a u plazmi valja odrediti i u hitnim kliničkim situacijama akutnog krvarenja i određivanja strategije za reverziju antikoagulacijskog učinka. (Douxflis i sur., 2021)

Tablica 1. Indikacije za određivanje koncentracije DOAK-a u situacija koje nisu hitne; prema smjernicama Međunarodnog vijeća za standardizaciju u hematologiji, ICSH-a (engl. *International Council for Standardization in Haematology*), iz 2021. godine

(prilagođeno prema Douxflis i sur., 2021)

<i>Indikacija</i>	<i>Obrazloženje</i>
<i>Situacije koje nisu hitne</i>	
<i>Starija životna dob</i>	Porast stope krvarenja s dobi i povećana sklonost krvarenju zbog nakupljanja DOAK-a.
<i>Teško bubrežno zatajenje i dijaliza</i>	Povećane koncentracije DOAK-a, posebno za dabigatran, rivaroksaban, edoksaban. Prema PK* studijama manji je učinak na apiksaban.
<i>Prije intervencije s visokim rizikom krvarenja</i>	Intervencije s visokim rizikom krvarenja provoditi u pacijenata s nultom ili nedetektabilnom koncentracijom DOAK-a. PK* pristup nije povoljna opcija jer brojne

*BMI (indeks tjelesne mase) > 40 kg/m<sup>2</sup>*

*Lijek-lijek interakcije*

varijable utječu na eliminaciju DOAK-a.

Racionalno rješenje je određivanje koncentracije.

Za pacijente s BMI > 40 kg/m<sup>2</sup> koji primjenjuju DOAK-e korisno je odrediti maksimalnu i minimalnu koncentraciju lijeka u plazmi nakon najmanje 5 doza radi osiguranja da su koncentracije u plazmi unutar raspona koji vrijedi za druge pacijente.

Procjena koncentracije DOAK-a može pomoći utvrditi dolazi li do akumulacije odnosno eliminacije lijeka uslijed interakcija s drugim lijekovima.

\*PK: farmakokinetiski

Tablica 2. Indikacije za određivanje koncentracije DOAK-a u hitnih situacija; prema smjericama Međunarodnog vijeća za standardizaciju u hematologiji, ICSH-a (engl. International Council for Standardization in Haematology) iz 2021. godine (prilagođeno prema Douxfils i sur., 2021)

<i>Indikacija</i>	<i>Obrazloženje</i>
<i>Hitne situacije</i>	
<i>Akutno krvarenje i određivanje odgovarajućih strategija reverzije</i>	Mjerenje koncentracije DOAK-a u plazmi pomaže u određivanju njihova doprinosa krvarenju te utvrđivanju kad je sigurno provesti hitnu ili neplaniranu intervenciju. Također, važno je procijeniti mogući <i>rebound</i> učinak nakon primjene antidota.

Postupak zbrinjavanja krvarenja u pacijenta koji je na terapiji DOAK-ima ovisi o naravi krvarenja, bubrežnoj funkciji i vremenu uzimanja posljednje doze lijeka, ali uvijek je obvezno prekinuti ili odgoditi uzimanje DOAK-a. Uvijek treba provesti opće mjere zbrinjavanja krvarenja što uključuje lokalnu kompresiju, kiruršku obradu, nadoknadu volumena, korekciju

broja trombocita, održavanje diureze i primjenu koncentrata eritrocita. Pri planiranju zbrinjavanja krvarenja potrebno je odrediti bubrežnu funkciju (mjerenje serumskog kreatinina i procjena brzine glomerularne filtracije) i antikoagulantni učinak, ali ta procedura ovisi o mogućnostima određenog laboratorija. Ako se općim mjerama ne može uspostaviti kontrola krvarenja i u slučajevima životno ugrožavajućih krvarenja, treba razmotriti upotrebu specifičnih antidota. (Gornik i sur., 2017) Trenutno su odobrena dva antidota od strane FDA: idarucizumab za dabigatran i andeksanet- $\alpha$  za rivaroksaban i apiksaban. Riječ je o specifičnim antidotima koji se vežu za aktivni lijek i vrlo brzo inhibiraju antikoagulacijski učinak. (Baugh i sur., 2019) Oni se primjenjuju na temelju koncentracija DOAK-a u plazmi, a postavljene granične vrijednosti za hitne medicinske intervencije s visokim rizikom krvarenja iznose od 30 do 50 ng/mL. (Papageorgiu i sur., 2023) U pacijenata s ozbiljnim krvarenjem, koncentracija DOAK-a veća od 50 ng/mL smatra se dovoljno visokom da opravda primjenu antidota. U onih koji zahtijevaju hitnu intervenciju povezanu s visokim rizikom od krvarenja, primjena antidota trebala bi se razmotriti ako je koncentracija DOAK-a veća od 30 ng/mL. (Douxflis i sur., 2021)

## 4.2. PROBIRNI KOAGULACIJSKI TESTOVI

### 4.2.1. PROTROMBINSKO VRIJEME

Protrombinsko vrijeme ili PV (engl. *prothrombin time*, PT) najčešće je korišten koagulacijski test koji su u upotrebu prvi uveli američki liječnik Armand Quick i njegovi kolege 1935. godine. PV se koristi za praćenje pacijenata koji primjenjuju antagoniste vitamina K te za procjenu nasljednog i stečenog manjka FII, FV, FVII, FX i fibrinogena te prisutnosti njihovih inhibitora. PV je probirni test koji koristimo za ispitivanje vanjskog (puta tkivnog faktora) i zajedničkog koagulacijskog puta te stoga na njega utječe aktivnost FII, FV, FVII, FX i fibrinogena. Test mjeri vrijeme (izraženo u sekundama) potrebno za formiranje fibrinskog ugruška nakon dodatka optimalne količine tkivnog tromboplastina (sadrži tkivni faktor, fosfolipide i kalcijev klorid) u plazmu siromašnu trombocitima (engl. *platelet-poor plasma*, PPP). (Dorgalaleh i sur., 2021; Bronić, 2019)

Produljenje PV-a mogu uzrokovati deficijencije FVII, FX, FV, FII, fibrinogena ili protutijela na navedene faktore. Također, test je abnormalan u pacijenata s inhibitorima konverzije fibrinogena u fibrin, uključujući visoke doze heparina i prisutnost produkata razgradnje fibrina. Uobičajeno PV reagensi sadrže višak fosfolipida kako nespecifični inhibitori (tj., endogeni lupusni antikoagulans) koji reagiraju s anionskim fosfolipidima, ne bi produljili vrijeme zgrušavanja. Najčešća upotreba PV testa je redovito praćenje pacijenata na varfarinu. (Bates i Weitz, 2005)

Tromboplastinski reagens ključna je komponenta PV testa. Riječ je o kombinaciji tkivnog faktora (TF-a), lipida i kalcijeva klorida. Tromboplastinski reagensi mogu potjecati od ljudskog ili životinjskog tkiva (mozga ili posteljice) ili se mogu dobiti proizvodnjom rekombinantnog humanog TF-a unutar fosfolipidnih vezikula. Upotreba različitih izvora TF-a dovodi do varijacija u rezultatima PV-a. Značaj ovog javio se nakon što su zemlje Sjeverne Amerike počele koristiti zečji tromboplastinski reagens za praćenje antikoagulacije koji se pokazao manje osjetljiv u odnosu na humani tromboplastinski reagens korišten u Ujedinjenom Kraljevstvu (UK) i ostatku svijeta. Američki su liječnici, prema rezultatima PV testova, propisivali više doze antagonista vitamina K u odnosu na britanske liječnike. Pokazalo se da pacijenata s krvarenjem ima pet puta više u zemljama Sjeverne Amerike nego u UK-u. Postala je jasna potreba za boljom standardizacijom rezultata PV testova; prvi pokušaji započeli su 1962. i rezultirali uvođenjem britanskog komparativnog tromboplastina (engl. *British Comparative Thromboplastin*, BCT) 1969. godine. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) u 1983., nakon daljnjeg procesa standardizacije, predstavlja

internacionalni normalizirani omjer (engl. *International Normalised Ratio*, INR). (Dorgalaleh i sur., 2021)

$$\text{INR} = (\text{PR})^{\text{ISI}}$$

ili

$$\text{INR} = [ \text{PV (s) bolesnika} / \text{MNPV (s)} ]^{\text{ISI}}$$

\*PV – vrijeme u sekundama izmjereno kod bolesnika

\*PR – omjer PV-a, predstavlja omjer PV-a u sekundama izmjerenog kod bolesnika prema MNPV-u

\*MNPV – srednje normalno protrombinsko vrijeme, predstavlja geometrijsku sredinu vrijednosti PV-a dobivenih od najmanje 20 zdravih dobrovoljaca

\*ISI – indeks osjetljivosti za odgovarajući PV reagens

Korekcijski faktor ISI označava međunarodni indeks osjetljivosti (engl. *International Sensitivity Indeks*) koji ovisi o vrsti reagensa i instrumenata korištenih prilikom određivanja PV-a, a služi tome da se izmjereni PV stavi u odnos s referentnim tromboplastinskim standardom WHO-a. Time se postiže isti INR rezultat prilikom mjerenja PV-a u istom uzorku ali na različitim instrumentima i uz pomoć različitih tromboplastinskih reagensa.

PV se mjeri u sekundama, a koagulabilnost krvi se izražava kao postotak aktivnosti od normalne vrijednosti. U odraslih osoba koje nisu na terapiji antagonistima vitamina K vrijednost PV je >70 %. Vrijednost PV < 70 % ukazuje na hipokoagulabilnost krvi. Samo za bolesnike na terapiji antagonistima vitamina K rezultati PV trebaju se izvještavati kao INR. Optimalne vrijednosti INR-a u profilaski i liječenju tromboembolijskih bolesti iznose 2-3, a u slučaju bolesnika s umjetnim srčanim zaliscima ili u drugim stanjima sa značajno povišenim rizikom od trombotskih incidenata preporučeni INR je 2,0-3,5. Vrijednost INR iznad preporučenog terapijskog intervala ukazuje na povećani rizik od krvarenje, a vrijednosti ispod terapijskog intervala na povećani rizik od tromboze. (Katzung i sur., 2020; Bronić, 2019)



#### 4.2.2. AKTIVIRANO PARCIJALNO TROMBOPLASTINSKO VRIJEME

Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme ili APTV (engl. *activated partial thromboplastin time*, aPTT) probirni je test koji se koristi u procjeni manjka FVIII, FIX, FXI, FXII i prisutnosti njihovih inhibitora. Ovaj se test koristi od 1953. godine, a 1961. bio je značajno modificiran čime je postao vrlo sličan testu koji se danas koristi. Svaki APTV reagens sadrži kontaktni aktivator (silicijev dioksid, kaolin, elaginsku kiselinu) i fosfolipide različitog podrijetla, ali ne sadrži tkivni faktor te se naziva „parcijalni tromboplastin“. Inkubacijom plazme s optimalnom količinom fosfolipida i površinskog aktivatora uz dodatak kalcijevih iona pokreće se aktivacija čimbenika unutarnjeg puta zgrušavanja što rezultira pretvorbom fibrinogena u fibrin. (Santoro i sur., 2023; Ignjatovic, 2013; Bronić, 2019)

APTV mjeri se u sekundama, a izmjereni rezultati također ovise o korištenom reagensu i analizatoru. APTV reagensi razlikuju se prema osjetljivosti na FZ, terapiju UFH-om i lupus antikoagulans zbog različitog sastava fosfolipida i aktivatora. Zbog ove različite osjetljivosti APTV reagenasa, izvještavanje APTV isključivo u sekundama može rezultirati neodgovarajućom usporedivošću rezultata među laboratorijima. Na nalazu se uz rezultat izražen u sekundama uvijek izvještava i omjer APTV (izračunava se dijeljenjem bolesnikovog APTV-a sa srednjom vrijednošću referentnog intervala za određeni sustav reagensa i koagulometra). (Bronić, 2019)

Kako ovaj test mjeri vrijeme (u sekundama) potrebno za stvaranje fibrinskog ugruška nakon aktivacije plazme siromašne trombocitima, on zapravo predstavlja indirektnu procjenu djelovanja UFH-a te se uobičajeno koristi za praćenje pacijenata koji su na terapiji UFH. Međutim, pogotovo u kritičnih bolesnika, ovakvo praćenje terapije ima brojne nedostatke što uključuje nedostatak kliničke validacije terapijskog raspona (tj., produljenje od 1.5 - 2.5 puta bazalna vrijednost APTV) i nedostatak međunarodnog standardizacijskog postupka. Vrijednost APTV-a pri određenoj koncentraciji heparina poprilično varira ovisno o korištenim reagensima i instrumentima za mjerenje. Nadalje, bazalni APTV može biti produljen u određenih pacijenata zbog različitih faktora kao što su manjak fibrinogena ili faktora zgrušavanja, visoke razine FVIII ili prisutnosti endogenog lupus antikoagulansa. U ovom kontekstu, predložena metoda praćenja i titracije doze UFH-a jest mjerenje anti-Xa aktivnosti. Tako dobijemo pouzdaniji uvid u koncentraciju UFH-a, ali nam taj test ne daje uvid u unutarnji put koagulacije kao što to APTV omogućuje. Preporuka je da se prije uvođenja antikoagulantne terapije provjeri stanje bolesnikova hemostatskog sustava temeljeno na prethodnim krvarenjima ili trombotskim incidentima te mjerenju PV i APTV. Ako se ispostavi da je vrijeme zgrušavanja produljeno,

treba utvrditi uzrok (prisutnost inhibitora ili manjak čimbenika koagulacije) i prema tome procijeniti prednosti odnosno rizike antikoagulantne terapije. Kad su u pitanju visokorizični pacijenti, potrebno je izmjeriti i APTV i anti-Xa vrijednost. U pacijenata u kojih se heparin primjenjuje *intermitentno*, vrijednost APTV i anti-Xa treba mjeriti 6 sati nakon primjene doze, a APTV održavati 2 - 2.5 puta većim od bazalnih vrijednosti. Ipak, u ovakvom će slučaju preferirana terapija biti LMW heparini jer ne zahtijevaju mjerenje koncentracija odnosno određivanje antikoagulantnog učinka. (Lardionis i sur., 2022; Katzung i sur., 2020)

#### **4.2.3. TROMBINSKO VRIJEME**

Trombinsko vrijeme ili TV (engl. *thrombin time*, TT) jednostavna je koagulacijska pretraga koja odražava pretvorbu fibrinogena u fibrin nakon dodatka goveđeg ili ljudskog trombina u suvišku plazmi siromašnoj trombocitima. TV se mjeri i izvještava u sekundama, a koristi se kao probirni test za procjenu manjka ili kvalitativnih poremećaja fibrinogena te prisutnosti inhibitora trombina. TV je jako osjetljiv na prisutnost inhibitora trombina koji se koriste u antikoagulacijskoj terapiji, heparina i dabigatrana. Međutim, TV nije prikladan test za praćenje antikoagulacijske terapije heparinom i direktnim inhibitorima trombina zbog prevelike osjetljivosti. Vrijeme stvaranja fibrina mjeri se optičkim ili mehaničkim tehnikama. (Undas, 2017; Wada i sur., 2021; Bronić, 2019)

### **4.3. UTJECAJ DOAK-A NA PROBIRNE KOAGULACIJSKE PRETRAGE**

Za razliku od tradicionalnih antikoagulansa poput varfarina i UFH-a, DOAK-i ne zahtijevaju redovito praćenje koagulacije i titiranje doze. Ipak, sa sve širom i češćom upotrebom ovih lijekova, postaje jasno da je određivanje koncentracije DOAK lijekova s pomoću pouzdanih laboratorijskih pretraga u određenim kliničkim situacija nužno. Nadalje, s obzirom na to da DOAK-i mogu ometati mnoge testove koagulacije i uzrokovati pogrešne rezultate, laboratoriji moraju znati utjecaj ovih lijekova na testove koje provode. (Volod i sur., 2022)

Utjecaj DOAK-a na probirne testove koagulacije (PV, APTV i TV) uvelike je proučavan. Riječ je o metodama koje se rutinski izvode u svim kliničkim laboratorijima te mogu biti od velike koristi prilikom donošenja kliničkih odluka u hitnim situacijama. Ipak, varijabilnost rezultata moguća je ovisno o korištenom reagensu s obzirom na različitu osjetljivost pojedinih reagensa na DOAK. Stoga se probirni testovi mogu koristiti jedino orijentacijski kako bi se procijenila prisutnost lijeka, ali ne mogu odrediti stupanj antikoagulacijskog učinka lijeka. (Dunois, 2021)

Prilikom interpretacije probirnih testova koagulacije u obzir se trebaju uzeti vjerojatni raspon koncentracije DOAK-a u plazmi, vrijeme posljednje primjene lijeka, reagensi i moguće patologije koje mogu utjecati na produljenje PV odnosno APTV. (Doux fils i sur., 2018)

Što se tiče INR-a, on je razvijen za praćenje terapije antagonistima vitamina K i nije odgovarajući za praćenje DOAK-a. INR je suboptimalan u procjeni DOAK-a jer ima visoku ovisnost o reagensima te nisku osjetljivost i specifičnost. Iako može pružiti određene informacije, laboratoriji moraju biti svjesni njegovih ograničenja. (Margetić i sur., 2022)

INR je specifičan za antikoagulacijsko djelovanje koje uzrokuje varfarin jer je ISI baziran na osjetljivosti tromboplastinskog reagensa na faktore zgrušavanja ovisne o vitaminu K te kao takav nije valjan za određivanje antikoagulacijskog učinka DOAK-a. Na varfarinu baziran ISI nije povezan s osjetljivosti reagensa na direktne inhibitore trombina ili FXa. (Adcock i Gosselin, 2017)

### 4.3.1. Utjecaj direktnih inhibitora trombina

Maksimalna koncentracija dabigatrana u plazmi ( $c_{\max}$ ) i maksimalni antikoagulantni učinak postižu se unutar tri sata od oralne primjene lijeka. APTV omogućuje kvalitativnu procjenu aktivnosti dabigatrana, ali osjetljivost ovisi o reagensu i koagulometru što komplicira interpretaciju rezultata. U većine pacijenata koji primjenjuju dabigatran eteksilat APTV bit će produljen (omjer  $> 1.2$ ; [APTV pacijenta/referentni APTV]). (Douxflis i sur., 2018)

Krivulja doza tj. odgovor dabigatrana s APTV reagensima je zakrivljena, a izravna se pri približno 200 ng/mL. Vrijeme zgrušavanja varira između reagensa što je vjerojatno povezano s razlikama u sastavu reagensa. S potrebnom koncentracijom dabigatrana od približno 400 ng/mL, vrijeme produljenja APTV-a je dvostruko. Unatoč ovim ograničenjima, APTV može biti koristan probirni test i može pružiti približnu procjenu razine dabigatrana u terapijskim koncentracijama. Ovisno o osjetljivosti reagensa, rezultat može biti polukvantitativan ili samo kvalitativan, a kod nekih APTV testova prisutnost dabigatrana možda neće biti pouzdano otkrivena. (Dunois, 2021)

Utjecaj dabigatrana na PV je manji. Vrijeme zgrušavanja može biti produljeno u odnosu na koncentraciju dabigatrana u plazmi, ali nije sustavno produljeno pri maksimalnim koncentracijama u plazmi ( $c_{\max}$ ) i nikada pri najnižim koncentracijama. Pri  $c_{\max}$  dabigatrana INR iznosi manje od 1.5 što znači da PV nije prikladan test za mjerenje ili otkrivanje dabigatrana. (Dunois, 2021)

TV je test koji je vrlo osjetljiv na dabigatran, a normalno vrijeme zgrušavanja povezano je s odsutnošću dabigatrana ili njegovim niskim koncentracijama u uzorku plazme. Za koncentracije niže od ili blizu 30 ng/mL, vrijeme zgrušavanja je značajno produljeno dok vrijeme zgrušavanja može biti deset puta produljeno ili u mnogim slučajevima iznad granice mjerenja pri maksimalnoj koncentraciji u plazmi ( $c_{\max}$ ). Učinak dabigatrana na ovu pretragu izravno ovisi o koncentraciji trombina u TV reagensima. Shodno tome, produljeno trombinsko vrijeme ne može se automatski povezati s visokim razinama dabigatrana pa TV nije prikladan za precizno kvantitativno mjerenje, ali se može koristiti za isključivanje prisutnosti dabigatrana. (Dunois, 2021)

### 4.3.2. Utjecaj direktnih inhibitora FXa

Krivulja doza tj. odgovor inhibitora FXa s APTV reagensima je nelinearna, pri čemu je nelinearnost sve više izražena s porastom koncentracija lijekova. Vrijednost APTV-a je malo produljena pri  $c_{max}$ . U velikom broju pacijenata liječenih apiksabanom koncentracije do 200 ng/mL nisu detektirane APTV testom. APTV ima veću osjetljivost na rivaroksaban u usporedbi s ostalim inhibitorima FXa. Ipak, ova osjetljivost, koja ovisi o korištenom reagensu, u pravilu je nedostatna za praćenje terapijskih koncentracija lijeka, a pogotovo nižih koncentracija; APTV ne može detektirati učinak rivaroksabana pri koncentracijama nižim od 50 ng/mL. Zbog toga APTV nije test pouzdan za detekciju inhibitora FXa. (Dunois, 2021; Qiao i Tran, 2024)

Tijekom ranih faza kliničkog razvoja inhibitora FXa, određene studije pokazale su da se koncentracije rivaroksabana mogu mjeriti PV testom. Rivaroksaban ima najveći utjecaj na PV, slijedi edoksaban, dok apiksaban gotovo nema utjecaj. Koncentracije apiksabana do 200 ng/mL nemaju nikakav utjecaj na PV. Za sve je inhibitore FXa osjetljivost nedovoljna pri koncentracijama manjim ili blizu 30 ng/mL. (Dunois, 2021)

Inhibitori FXa nemaju utjecaj na TV. (Dunois, 2021)

Tablica 3. Utjecaj DOAK-a na probirne koagulacijske pretrage (prilagođeno prema Dunois, 2021)

	<i>Dabigatran</i>	<i>Rivaroksaban</i>	<i>Apiksaban</i>	<i>Edoksaban</i>
<i>PV/INR<sup>a,b</sup></i>	↑ pri $c_{max}$	↑	blaga ili nikakva promjena	↑
<i>APTV<sup>a,b</sup></i>	↑	↑ pri $c_{max}$	blaga ili nikakva promjena	↑ pri $c_{max}$
<i>TV</i>	↑ pri $c_{min}$	bez promjene	bez promjene	bez promjene

<sup>a</sup>ovisno o reagensu, <sup>b</sup>ovisno o koncentraciji; APTV: aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; PV: protrombinsko vrijeme; TV: trombinsko vrijeme

### 4.3.3. Utjecaj DOAK-a na druge koagulacijske testove

S obzirom da DOAK-i interferiraju sa stvaranjem fibrina i posljedično utječu na rezultate probirnih koagulacijskih testova, razumljiva je pretpostavka da će utjecati i na rezultate specifičnih testova temeljenih na koagulometrijskom mjerenju. (Margetić i sur., 2022)

Za testiranje trombofilije mogu biti potrebni testovi kao što su lupus antikoagulans, test na rezistenciju na aktivirani protein C (APCR), protein C, protein S i antitrombin. U takvim slučajevima testiranje bi se trebalo provesti u trenutku minimalne koncentracije lijeka u plazmi što je 12 ili 24 sata nakon posljednje primjene lijeka (ovisno o jednostrukom ili dvostrukom doziranju); ipak, smetnje su i dalje moguće, a ovise o osjetljivosti testa i primijenjenom DOAK-u. Budući da postoji mogućnost lažnih rezultata, stvarna potreba za ovim testovima u pacijenata na terapiji DOAK-ima trebala bi se pažljivo razmotriti. (Douxflis i sur., 2018)

Kad god je moguće, ove testove treba odgoditi do barem 5 dana nakon prestanka primjene DOAK lijeka. Alternativno, moguće je *in vitro* uklanjanje komponenti DOAK-a iz plazme prethodno provođenju koagulacijskih testova. DOAC-Stop (adsorpcijsko sredstvo, Hematex Research, Hornsby, Australija) i DOAC-Remove (aktivni ugljen, 5-Diagnostics, Švicarska) mogu neutralizirati sve DOAK-e s minimalnim utjecajem na testove hemostaze. (Margetić i sur., 2022)

Tablica 4. Utjecaj DOAK-a na specifične koagulacijske testove

(prilagođeno prema Douxfils i sur., 2018)

<i>Test</i>	<i>Dabigatran</i>	<i>Rivaroksaban</i>	<i>Apiksaban</i>	<i>Edoksaban</i>	<i>Obrazloženje</i>
<i>Lupus antikoagulans : dRVVT</i>	↑/↑↑	↑/↑↑	-/↑	↑	Lažno pozitivni rezultati
<i>Rezistencija na aktivirani protein C (APCR)</i>	↑	↑	↑	↑	Utječe na APTV-bazirane testove; FV Leiden APTV-baziran test bolji
<i>Protein C aktivnost</i>	-/↑	-/↑	-/↑	-/↑	Kromogena metoda - ne utječe; Imunokemijska metoda - ne utječe; Koagulometrijska metoda - utječe
<i>Protein S aktivnost</i>	-/↑	-/↑	-/↑	-/↑	Imunokemijska metoda - ne utječe; Koagulometrijska metoda - utječe
<i>Antitrombin aktivnost</i>	-/↑	-/↑	-/↑	-/↑	Metoda s trombinom – utječe dabigatran; Metoda s FXa – utječu inhibitori FXa

↑ do ↑↑: povećanje, - : nema utjecaja, APTV: aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, dRVVT: vrijeme zgrušavanja potaknuto otrovom Russellove ljutice (*engl. diluted Russell's viper venom time*)

#### 4.4. METODE ODREĐIVANJA DOAK-a

Metoda tekućinske kromatografije - masene spektrometrije (LC-MS/MS) povezuje fizičku separaciju putem tekućinske kromatografije s masenom analizom putem masene spektrometrije. Ova vrlo specifična i osjetljiva metoda može pouzdano odrediti koncentracije DOAK-a pri vrlo niskim koncentracijama. Sukladno tome, LC-MS/MS predstavlja zlatni standard za kvantifikaciju DOAK-a. Raspon koncentracija DOAK-a kreće se od 5 do 500 ng/mL, a ova metoda pogodna je za analize koncentracija lijeka u vršnim i najnižim koncentracijama. LC-MS/MS metoda je točna u cijelom rasponu koncentracija DOAK-a u plazmi. Međutim, unatoč ovoj prednosti, tehnička složenost i nepristupačnost u većini laboratorija čine ju nepraktičnom za svakodnevnu upotrebu. (Margetić i sur., 2022)

Dodatno, s obzirom na to da drugi čimbenici, poput pro- i antikoagulacijskih sredstava, utječu na hemostatsko stanje pacijenta, funkcionalni testovi mogu pružiti precizniji uvid u cjelokupni status hemostaze. Štoviše, funkcionalni koagulacijski testovi primijenjeni na automatiziranim koagulometrima mogu ostvariti vrijeme obrade unutar 60 minuta, što ih čini prikladnim u hitnim situacijama. (Margetić i sur., 2022)

Za razliku od metode LC-MS/MS, koagulometrijske ili kromogene metode kalibrirane na lijek mogu se izvoditi na automatiziranim koagulacijskim analizatorima čime su dostupne u većini modernih kliničkih laboratorija koji provode testove hemostaze. (Margetić i sur., 2022)

Tablica 5. Prikaz očekivanih koncentracija DOAK-a u plazmi nakon primjene terapijskih doza za prevenciju moždanog udara u NVAF (nevalvularna fibrilacija atrijska) (prilagođeno prema ten Cate i sur., 2017)

	<i>Dabigatran<sup>a</sup></i>	<i>Rivaroksaban<sup>b</sup></i>	<i>Apiksaban<sup>c</sup></i>	<i>Edoksaban<sup>d</sup></i>
<i>c<sub>min</sub></i> (ng/mL)	91 (61-143)	44 (12-137)	103 (41-230)	21 (2.5)
<i>c<sub>max</sub></i> (ng/mL)	175 (117-275)	249 (184-343)	171 (91-321)	241 (1.2)

a: nakon primjene 150 mg dabigatrana 2x na dan; b: nakon primjene 20 mg rivaroksabana 1x na dan; c: nakon primjene 5 mg apiksabana 2x na dan; d: nakon primjene 60 mg edoksabana 1x na dan



#### 4.4.1. METODE ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE DABIGATRANA

Trenutno dostupne specifične kvantitativne metode određivanja dabigatrana su diluirano trombinsko vrijeme (dTV), ekarinska kromogena metoda (ECA), ekarinski koagulometrijski test (ECT) i anti-FIIa test. Sve navedene metode moraju biti kalibrirane s odgovarajućim standardom kako bi se dabigatran mogao kvantificirati. (Dunois, 2021)

##### 4.4.1.1. Diluirano trombinsko vrijeme (dTV)

Diluirano trombinsko vrijeme ili dTV (engl. *diluted thrombin time*, dTT) je modificirana TV metoda za kvantitativno određivanje direktnog inhibitora trombina. Test ima dvije sheme razrjeđivanja kako bi se poboljšale niže granice detekcije. Uzorak plazme prvo se razrijedi u omjeru 1:10 s imidazolnim puferom, a zatim se jedan dio tako razrijeđenog uzorka doda u dva dijela normalne citrirane plazme. Zgrušavanje se tada pokreće dodavanjem viška humanog  $\alpha$ -trombina te se mjeri vrijeme zgrušavanja. Vrijeme stvaranja ugruška izravno je proporcionalno koncentraciji direktnog inhibitora trombina prisutnog u plazmi. (Volod i sur., 2022)

Do razvoja kalibriranog dTV testa dovela je visoka osjetljivost TV-a na dabigatran, a za izračun koncentracije dabigatrana u plazmi koriste se standardi dabigatrana. Korištenje razrijeđene plazme omogućuje mjerenje dabigatrana u širokom rasponu koncentracija. Ovaj test pokazuje dobru korelaciju s LC-MS/MS metodom. (Margetić i sur., 2022)

Prema Europskoj agenciji za lijekove, koncentracije dabigatrana od 67 ng/mL (za prevenciju venskih tromboembolijskih događaja nakon ortopedske kirurgije) i od 200 ng/mL (za prevenciju moždanog udara i sistemske embolije, kao i za terapiju duboke venske tromboze i plućne embolije), mjerene putem dTV testa, povezane su s povećanim rizikom od krvarenja. Važno je napomenuti da su često potrebne dvije kalibracijske krivulje kako bi se pokrile niske i visoke koncentracije dabigatrana. Princip testa dTV koristi se i za mjerenje drugih inhibitora trombina, poput hirudina i argatrobana, koji se primjenjuju intravenski. (Wieland i Shipkova, 2019)

Ograničenja ove metode vidljiva su u slučaju prelaska s terapije heparinom na dabigatran jer lijekovi iz heparinske skupine također utječu na dTV test što rezultira lažno povišenim koncentracijama dabigatrana izmjerenim ovim testom. (Margetić i sur., 2022)

#### **4.4.1.2. Ekarinska kromogena metoda (ECA)**

Ekarinska kromogena metoda (engl. *ecarin chromogenic assay*, ECA) koristi se za kvantitativno određivanje direktnih inhibitora trombina. Ekarin (*Echis carnitus*, zmijski otrov) koristi se za pretvorbu protrombina u meizotrombin, međuprodukta koji djeluje kao proteinaza i čija aktivnost može biti inhibirana pomoću direktnih inhibitora trombina, ali ne i heparina. Meizotrombin inducira zgrušavanje putem cijepanja fibrinogena u fibrin. Produljenje vremena zgrušavanja raste linearno s porastom koncentracije izravnog inhibitora trombina. Ekarinska kromogena metoda koristi sličan pristup, ali se koncentracija meizotrombina mjeri pomoću kromogenog supstrata. (Volod i sur., 2022)

Dva su komercijalna kita dostupna za praćenje antikoagulacije ekarinskom kromogenom metodom; prvi je ECA-H/T (gdje „H“ označava hirudin, a „T“ direktne inhibitore trombina) dok je novija, modificirana verzija nazvana ECA-II.

Iako su oba kita distribuirana od strane tvrtke Diagnostica Stago, ECA-H/T je ručni test, dok je ECA-II automatiziran. (Gosselin i Douxfils, 2020)

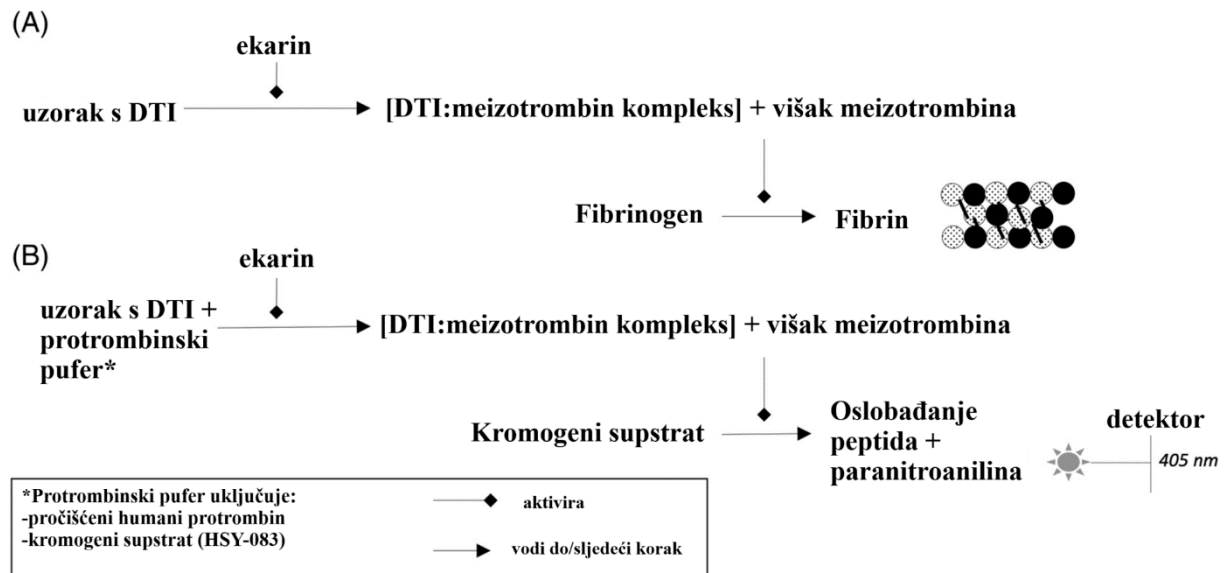
#### **4.4.1.3. Ekarinski koagulometrijski test (ECT)**

Unatoč tome što je ekarinski koagulometrijski test (engl. *ecarin clotting time*, ECT) u literaturi opisan već desetljećima, do danas ne postoji standardizacija za ovaj test. Kao što je prethodno opisano, ekarin aktivira protrombin (FII) stvarajući meizotrombin, koji zatim pretvara fibrinogen u fibrin, a što je temelj svih testova zasnovanih na zgrušavanju. Iako je princip testa jednostavan, varijacije u testiranju uključuju: razrjeđivanje uzorka (provodi li se ili ne), stupanj razrjeđivanja (omjer uzorka i otopine za razrjeđivanje), vrstu otopine za razrjeđivanje (fiziološka otopina ili pufer), prethodnu inkubaciju uzorka ili reagensa na 37 °C, te koncentraciju ekarina. Ove varijacije dovode do različite osjetljivosti na dabigatran i nižih granica kvantifikacije. Zbog svoje jednostavnosti, ECT se lako može automatizirati, no potrebna je provjera izvedbe, posebno kako bi se osiguralo da nema prijenosa reagensa ekarina prilikom pipetiranja. (Gosselin i Douxfils, 2020)

Brojne studije pokazale su linearnu povezanost između ECT i koncentracije dabigatrana. (Gosselin i Douxfils, 2020)

Iako razvoj komercijalnih kitova može poboljšati praktičnost ovog testa, ti kitovi nisu standardizirani niti validirani za dabigatran. Također, važno je napomenuti da će niske razine protrombina ili hipofibrinogenemija uzrokovati lažno povišena vremena zgrušavanja,

neproporcionalna koncentracijama dabigatrana. Zbog tih razloga, ECT se ne može preporučiti za hitno praćenje antikoagulantnih učinaka, čak i ako FDA ovaj test navodi u trenutnom sažetku opisa svojstava lijeka. (Gosselin i Douxfils, 2020; www.accessdata.fda.gov)



Slika 7. Ekarinski testovi.

Napomena: ECT (A) ovisi o razinama protrombina i fibrinogena kod pacijenta pa vrijeme zgrušavanja može biti produljeno ako su prisutne niske razine protrombina i/ili fibrinogena. Međutim, kod ECA (B), uzorak se razrjeđuje u protrombinskom puferu što eliminira utjecaj niskih razina protrombina, a metoda ne ovisi o pretvorbi fibrinogena te stoga nije podložna utjecaju niskih razina fibrinogena.

(preuzeto i prilagođeno prema Gosselin i Douxfils, 2020)

#### 4.4.1.4. Anti-FIIa test

Anti-FIIa test temelji se na mjerenju inhibicije trombina kromogenom metodom nakon dodavanja trombinskog reagensa u uzorak plazme. Test koristi kalibratore specifične za lijek i pokazuje dobru korelaciju s LC-MS/MS metodom pri mjerenju minimalnih i vršnih koncentracija direktnih inhibitora trombina u plazmi. (Margetić i sur., 2022)

Trombin se inkubira s čistom ili razrijeđenom plazmom pacijenta, a rezidualni trombin hidrolizira kromogeni supstrat specifičan za trombin oslobađajući paranitroanilin (pNA). Količina oslobođenog pNa, mjerena optičkom gustoćom koja se stvara u minuti, obrnuto je proporcionalna koncentraciji dabigatrana u uzorku. (Dunois, 2021)

Postoje komercijalno dostupni kitovi za anti-FIIa test (npr. BIOPHEN Heparin anti-IIa [Aniara, West Chester, OH, USA]; ACTICHROME Heparin [anti-IIa] [American Diagnostica, Stamford, CT, USA]). (Garcia i sur., 2013)

Komercijalni testovi izvještavaju o granici detekcije (engl. *limit of detection*, LoD) od približno 15 ng/mL. (Dunois, 2021)

## **4.4.2. METODE ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE RIVAROKSABANA, APIKSABANA I EDOKSABANA**

### **4.4.2.1. Anti-Xa test**

Iako još nije univerzalno standardizirana u svim laboratorijima, primjena kromogenog testa anti-Xa za detekciju direktnih inhibitora FXa sve je češće zabilježena u recentnoj literaturi nakon konsenzusa ICSH-a iz 2018. o laboratorijskom testiranju DOAK-a. (Qiao i Tran, 2024)

Riječ je o funkcionalnim anti-FXa testovima kalibriranim s odgovarajućim lijekom, izvorno razvijenim za praćenje terapije s LMWH pripravcima, a čija se primjena proširila na UFH i direktne inhibitore FXa pa se mogu koristiti za mjerenje koncentracija rivaroksabana, apiksabana, edoksabana i betriksabana. Princip anti-FXa testa jednak je za praćenje heparina i DOAK-a. U ovom testu heparin (UFH ili LMWH) u plazmi pacijenta veže se na endogeni antitrombin, stvarajući komplekse heparin-antitrombin koji neutraliziraju poznatu količinu FXa prisutnog u reagensu. Zatim preostali slobodni FXa djeluje na kromogeni supstrat, oslobađajući p-nitroanilin koji daje boju, a što se očitava fotometrijski prema kalibriranoj krivulji. DOAK testovi koriste isti princip pri čemu direktni inhibitori FXa izravno neutraliziraju FXa u reagensu bez potrebe za antitrombinom, a količina oslobođenog p-nitroanilina mjeri se i uspoređuje s DOAK kalibratorima. (Wieland i Shipkova, 2019; Qiao i Tran, 2024; Sarode, 2019) Komercijalno dostupni plazmatski kalibratori, koji se sastoje od miješane normalne plazme s dodanim sve većim količinama određenog DOAK-a, koriste se za izradu kalibracijskih krivulja iz kojih se mogu izračunati koncentracije lijeka u plazmi. (Margetić i sur., 2022) Uzorcima uzetih od pacijenata prvo se mjeri preostala anti-Xa aktivnost, koja je obrnuto proporcionalna količini prisutnog antikoagulacijskog lijeka. Zatim se, koristeći standardnu krivulju, određuje koncentracija lijeka. (Qiao i Tran, 2024)

Rezultati nekoliko studija pokazuju visoku osjetljivost ove metoda na prisutnost inhibitora FXa. Međutim, potrebno je obratiti pažnju na očekivane koncentracije jer osjetljivost testa ovisi o korištenoj metodologiji i vrsti testa. Na primjer, neizvjesni rezultati za rivaroksaban mogu se dobiti ako je koncentracija u plazmi manja od 30 ng/mL; ovaj problem se može prevladati korištenjem prilagođene metode, iako to može smanjiti raspon mjerenja. (Margetić i sur., 2022)

Kada se primjenjuje na sličan način kao za LMWH, ovaj test ima brz rezultat (manje od 30 minuta) i najčešće postiže limite detekcije između 20 i 30 ng/mL ovisno o laboratorijskoj opremi i standardima kalibracije, a što je dovoljno za kliničke odluke, posebno u hitnim situacijama. (Qiao i Tran, 2024)

Anti-Xa test može se standardizirati, reproducibilan je i lako se implementira u ustanovama koje već koriste ovu metodologiju za praćenje terapije heparinom. U usporedbi s PV-om i APTV-om, anti-Xa pruža konzistentnije i pouzdanije praćenje antikoagulacije kod pacijenata s oštećenjem jetre ili kod pacijenata s izolirano produljenim PV-om ili APTV-om. (Qiao i Tran, 2024)

Za implemenataciju ovog testa u cijelom svijetu i svakodnevno korištenje u svim kliničkim slučajevima problem predstavlja dodatni trošak koji takav pothvat predstavlja. (Qiao i Tran, 2024)

Tablica 6. Kvantitativne metode određivanja koncentracije DOAK-a

(prilagođeno prema Margetić i sur., 2022)

<i>Lijek</i>		<i>Analitička metoda</i>	
		Koagulometrijska	Kromogena
<i>Direktni inhibitor trombina</i>	Dabigatran	dTV	ECA
		ECT	Anti-FIIa
	Rivaroksaban	/	Anti-FXa kalibriran uz rivaroksaban
<i>Direktni inhibitori FXa</i>	Apiksaban	/	Anti-FXa kalibriran uz apiksaban
	Edoksaban	/	Anti-FXa kalibriran uz edoksaban

dTV: diluirano trombinsko vrijeme, ECT: ekarinski koagulometrijski test, ECA: ekarinska

kromogena metoda

#### 4.5. OSTALE METODE ZA ODREĐIVANJE DOAK-a

DOAK-i se mogu mjeriti i u drugim uzorcima osim plazme, poput urina, seruma i pune krvi. Općenito se pretpostavlja da se serum i plazma mogu koristiti naizmjenično za terapijsko praćenje DOAK-a. Koncentracije apiksabana i rivaroksabana značajno su veće u serumu nego u plazmi. Razlika je izraženija kod rivaroksabana i veća između seruma i citratne plazme nego između seruma i EDTA plazme. Veća aktivnost FX u serumu može objasniti uočene razlike u koncentraciji. Stoga je odabir matriksa važan pri tumačenju rezultata terapijskog praćenja lijekova te u istraživanjima koja uključuju analize direktnih oralnih antikoagulanasa. (Margetić i sur., 2022)

Iako se specifični koagulacijski testovi mogu koristiti za mjerenje DOAK-a s visokom točnošću, ovi testovi nisu široko dostupni. Stoga, postoji nezadovoljena klinička potreba za osjetljivim testom koji može brzo detektirati antikoagulantne učinke DOAK-a u laboratoriju ili na mjestu njege odnosno uz postelju bolesnika (engl. *point of care*, POC). (Maji i sur., 2020)

POC testovi u uzorku urina temelje se na razvoju različitih boja u prisutnosti odnosno odsutnosti DOAK-a. Tijekom posljednjih nekoliko godina, probirni testovi DOAK-a u urinu dostupni su kao brza kvalitativna i polukvantitativna metoda detekcije nedavne izloženosti DOAK-u. (Margetić i sur., 2022)

DOAK Dipstick (DOASENSE GmbH, Njemačka) je novi brzi test za otkrivanje direktnih inhibitora FXa i direktnih inhibitora trombina u urinu. Test traka sadrži jastučice koji specifično detektiraju DOAK-e, kao i boju urina i kreatinin. Boje jastučica vizualno se uspoređuju s ljestvicom boja kako bi se odredio rezultat. Mjerenje koncentracije DOAK-a je brže u uzorcima urina nego u plazmi, a rezultat s DOAK Dipstickom može se dobiti za otprilike 10 minuta. Međutim, budući da se rezultat DOAK Dipsticka interpretira vizualno, ovisi o promatraču i može biti nevažeci ako je boja urina abnormalna. Ove potencijalne pogreške mogu se eliminirati korištenjem čitača (Reader, DOASENSE GmbH, Njemačka). (Örd L i sur., 2022)

DOAK Dipstick može se koristiti za isključivanje prisutnosti klinički značajnih koncentracija direktnih inhibitora trombina i direktnih inhibitora FXa ( $\geq 30$  ng/mL) u urinu pacijenta. Pozitivan rezultat DOAK Dipstick testa sugerira da su DOAK-i prisutni u cirkulaciji u značajnim koncentracijama te je kao sljedeći korak u donošenju kliničkih odluka potrebno provesti kvantitativno određivanje DOAK-a u plazmi. (Margetić i sur., 2022)

Viskoelastični testovi su POC testovi koji u punoj krvi analiziraju proces stvaranja ugruška i naknadnu lizu (fibrinolizu) u stvarnom vremenu. Primjeri takvih testova su rotacijska

tromboelastometrija (ROTEM, Werfen, Bedford, MA, USA) i tromboelastografija (TEG, Haemonetics Corporation, Boston, MA, USA). (Sahli i sur., 2022) DOAK viskoelastični testovi pokazali su različite podatke u vezi s razlikovanjem antikoagulacijskih učinaka pa se još ne preporučuju za praćenje ovih lijekova. (Perifanis V i sur., 2021)

Vrijeme stvaranja trombina (engl. *thrombin generation assay*, TGA) još je jedan obećavajući test za određivanje stupnja antikoagulacije u pacijenata liječenih DOAK-ima. (Meihandoest i sur., 2021) TGA opisan je kao „globalni koagulacijski test“ koji kontinuirano mjeri proizvodnju trombina cijepanjem fluorogenog supstrata. (Shaw i sur., 2023)

Unatoč jednostavnosti korištenja i kratkom vremenu obrade, POC uređaji imaju mnoge nedostatke poput nedostatka standardizacije, visokih troškova, nedovoljnog istraživanja te nedovoljne osjetljivosti za isključivanje klinički relevantnih koncentracija DOAK-a u perioperativnom okruženju. Stoga bi njihova upotreba trebala biti ograničena na specifične kliničke kontekste. (Margetić i sur., 2022)



## 5. ZAKLJUČAK

Direktni oralni antikoagulansi svojim dolaskom na tržište u zadnjih desetak godina označili su prekretnicu u liječenju tromboembolijskih bolesti. Prednosti ovih lijekova u odnosu na tradicionalne antikoagulanse uključuju jednostavnu primjenu i fiksno doziranje, veću sigurnost primjene, manje interakcija s lijekovima i hranom.

Iako DOAK-i ne zahtijevaju rutinsko praćenje, u određenim je kliničkim situacijama potrebno određivanje koncentracije DOAK-a u plazmi što uključuje neke situacije koje nisu hitne (starija životna dob, teško bubrežno zatajenje i dijaliza, prethodno intervenciji s visokim rizikom od krvarenja, BMI > 40 kg/m<sup>2</sup>, lijek-lijek interakcije) te hitne situacije akutnog krvarenja i potrebe za određivanjem strategije za reverziju antikoagulacijskog učinka.

Unatoč vidljivom utjecaju DOAK-a na tradicionalne koagulacijske probirne testove, ovi testovi ne mogu se primjenjivati za određivanje antikoagulantnog učinka DOAK-a. U svim bi se kliničkim situacijama trebali primjenjivati specifični kvantitativni testovi. Za određivanje koncentracije dabigatrana dostupni su diluirano trombinsko vrijeme (dTV), ekarinska kromogena metoda (ECA), ekarinski koagulometrijski test (ECT) i anti-FIIa test. Za određivanje koncentracije rivaroksabana, apiksabana i edoksabana dostupan je anti-Xa test. Problem je što ovi testovi nisu široko rasprostranjeni niti implementirani u sve laboratorije.

U potrazi za brzim i svuda dostupnim testom, razvijaju se tzv. POC testovi, testovi uz postelju bolesnika koji kvalitativno određuju prisutnost odnosno odsutnost DOAK-lijekova, a mogu se provoditi u uzorku urina ili pune krvi. Primjeri ovakvih testova su DOAC Dipstick, ROTEM, TEG i TGA. Iako su jednostavni za upotrebu i daju brze rezultate, ovakvi testovi imaju mnogo nedostataka pa bi se trebali koristiti samo u specifičnim situacijama.

## **6. POPIS KRATICA, SIMBOLA I OZNAKA**

APTV - aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

DOAK - direktni oralni antikoagulans

DTI - direktni inhibitor trombina

dTV - diluirano trombinsko vrijeme

DVT - duboka venska tromboza

ECA - ekarinska kromogena metoda

ECT - ekarinski koagulometrijski test

FZ - faktor zgrušavanja

ICSH - međunarodno vijeće za standardizaciju u hematologiji

ISI - međunarodni indeks osjetljivosti

LC/MS-MS - tekućinska kromatografija-masena spektrometrija

LMWH - heparini niske molekulske mase

NOAK - novi oralni antikoagulans

NVAF - nevalvularna fibrilacija atrijska

PE - plućna embolija

PV - protrombinsko vrijeme

PTV - parcijalno protrombinsko vrijeme

TF - tkivni faktor

TV - trombinsko vrijeme

UFH - nefrakcionirani heparin

vWF - von Willebrandov faktor

## 7. LITERATURA

Adcock DM, Gosselin RC. The danger of relying on the APTT and PT in patients on DOAC therapy, a potential patient safety issue. *Int J Lab Hem.* 2017, 39(1), 37–40.

Bates SM, Weitz JI. Coagulation Assays. *Circulation*, 2005, 112(4), 53-60.

Baugh CW, Levine M, Cornutt D, Wilson JW, Kwun R, Mahan CE, Pollack Jr CV, Marcolini EG, Milling Jr TJ, Peacock WF, Rosovsky RP, Wu F, Sarode R, Spyropoulos AC, Villines TC, Woods TD, McManus J, Williams J. Anticoagulant Reversal Strategies in the Emergency Department Setting: Recommendations of a Multidisciplinary Expert Panel. *Ann Emerg Med.*, 2020, 76(4), 470-485.

Baza lijekova, 2024., dostupno na: <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>, pristupljeno 23.7.2024.

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 (Zagreb)*, 2019, 29(2).

Chan N, Sobieraj-Teague M, Eikelboom JW. Direct oral anticoagulants: evidence and unresolved issues. *Lancet*, 2020, 396(10264), 1767-1776.

Chen A, Stecker E, Warden BA. Direct Oral Anticoagulant Use: A Practical Guide to Common Clinical Challenges. *J Am Heart Assoc.*, 2020, 9(13).

Dabigatran etexilate, 2024., dostupno na: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06695>, pristupljeno 25.8.2024.

De Caterina R, Husted S, Wallentin L, Andreotti F, Arnesen H, Bachmann F, Baigent C, Huber K, Jespersen J, Kristensen SD, Lip GYH, Morais J, Rasmussen LH, Siegbahn A, Verheugt FWA, Weitz JI. General mechanisms of coagulation and targets of anticoagulants (Section I). Position Paper of the ESC Working Group on Thrombosis--Task Force on Anticoagulants in Heart Disease. *Thromb Haemost.* 2013, 109(4), 569-579.

Dorgalaleh A, Favaloro EJ, Bahraini M, Rad F. Standardization of Prothrombin Time/International Normalized Ratio (PT/INR). *Int J Lab Hematol.*, 2021, 43(1), 21-28.

Dunois C. Laboratory Monitoring of Direct Oral Anticoagulants (DOACs). *Biomedicines.*, 2021, 9(5), 445.

Douxflis J, Adcock DM, Bates SM, Favalaro EJ, Gouin-Thibault I, Guillermo C, Kawai Y, Lindhoff-Last E, Kitchen S, Gosselin RC. 2021 Update of the International Council for Standardization in Haematology Recommendations for Laboratory Measurement of Direct Oral Anticoagulants. *Thromb Haemost.*, 2021, 121(8),1008-1020.

Douxflis J, Ageno W, Samama CM, Lessire S, ten Cate H, Verhamme P, Dogné JM, Mullier F. Laboratory testing in patients treated with direct oral anticoagulants: a practical guide for clinicians. *J Thromb Haemost*, 2018, 16, 209–19.

Eliquis. Sažetak opisa svojstava lijeka, dostupno na: [https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/eliquis-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/eliquis-epar-product-information_hr.pdf), pristupljeno 26.8.2024.

Franchini M, Mannucci PM. Primary hyperfibrinolysis: Facts and fancies. *Thromb Res.* 2018, 166, 71-75.

Gornik I, Prkačin I, Neseck Adam V, Grabovac V, Giljača V, Šikić A. Postupnici za periproceduralno zbrinjavanje i zbrinjavanje krvarenja u bolesnika liječenih novim oralnim antikoagulantnim lijekovima. *Liječ Vjesn*, 2017, 139, 67–71.

Gosselin RC, Douxfils J. Ecarin based coagulation testing. *Am. J. Hematol.*, 2020, 95(7), 863-869.

Guyton AC, Hall JE. Hemostasis and Blood Coagulation. U: Textbook of Medicinal Physiology. Guyton AC, Hall JE, urednici, Philadelphia, Elsevier, str. 483-494.

Hao C, Sun M, Wang H, Zhang L, Wang W. Low molecular weight heparins and their clinical applications. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2019, 163, 21-39.

Heestermans M, Poenou G, Hamzeh-Cognasse H, Cognasse F, Bertolotti L. Anticoagulants: A Short History, Their Mechanism of Action, Pharmacology, and Indications. *Cells*, 2022, 11(20), 3214.

Heparin, 2024., dostupno na: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01109>, pristupljeno 1.9.2024.

Hindley B, Lip GYH, McCloskey AP, Penson PE. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of direct oral anticoagulants. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2023, 19(12), 911-923.

- Ignjatovic V. Activated Partial Thromboplastin Time. *Methods Mol Biol.*, 2013, 992, 111-120.
- Lardionis B, Hardy M, Michaux I, Horlait G, Rotens T, Jacquemin H, Lessire S, Bulpa P, Dive A, Mullier F. Monitoring of Unfractionated Heparin Therapy in the Intensive Care Unit Using a Point-of-Care aPTT: A Comparative, Longitudinal Observational Study with Laboratory-Based aPTT and Anti-Xa Activity Measurement. *J. Clin. Med.*, 2022, 11, 1338.
- Maji D, Opneja A, Suster MA, Bane KL, Wilson BM, Mohseni P, Stavrou EX. Monitoring DOACs with a Novel Dielectric Microsensor: A Clinical Study. *Thromb Haemost.*, 2021, 121(1), 58-69.
- Mar PL, Gopinathannair R, Gengler BE, Chung MK, Perez A, Dukes J, Ezekowitz MD, Lakkireddy D, Lip GYH, Miletello M, Noseworthy PA, Reiffel J, Tisdale JE, Olshansky B. Drug Interactions Affecting Oral Anticoagulant Use. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2022, 15(6).
- 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. 349-387.
- Margetić S, Čelap I, Lovrenčić Huzjan A, Bosnar Puretić M, Šupraha Goreta S, Čajević Glojtnarić A, Delić Brkljačić D, Mioč P, Harenberg J, Hetjens S, Weiss C. DOAC Dipstick Testing Can Reliably Exclude the Presence of Clinically Relevant DOAC Concentrations in Circulation. *Thromb Haemost* 2022, 122(09),1542-1548.
- Margetić S, Šupraha Goreta S, Čelap I, Razum M. Direct oral anticoagulants (DOACs): From the laboratory point of view. *Acta Pharm.*, 2022, 72, 459–482.
- Meihandoest T, Studt JD, Mendez A, Albeiro L, Fontana P, Wuillemin WA, Schmidt A, Graf L, Gerber B, Maeder GM, Bovet C, Sauter TC, Nagler M. Automated Thrombin Generation Assay for Rivaroxaban, Apixaban, and Edoxaban Measurements. *Front Cardiovasc Med.*, 2021, 8.
- Mueller RL, Scheidt S. History of drugs for thrombotic disease. Discovery, development, and directions for the future. *Circulation*, 1994, 89, 432-449.
- Olie RH, Wincker K, Rocca B, ten Cate H. Oral Anticoagulants Beyond Warfarin. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2024, 64, 551-575.

Örd L, Marandi T, Märk M, Raidjuk L, Kostjuk J, Banys V, Krause K, Pikta M. Evaluation of DOAC Dipstick Test for Detecting Direct Oral Anticoagulants in Urine Compared with a Clinically Relevant Plasma Threshold Concentration. *Clin Appl Thromb Hemost.*, 2022, 28.

Papageorgiu L, Hetjens S, Fareed J, Auge S, Tredler L, Harenberg J, Weiss C, Elalamy I, Gerotziapas GT. Comparison of the DOAC Dipstick Test on Urine Samples With Chromogenic Substrate Methods on Plasma Samples in Outpatients Treated With Direct Oral Anticoagulants. *Clin Appl Thromb Hemost.*, 2023, 29.

Partial Thromboplastin Time, Activated, dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/2085837-overview#a1>, pristupljeno 30.8.2024.

Perifanis V, Neokleous N, Tsakiris DA. Update on laboratory testing and hemostasis assessment in patients receiving direct oral anticoagulants (DOACs). *Thromb update.*, 2021, 5.

Pradaxa, Medication Guide, dostupno na: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2023/022512s0471bl.pdf#page=27](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2023/022512s0471bl.pdf#page=27), pristupljeno 30.10.2024.

Pradaxa. Sažetak opisa svojstava lijeka, dostupno na: [https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/pradaxa-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/pradaxa-epar-product-information_hr.pdf), pristupljeno 25.8.2024.

Qiao J, Tran MH. Challenges to Laboratory Monitoring of Direct Oral Anticoagulants. *Clin Appl Thromb Hemost.*, 2024, 30.

Repetto O, De Re V. Coagulation and fibrinolysis in gastric cancer. *Ann N Y Acad Sci.*, 2017, 1404(1), 27-48.

Rivaroxaban, 2024., dostupno na: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06228>, pristupljeno 26.8.2024.

Roteas. Sažetak opisa svojstava lijeka, dostupno na: [https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/roteas-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/roteas-epar-product-information_hr.pdf), pristupljeno 26.8.2024.

Sahli SD, Castellucci C, Roche TR, Rössler J, Spahn DR, Kaserer A. The impact of anticoagulants on viscoelastic testing - A systematic review. *Front Cardiovasc Med.*, 2022, 9.

Santoro RC, Molinari AC, Leotta M, Martini T. Isolated Prolongation of Activated Partial Thromboplastin Time: Not Just Bleeding Risk!. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 2023, 59(6), 1169.

Sarode R. Direct oral anticoagulant monitoring: what laboratory tests are available to guide us?. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 2019, 2019(1), 194-197.

Shaw JR, Castelluci LA, Siegal D, Carrier M. DOAC-associated bleeding, hemostatic strategies, and thrombin generation assays - a review of the literature. *J Thromb Haemost.*, 2023, 21(3), 433-452.

Tan CSS, Lee SWH. Warfarin and food, herbal or dietary supplement interactions: A systematic review. *Br J Clin Pharmacol.* 2021, 87(2), 352-374.

ten Cate H, Henskens YMC, Lancé MD. Practical guidance on the use of laboratory testing in the management of bleeding in patients receiving direct oral anticoagulants. *Vasc Health Risk Manag.*, 2017, 13, 457-467.

Thrombin time, 2024., dostupno na: [https://www.practical-haemostasis.com/Screening%20Tests/thrombin\\_time.html](https://www.practical-haemostasis.com/Screening%20Tests/thrombin_time.html), pristupljeno 2.9.2024.

Umerah CO, Momodu II. Anticoagulation. U: *StatPearls*. Treasure Island, (FL):StatPearls Publishing, 2023.

Undas A. Determination of Fibrinogen and Thrombin Time (TT). *Methods Mol Biol.*, 2017, 1646, 105-110.

Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.*, 2013, 93(1), 327-358.

Volod O, Rollins-Raval M, Goodwin AJ, Higgins RA, Long T, Chandler WL, Harris NS, Pham HP, Isom JA, Moser K, Olson JD, Smock KJ, VanSandt A, Wool G, Chen D. Interlaboratory Performance in Measurement of Dabigatran and Rivaroxaban. *Arch Pathol Lab Med.*, 2022, 146(2), 145-153.

Wada H, Ichikawa Y, Ezaki M, Matsumoto T, Yamashita Y, Shikari K, Shimaoka M, Shimpo H. The Reevaluation of Thrombin Time Using a Clot Waveform Analysis. *J. Clin. Med.*, 2021, 10(21), 4840.

Wieland E, Shipkova M. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Drug Monitoring of Direct-Acting Oral Anticoagulants: Where Do We Stand? *Ther. Drug Monit.*, 2019, 41(2), 180-191.

Xarelto. Sažetak opisa svojstava lijeka, dostupno na: [https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/xarelto-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/hr/documents/product-information/xarelto-epar-product-information_hr.pdf), pristupljeno 26.8.2024.

Yamashita Y, Morimoto T, Kimura T. Venous thromboembolism: Recent advancement and future perspective. *J Cardiol.*, 2022, 79(1), 79-89.

Yen Ng J, D'Souza M, Hutani F, Choi P. Management of Heparin-Induced Thrombocytopenia: A Contemporary Review. *J. Clin. Med.*, 2024, 13(16), 4686.

Zehnder JL. Lijekovi za liječenje poremećaja koagulacije. U: Temeljna i klinička farmakologija. Katzung BG, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2020, str. 608-625.



## 8. SAŽETAK

U svijetu je vidljiv trend porasta incidencije tromboembolijskih bolesti, a glavni alat u kontroli ovih bolesti predstavljaju antikoagulansi. Sa sve većom upotrebom direktnih oralnih antikoagulansa u liječenju ovih bolesti, javljaju se novi izazovi za kliničke laboratorije. Iako su DOAK-i lijekovi za koje nije potrebno rutinsko praćenje, postaje jasno da određene situacije ipak zahtijevaju njihovo određivanje. Ovaj rad donosi pregled recentnih znanstvenih spoznaja o laboratorijskim pretragama koje se mogu koristiti za određivanje koncentracije DOAK-a te objašnjava utjecaj DOAK-a na tradicionalne probirne pretrage hemostaze. Jasno je da rutinski testovi poput PV, APTV ili TV nisu dovoljno osjetljivi za procjenu antikoagulacijskog učinka ili čak detekciju DOAK-a u pacijenata, ali je važno da su laboratoriji upoznati s utjecajem DOAK-a na ove pretrage. Za određivanje koncentracije DOAK-a u plazmi mogu se koristiti specifične kromogene i koagulometrijske metode; za izravne inhibitore trombina diluirano trombinsko vrijeme, ekarinska kromogena metoda, ekarinski koagulometrijski test i anti-FIIa test, a za izravne inhibitore FXa anti-FXa test.

## **8. SUMMARY**

There is a prominent global trend of increasing incidence of thromboembolic diseases, and the main tool for controlling these conditions is anticoagulant therapy. With the growing use of direct oral anticoagulants (DOACs) in the treatment of these diseases, new challenges are emerging for clinical laboratories. Although DOACs do not require routine monitoring, it is becoming clear that certain situations do require their measurement. This paper provides an overview of recent scientific findings on laboratory tests that can be used to determine DOAC concentrations and explains the impact of DOACs on traditional hemostasis screening tests. It is evident that routine tests such as PT, aPTT, or TT are not sensitive enough to assess the anticoagulant effect or even detect DOACs in patients, but it is important that laboratories are aware of the impact of DOACs on these tests. Specific chromogenic and coagulometric methods can be used to determine DOAC concentrations in plasma; for direct thrombin inhibitors, diluted thrombin time, ecarin chromogenic method, ecarin clotting test, and anti-FIIa test can be used, while for direct factor Xa inhibitors, the anti-FXa test is appropriate.

## LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA KOD PRIMJENE DIREKTNIH ORALNIH ANTIKOAGULANSA

Petra Gluščić

### SAŽETAK

U svijetu je vidljiv trend porasta incidencije tromboembolijskih bolesti, a glavni alat u kontroli ovih bolesti predstavljaju antikoagulansi. Sa sve većom upotrebom direktnih oralnih antikoagulansa u liječenju ovih bolesti, javljaju se novi izazovi za kliničke laboratorije. Iako su DOAK-i lijekovi za koje nije potrebno rutinsko praćenje, postaje jasno da određene situacije ipak zahtijevaju njihovo određivanje. Ovaj rad donosi pregled recentnih znanstvenih spoznaja o laboratorijskim pretragama koje se mogu koristiti za određivanje koncentracije DOAK-a te objašnjava utjecaj DOAK-a na tradicionalne probirne pretrage hemostaze. Jasno je da rutinski testovi poput PV, APTV ili TV nisu dovoljno osjetljivi za procjenu antikoagulacijskog učinka ili čak detekciju DOAK-a u pacijenata, ali je važno da su laboratoriji upoznati s utjecajem DOAK-a na ove pretrage. Za određivanje koncentracije DOAK-a u plazmi mogu se koristiti specifične kromogene i koagulometrijske metode; za izravne inhibitore trombina diluirano trombinsko vrijeme, ekarinska kromogena metoda, ekarinski koagulometrijski test i anti-FIIa test, a za izravne inhibitore FXa anti-FXa test.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 7 slika, 6 tablica i 58 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Direktni oralni antikoagulansi, laboratorijska dijagnostika, koagulacijski testovi.

Mentor: **Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Lovorka Vujić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Andrea Čeri**, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: studeni 2024.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### LABORATORY DIAGNOSTICS IN THE USE OF DIRECT ORAL ANTICOAGULANTS

Petra Gluščić

#### SUMMARY

There is a prominent global trend of increasing incidence of thromboembolic diseases, and the main tool for controlling these conditions is anticoagulant therapy. With the growing use of direct oral anticoagulants (DOACs) in the treatment of these diseases, new challenges are emerging for clinical laboratories. Although DOACs do not require routine monitoring, it is becoming clear that certain situations do require their measurement. This paper provides an overview of recent scientific findings on laboratory tests that can be used to determine DOAC concentrations and explains the impact of DOACs on traditional hemostasis screening tests. It is evident that routine tests such as PT, aPTT, or TT are not sensitive enough to assess the anticoagulant effect or even detect DOACs in patients, but it is important that laboratories are aware of the impact of DOACs on these tests. Specific chromogenic and coagulometric methods can be used to determine DOAC concentrations in plasma; for direct thrombin inhibitors, diluted thrombin time, ecarin chromogenic method, ecarin clotting test, and anti-FIIa test can be used, while for direct factor Xa inhibitors, the anti-FXa test is appropriate.

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

Thesis includes: 45 pages, 7 figure, 6 tables and 58 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Direct oral anticoagulants, laboratory diagnostics, coagulation assays.

Mentor: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lovorka Vujić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Andrea Čeri, Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2024.