

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Jelena Buben

**ISPITIVANJE I USPOREDBA UČINKA KOMERCIJALNE DOAC-STOP
TABLETE I *IN HOUSE* OPTIMIRANE METODE S MEDICINSKIM
AKTIVNIM UGLJENOM NA UKLANJANJE INTERFERENCIJE
DIREKTNIH ORALNIH ANTIKOAGULANTNIH LIJEKOVA U
ODREĐIVANJU PRETRAGE LUPUS ANTIKOAGULANS**

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je u Kliničkom zavodu za kemiju, KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu pod stručnim vodstvom mentorice doc. dr. sc. Sandre Šuprahe Gorete i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Sandre Margetić, znanstvene suradnice. Rad je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2018/2019. Eksperimentalni dio ovog rada financijski je podržan od 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“.

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Hemostatski sustav..... | 1 |
| 1.1.1. Sustav zgrušavanja..... | 1 |
| 1.1.2. Fibrinolitički sustav..... | 2 |
| 1.2. Trombofilija..... | 3 |
| 1.2.1. Antifosfolipidna protutijela kao uzrok trombofilije..... | 5 |
| 1.2.2. Laboratorijska dijagnostika lupus antikoagulansa..... | 6 |
| 1.3. Antikoagulantna terapija..... | 8 |
| 1.3.1. Direktni (novi) oralni antikoagulansi..... | 9 |
| 1.3.1.1. Utjecaj direktnih oralnih antikoagulansa na rezultate probirnih koagulacijskih pretraga..... | 11 |
| 1.3.1.2. Metode kvantitativnog određivanja koncentracije direktnih oralnih antikoagulansa..... | 12 |
| 1.3.1.3. Utjecaj direktnih oralnih antikoagulansa na rezultate pretrage lupus antikoagulans..... | 13 |
| 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA..... | 15 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 16 |
| 3.1. Ispitanici..... | 16 |
| 3.2. Uzorci..... | 16 |
| 3.3. Materijali..... | 17 |
| 3.4. Metode..... | 18 |
| 3.4.1. Određivanje koncentracije direktnih oralnih antikoagulansa..... | 18 |
| 3.4.1.1. Određivanje koncentracije dabigatrana..... | 18 |
| 3.4.1.2. Određivanje koncentracije rivaroksabana i apiksabana..... | 19 |
| 3.4.2. Određivanje lupus antikoagulansa..... | 20 |
| 3.4.3. Postupak određivanja pretrage lupus antikoagulans nakon dodatka komercijalne <i>DOAC-StopTM tablete</i> i medicinskog aktivnog ugljena..... | 21 |
| 3.4.3.1. Postupak s uzorkom kojemu je dodana <i>DOAC-StopTM tableta</i> | 22 |
| 3.4.3.2. Postupak s uzorkom kojemu je dodan medicinski aktivni ugljen..... | 22 |
| 3.5. Statistička obrada podataka..... | 24 |
| 4. REZULTATI..... | 26 |
| 4.1. Rezultati određivanja koncentracije DOAC lijekova i probirne i potvrdne dRVVTpretrage u dijagnostici LA u bolesnika liječenih DOAC lijekovima..... | 26 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.2. | Rezultati određivanja probirne (dRVVTs) i potvrdne (dRVVTc) pretrage u dijagnostici LA u bolesnika liječenih DOAC lijekovima s lažno pozitivnim rezultatom pretrage LA nakon dodatka komercijalne DOAC-Stop™ tablete i medicinsko aktivnog ugljena | 32 |
| 4.3. | Rezultati određivanja koncentracije DOAC lijekova u uzorcima plazme bolesnika s lažno pozitivnim rezultatom pretrage LA nakon dodatka komercijalne DOAC-Stop™ tablete i medicinskog aktivnog ugljena | 41 |
| 4.4. | Rezultati određivanja probirne dRVVT i potvrdne dRVVT pretrage te izračun LA omjera u uzorcima plazme bolesnika sa stvarno pozitivnim rezultatom pretrage LA i nakon dodatka komercijalne DOAC-Stop™ tablete i medicinskog aktivnog ugljena | 41 |
| 5. | RASPRAVA | 44 |
| 6. | ZAKLJUČAK..... | 50 |
| 7. | ZAHVALE | 51 |
| 8. | LITERATURA..... | 52 |
| 9. | SAŽETAK | 59 |
| 9. | SUMMARY..... | 61 |

POPIS KRATICA

aCL - antikardiolipinska protutijela (engl. *anticardiolipin antibodies*)
AIM - akutni infarkt miokarda
anti- β_2 -GP1 - anti- β_2 -glikoproteinska protutijela (engl. *anti- β_2 -glycoprotein antibodies*)
APCR - rezistencija na aktivirani protein C (engl. *resistance to activated protein C*)
aPL - antifosfolipidna protutijela (engl. *antiphospholipid antibodies*)
APS - antifosfolipidni sindrom
APTV - aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
AT - antitrombin
DTI - izravni inhibitori trombina (engl. *direct thrombin inhibitors*)
DOAC - direktni oralni antikoagulacijski lijekovi (engl. *direct oral anticoagulants*)
dRVVT - razrijeđeno vrijeme zgrušavanja zmijskog venoma Russelove ljutice (engl. *dilute Russell Viper Venom time*)
dRVVTs - probirni test razrijeđenog vremena zgrušavanja zmijskog venoma Russelove ljutice (engl. *dilute Russell Viper Venom time screen*)
dRVVTc - potvrdni test razrijeđenog vremena zgrušavanja zmijskog venoma Russelove ljutice (engl. *dilute Russell Viper Venom time confirm*)
dTV - razrijeđeno trombinsko vrijeme (engl. *diluted thrombin time*)
DVT - duboka venska tromboza
ES - endotelne stanice
FVL - faktor V Leiden (engl. *factor V Leiden*)
FXa - aktivirani čimbenik Xa (engl. *activated factor Xa*)
IgG - imunoglobulin G
IgM - imunoglobulin M
IQR - interkvartilni raspon (engl. *interquartile range*)
LA - lupus antikoagulans
LC/MS-MS - tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. *liquid chromatography/mass spectrometry*)
LMWH - niskomolekularni heparin (engl. *low molecular weight heparin*)
NOAC - novi oralni antikoagulansi (engl. *new (novel) oral anticoagulants*)
NVAF - nevalvularna fibrilacija atrijska (engl. *nonvalvular atrial fibrillation*)
PE - plućna embolija

PV - protrombinsko vrijeme

SE - sistemna embolija

TF - tkivni čimbenik (engl. *tissue factor*)

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

TPA - tkivni aktivator plazminogena

TV - trombinsko vrijeme

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

UPA - urokinazni aktivator plazminogena

vWF - von Willebrandov čimbenik (engl. *von Willebrand factor*)

VTE - venska tromboembolija

95%CI - 95%-tni interval pouzdanosti (engl. *95% confidence interval*)

1. UVOD

1.1. Hemostatski sustav

Hemostatski sustav obuhvaća strogo regulirane fiziološke procese zgrušavanja krvi i vaskularnog popravka koji omogućuju zaustavljanje krvarenja nakon ozljede krvne žile te uklanjanje tako stvorenog krvnog ugruška nakon obnove vaskularnog integriteta.

Ozljedom krvne žile, aktivacija hemostatskog sustava odvija se međusobno povezanim i strogo reguliranim djelovanjem pojedinih sastavnica, koje uključuju sustav zgrušavanja (čini ga primarna i sekundarna hemostaza) i fibrinolitički sustav.

1.1.1. Sustav zgrušavanja

Aktivacija sustava zgrušavanja započinje procesom primarne hemostaze neposredno nakon ozljede krvne žile, u kojem ključnu ulogu imaju vaskularne endotelne stanice (ES) i trombociti, pri čemu nastaje primarni ili trombocitni ugrušak na mjestu ozljede (McKenzie i Williams, 2014). Ozljedom krvne žile cirkulirajuća krv biva izravno izložena subendotelnom tkivu, a posljedično stvaranje trombocitnog ugruška odvija se međusobno povezanim procesima adhezije (prianjanje trombocita na kolagen u subendotelu), aktivacije (morfološke i funkcionalne promjene trombocita) i agregacije (međusobno sljepljivanje) aktiviranih trombocita (Margetić i sur., 2018). U pojedinim segmentima procesa primarne hemostaze sudjeluju brojni trombocitni membranski receptori i adhezivni proteini. Daljnjom aktivacijom sustava zgrušavanja, na proces primarne hemostaze nadovezuje se sekundarna hemostaza kojom se u nizu složenih reakcija aktiviraju pojedini čimbenici zgrušavanja s posljedičnim stvaranjem fibrina, odnosno stabilnog trombocitno-fibrinskog ugruška (Versteeg i sur., 2013). Prema danas prihvaćenom staničnom modelu aktivacije zgrušavanja kojeg su 2001. godine utemeljili Hoffman i suradnici (Hoffman, 2003), ovaj se proces sastoji od tri faze: inicijacijske, amplifikacijske i propagacijske. Osnovnu ulogu u kontroli i usmjeravanju procesa hemostaze imaju trombociti i stanice koje na svojoj površini sadrže tkivni čimbenik (TF, engl. *tissue factor*). Aktivacija sustava zgrušavanja u procesu sekundarne hemostaze počinje izlaganjem

TF cirkulirajućoj krvi. TF se nalazi na unutarnjoj strani membrane stanica brojnih organa, a u cirkulaciju dopijeva nakon ozljede i posljedičnog oslobađanja iz liziranih stanica (Morrissey i sur., 2012). Tijekom inicijacijske faze aktivacije zgrušavanja, u cirkulaciju dospjeli TF veže se s FVII u aktivni kompleks (TF-FVIIa), koji potom posreduje u aktivaciji čimbenika zgrušavanja FIX i FX u FIXa i FXa. Tako aktivirani FXa s kočimbenikom FVa tvori tzv. kompleks protrombinaze, koji omogućuje stvaranje prvih količina trombina aktivacijom protrombina (FII). Stvoreni trombin potom aktivira čimbenike zgrušavanja FV i FVIII u amplifikacijskoj fazi zgrušavanja. Središnju ulogu u fazi amplifikacije, kao i kasnije propagacijske faze imaju trombociti, na čijim se aktiviranim površinama odvijaju ključne reakcije plazmatske faze zgrušavanja. Na aktiviranim trombocitima tako se djelovanjem aktiviranog čimbenika XI (FXIa) FIX aktivira u FIXa koji se izravno veže s čimbenikom VIII (FVIII) u tzv. tenazni kompleks (FVIIIa/FIXa). Stvoreni kompleksi (tenazni i kompleks protrombinaze) ključni su za stvaranje većih količina trombina potrebnog za pretvorbu fibrinogena u fibrin i posljedično stvaranje stabilnog trombocitno-fibrinskog ugruška. Pretvorba fibrinogena u fibrin rezultira stvaranjem monomera fibrina čijom daljnjom polimerizacijom uz djelovanje aktiviranog čimbenika XIII (FXIIIa) nastaju fibrino polimeri, odnosno, stabilan fibrinski ugrušak čime završava proces zgrušavanja cirkulirajuće krvi na mjestu ozljede krvne žile.

Osim navedenih sastavnica primarne i sekundarne hemostaze koje sudjeluju u opisanoj aktivaciji sustava zgrušavanja nakon ozljede krvne žile, u cirkulaciji su prisutni i fiziološki inhibitori zgrušavanja čija je osnovna funkcija sprječavanje spontane aktivacije sustava zgrušavanja i ograničavanje aktivacije zgrušavanja na samo mjesto ozljede. Ključni fiziološki inhibitori zgrušavanja su antitrombin (AT), protein C (PC), protein S (PS) i inhibitor puta tkivnog čimbenika (TFPI, engl. *tissue factor pathway inhibitor*).

1.1.2. Fibrinolitički sustav

Fibrinolitički sustav je sastavnica hemostatskog sustava koja se aktivira usporedo s aktivacijom sustava zgrušavanja, s osnovnim ciljem ograničavanja stvaranja ugruška na mjesto ozljede i konačne razgradnje fibrinskog ugruška koji je ispunio svoju funkciju zaustavljanja krvarenja (Smith, 2010). Ključna sastavnica fibrinolitičkog sustava je plazminogen (stvora se u jetri) koji se djelovanjem aktivatora

plazminogena prevodi u aktivan funkcionalni oblik plazmin. Djelovanjem plazmina, stvoreni fibrin kida se u razgradne produkte te nastaju tzv. razgradni produkti fibrinogena i fibrina (FDP, engl. *fibrin(ogen) degradation products*) različite veličine, među kojima je najmanji i specifičan razgradni produkt fibrina razgrađenog plazminom D-dimer (Chapin i sur., 2015). Stvoreni FDP produkti inhibiraju daljnju polimerizaciju fibrina i agregaciju trombocita i na taj način sprječavaju daljnju aktivaciju sustava zgrušavanja. Analogno sustavu zgrušavanja, i fibrinolitički sustav je strogo reguliran ravnotežnim djelovanjem komponenata koje djeluju kao aktivatori i inhibitori fibrinolize. Aktivatori fibrinolitičkog sustava su tkivni aktivator plazminogena (tPA) i urokinazni aktivator plazminogena (uPA). tPA, koji se sintetizira u endotelnim stanicama ima ključnu ulogu u aktivaciji plazminogena u vaskularnom sustavu, a uPA u ekstravaskularnom tkivu. uPA sintetiziraju stanice slične fibroblastima, epitelne stanice bubrežnih tubula i monociti, a ES-e stvaraju i prethodnik prourokinazu.

U normalnim fiziološkim uvjetima sve sastavnice sustava zgrušavanja i fibrinolize nalaze se u strogo reguliranoj dinamičkoj ravnoteži. Ovakvom regulacijom spriječena je i smanjena i pojačana koagulabilnost cirkulirajuće krvi. Ukoliko dođe do poremećaja takve ravnoteže, uslijed pojačane ili smanjene aktivnosti pojedinih komponenata sustava zgrušavanja ili fibrinolize, poremećaj se očituje u cjelokupnom hemostatskom sustavu, a ovisno u samoj prirodi i uzroku, klinički se očituje pojačanom sklonošću krvarenju (hipokoagulabilnost) ili trombozi (hiperkoagulabilnost).

1.2. Trombofilija

Trombofilija se definira kao povećana sklonost hiperkoagulabilnosti cirkulirajuće krvi ili trombozi, a obilježava ju nastanak patološkog krvnog ugruška ili tromba. Uzroci nastanka tromboze mogu biti genetski ili stečeni čimbenici, odnosno kombinirani. Prema mjestu nastanka tromba, tromboza može biti arterijska ili venska. Venska tromboembolija (VTE) klinički se očituje kao duboka venska tromboza (DVT) i/ili plućna embolija (PE), a arterijska tromboza kao akutni infarkt miokarda (AIM) ili moždani udar. Tromboembolijske bolesti, uključujući i arterijsku i vensku trombozu, s obzirom na izrazito visoku pojavnost i visok stupanj morbiditeta i mortaliteta, predstavljaju značajan javnozdravstveni problem u razvijenim zemljama, pa tako i u Republici Hrvatskoj (Cohen i sur., 2007; Hutchinson i sur., 2007; Kralj i sur., 2007).

Najznačajniji genetski čimbenici povezani s trombofilijom uključuju rezistenciju na aktivirani protein C (APCR) ili mutaciju faktor V Leiden (FVL), mutaciju gena za FII ili protrombin, nasljedni nedostatak nekog od fizioloških inhibitora zgrušavanja PC, PS ili AT (Margetić, 2014). Navedeni nasljedni čimbenici gotovo uvijek su povezani s nastankom VTE, dok njihova povezanost s arterijskom trombozom do danas nije jednoznačno dokazana. Znatno rjeđi genetski uzroci trombofilije su hiperhomocisteinemija i disfibrinogenemija, koji su za razliku od prethodno navedenih čimbenika povezani s nastankom i arterijske i venske tromboze. Genetski čimbenici koji se posljednjih godina također povezuju s trombofilijom uključuju i povećanu aktivnost čimbenika zgrušavanja VIII (FVIII), a prema najnovijim istraživanjima istraživanjima i mutacije gena za čimbenike zgrušavanja IX (FIX) i XI (FXI).

Osim navedenih genetskih čimbenika rizika, uzrok trombofilije mogu biti i stečeni čimbenici rizika. Tako je prisutnost cirkulirajućih antifosfolipidnih protutijela (aPL), uključujući lupus antikoagulans (LA), antikardiolipinska protutijela (aCL) i anti- β 2-glikoprotein 1 (anti- β 2-GP1) protutijela, važan stečeni čimbenik rizika koji se klinički može očitovati i venskom i arterijskom trombozom (Pengo i sur., 2018; Miyakis i sur., 2006). Pored navedenog, i brojni tzv. privremeni ili prolazni čimbenici prisutni u različitim patofiziološkim stanjima, kao što su trauma, kirurški zahvat, imobilizacija, trudnoća, primjena hormonske nadomjesne terapije ili oralnih kontraceptiva te paroksizmalna noćna hemoglobinurija, zasebno ili u kombinaciji s ranije navedenim trajnim genetskim ili stečenim čimbenicima također doprinose povećanoj sklonosti trombozi, i to prvenstveno VTE. Klinička manifestacija tromboembolije tako se najčešće događa u osoba koje imaju neki od nasljednih ili stečenih čimbenika, ali i u patofiziološkim stanjima u kojima je prisutan neki od privremenih (prolaznih) stečenih čimbenika rizika, s obzirom da pojedini čimbenici rizika imaju sinergistički i kumulativan učinak.

Za razliku od navedenih nezavisnih čimbenika VTE, arterijska tromboza najčešće je povezana sa stečenim čimbenicima kao što su hipertenzija, pretilost, hiperlipidemija i šećerna bolest. Među ranije navedenim nezavisnim čimbenicima rizika za VTE, samo za neke je do danas jednoznačno potvrđeno da uzrokuju i arterijsku trombozu, među koje se ubrajaju hiperhomocisteinemija, disfibrinogenemija i prisutnost cirkulirajućih antifosfolipidnih protutijela.

1.2.1. Antifosfolipidna protutijela kao uzrok trombofilije

Antifosfolipidna protutijela predstavljaju heterogenu skupinu autoprotutijela usmjerenih na fosfolipid-vezujuće plazmatske proteine. Prisutnost aPL u plazmi povezana je s kliničkim sindromom, poznatim kao antifosfolipidni sindrom (APS), koji uzrokuje nastanak venske i/ili arterijske tromboze i ponavljanih spontanih pobačaja te drugih komplikacija trudnoće (Chaturvedi i sur., 2017; Andreoli i sur., 2013; Galli i sur., 2003). Posljednjih tridesetak godina kontinuirano se istražuju mehanizmi kojima aPL sudjeluju u patogenezi APS-a te se danas smatra da su aktivacija ciljnih hemostatskih stanica (trombocita i ES), monocita kao upalnih stanica, kao i aktivacija i poremećaji sustava hemostaze u smjeru prokoagulantnog stanja, uz aktivaciju sustava komplementa, ključni mehanizmi odgovorni za kliničke manifestacije ovog sindroma, u prvom redu arterijske i venske tromboze.

Dijagnostički kriteriji APS-a uključuju istodobnu prisutnost i kliničkih i laboratorijskih pokazatelja, pa je za postavljanje dijagnoze APS-a potrebno dokazati prisutnost najmanje jednog kliničkog kriterija (primjerice tromboza ili ponavljani spontani pobačaj) i jednog laboratorijskog kriterija (prisutnost jedne ili više podskupina aPL u cirkulaciji).

Cirkulirajuća aPL čine heterogenu skupinu autoprotutijela, koja se na temelju metoda njihova određivanja dijele u tri glavne skupine: lupus antikoagulans (LA), antikardiolipinska protutijela (aCL) i anti- β_2 -glikoprotein-1 protutijela (anti- β_2 -GP1) (Pengo i sur., 2018; Miyakis i sur., 2006). Dokazivanje prisutnosti LA protutijela u plazmi određuje se funkcionalnim koagulacijskim testovima, dok se aCL i anti- β_2 -GP1 protutijela određuju imunokemijskim testovima koji uključuju određivanje IgG i IGM izotipova ovih protutijela. Važno je naglasiti da laboratorijska dijagnostika APS-a mora uvijek uključiti određivanje sve tri navedene skupine protutijela (Miyakis i sur., 2006). Laboratorijski kriterij potreban za postavljanje dijagnoze APS-a je, kako je već navedeno, pozitivan rezultat za jednu, dvije ili sve tri skupine aPL protutijela u dva nezavisna mjerenja u vremenskom razmaku od najmanje 12 tjedana (Pengo i sur., 2018; Gomez-Puerta i sur., 2014; Miyakis i sur., 2006).

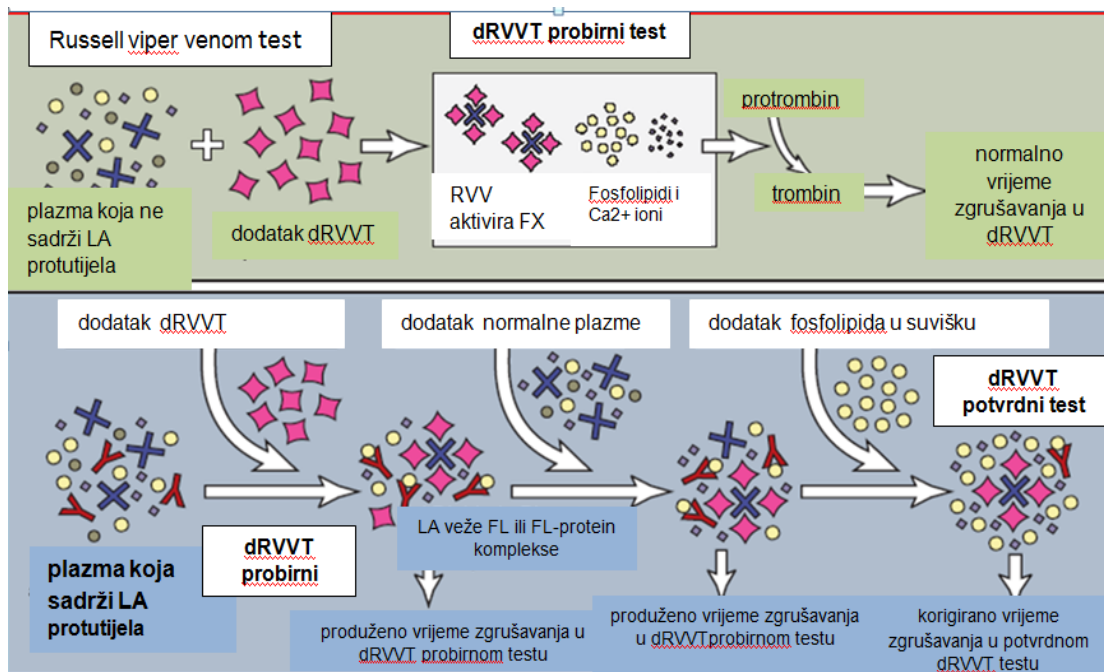
1.2.2. Laboratorijska dijagnostika lupus antikoagulansa

Dokazivanje antifosfolipidnih protutijela koja pripadaju skupini LA neizostavni su dio laboratorijske dijagnostike aPL-a. Dijagnostički postupak za dokazivanje LA protutijela izvodi se u specijaliziranim laboratorijima za ispitivanje poremećaja hemostaze i uključuje pretrage probira i potvrde. Naime, budući da niti jedna zasebno učinjena laboratorijska koagulacijska pretraga nije dovoljno osjetljiva i specifična za dijagnostiku LA, dijagnostički postupak za dokazivanje LA protutijela izvodi se istodobnom kombinacijom više koagulacijskih pretraga različite dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti. Prema trenutno važećim smjericama, dijagnostički je potrebno odrediti najmanje dvije pretrage probira koje se temelje na primjeni različitih mjernih načela te najmanje jednu potvrdnu pretragu (Moore, 2014; Pengo i sur., 2009).

Laboratorijska dijagnostika LA primjenom kombinacije koagulacijskih pretraga temelji se na dokazivanju: 1. produženog najmanje jednog koagulacijskog testa ovisnog o fosfolipidima, 2. dokazivanju inhibicijskog učinka aPL protutijela i 3. potvrdi inhibicijskog učinka aPL protutijela dodatkom fosfolipida u suvišku. Navedene kriterije koji dokazuju prisutnost LA osiguravaju mjerni postupci koji uključuju probirne testove, test miješanja i potvrdni test. Među koagulacijskim pretragama kojima dokazujemo produženo vrijeme koagulacijskog testa ovisnog o fosfolipidima, najčešće se izvodi pretraga aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) uz reagens osjetljiv na LA, dok se u drugom dijagnostičkom koraku kao test znatno veće osjetljivosti i specifičnosti neizostavno koristi tzv. dRVVT probirni test (dRVVTs, engl. *dilute Russell viper venom time test screen*) uz nizak sadžaj fosfolipida u sastavu reagensa. Inhibicijski učinak LA protutijela dokazuje se testom miješanja plazme ispitanika i normalne plazme pri čemu na prisutnost LA protutijela ukazuje izostanak korekcije inicijalno određenog produženog koagulacijskog testa ovisnog o fosfolipidima (najčešće APTV u testu miješanja). Potvrda inhibicijskog učinka LA protutijela izvodi se dRVVT potvrdnim testom (dRVVTc, engl. *dilute Russell viper venom time test confirm*) uz dodatak fosfolipida u suvišku.

Izvođenje probirne i potvrdne dRVVT pretrage neizostavni su dio laboratorijske dijagnostike LA zbog značajno veće dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti u odnosu na opće pretrage probira (primjerice APTV i APTV u testu

miješanja). DRVVT probirni i potvrdni test temelje se na primjeni zmijskog venoma Russellove ljutice (RVV, engl. *Russell viper venom*).



Slika 1. Načelo dokazivanja antifosfolipidnih LA protutijela primjenom dRVVT probirne i potvrdne pretrage.

Preuzeto iz: <http://www.perthhaematology.com.au/aps.htm>

Probirni dRVVT test (dRVVTs) uz zmijski venom sadrži i vrlo malu količinu fosfolipida. Primjena RVV zmijskog venoma kao reagensa u dRVVT testovima omogućuje izravnu *in vitro* aktivaciju čimbenika zgrušavanja X (FX) koji potom zajedno s FVa i fosfolipidima formira kompleks protrombinaze zaslužan za pretvorbu protrombina u trombin na fosfolipidnoj površini što rezultira nastankom fibrinskog ugruška. U prisutnosti antifosfolipidnih LA protutijela u plazmi ispitanika, vrijeme zgrušavanja dRVVT probirnog testa (dRVVTs) je produženo zbog interferirajućeg utjecaja ovih protutijela u nastanku protrombinskog kompleksa. Produženje vremena zgrušavanja dRVVT probirnog koagulacijskog testa razmjerno je količini LA protutijela u cirkulaciji.

U potvrdnom dRVVT testu (dRVVTc) uz istu količinu zmijskog venoma prisutni su i fosfolipidi u suvišku, što rezultira značajnom korekcijom vremena zgrušavanja u prisutnosti LA protutijela u plazmi bolesnika zbog neutralizacije LA protutijela velikom količinom fosfolipida u sastavu reagensa. Konačni rezultat ispitivanja izražava se kao

omjer izračunat kao kvocijent vremena zgrušavanja u probirnom i potvrdnom dRVVT testu, pri čemu vrijednost omjera veća od granične vrijednosti (engl. *cut-off value*) za odgovarajući komercijalni probirni i potvrdni test označava pozitivan rezultat LA protutijela. Shematski prikaz načela dokazivanja LA protutijela primjenom dRVVT probirnog i potvrdnog testa prikazan je na Slici 1.

U opisanom postupku određivanja LA protutijela koagulacijskim pretragama koje se temelje na dRVVT probirnom i potvrdnom testu, brojni predanalitički čimbenici mogu utjecati na rezultat pretraga (Margetić, 2014). Među ključnim predanalitičkim čimbenicima je izvođenje pretrage LA u bolesnika na bilo kojoj vrsti antikoagulantne terapije, uključujući antagoniste vitamina K (VKAs, engl. *vitamin K antagonists*), heparin (posebice nefrakcionirani) i izravne (nove) oralne antikoagulanse (DOACs, engl. *direct oral anticoagulants*; NOAC, engl. *new or novel oral anticoagulants*) (Antovic i sur., 2017; Hoxha i sur., 2017). Zbog interferirajućeg utjecaja antikoagulantnih lijekova na rezultate dijagnostičkog postupka za LA u smislu lažno pozitivnog rezultata pretrage, izvođenje pretrage LA u ovih bolesnika danas je značajan dijagnostički problem s kojim se specijalizirani laboratoriji za ispitivanje hemostaze, jednako kao i liječnici koji liječe ove bolesnike, suočavaju u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

1.3. Antikoagulantna terapija

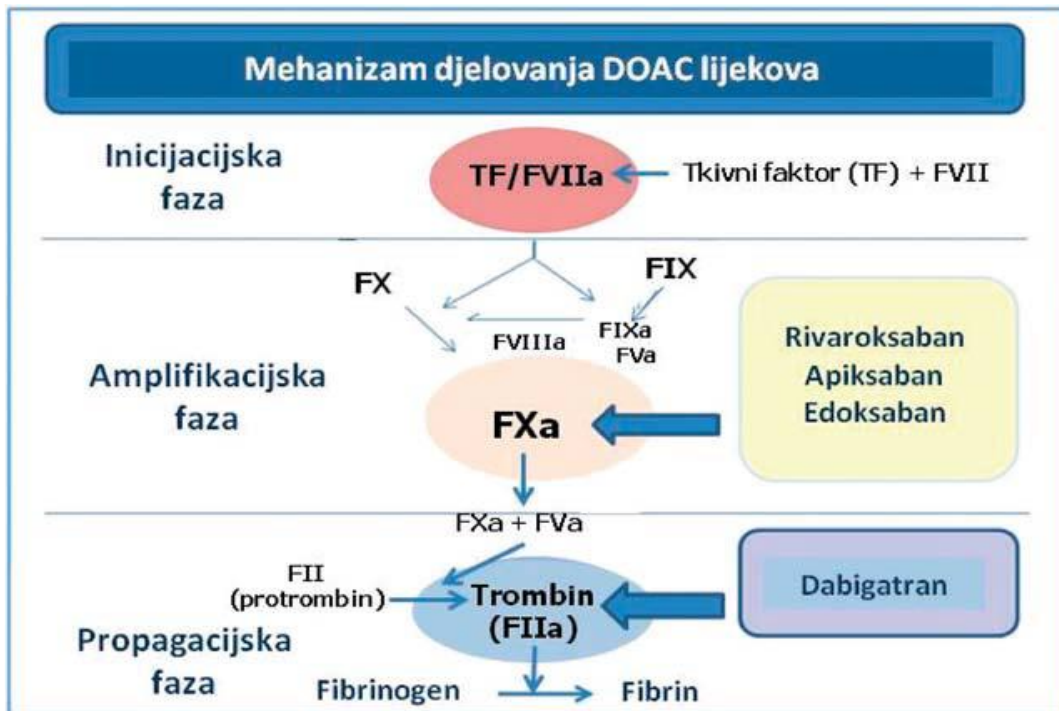
U prevenciji i liječenju venskih i arterijskih tromboembolijskih stanja, osnovni terapijski pristup predstavlja primjena antikoagulacijskih lijekova. Ovim lijekovima ciljano se postiže hipokoagulabilnost cirkulirajuće krvi inaktivacijom jednog ili više čimbenika zgrušavanja. Antikoagulacijski lijekovi koji se već desetljećima primjenjuju u pojedinim fazama prevencije i liječenja tromboembolije su heparini i VKAs (Franchini i sur., 2016; Harter i sur., 2015). Antikoagulacijski učinak heparina nakon parenteralne primjene posredovan je vezanjem lijeka na AT, fiziološki inhibitor zgrušavanja, i posljedičnom inaktivacijom pojedinih čimbenika zgrušavanja (FIIa ili trombin, FIXa, FXa, FXIa i FXIIa), ovisno o tome primjenjuje li se nefrakcionirani heparin (UFH, engl. *unfractionated heparin*) ili niskomolekularni heparin (LMWH, engl. *low molecular weight heparin*) (Weitz, 2017). VKAs su kemijski spojevi koji svoj antikoagulacijski učinak ostvaruju sprječavanjem posttranslacijske gama-karboksilacije glutaminske kiseline u strukturi čimbenika zgrušavanja ovisnih o

vitaminu K (FII, FVII, FIX i FX), pri čemu nastaju nefunkcionalni oblici ovih čimbenika zgrušavanja (Ansell i sur., 2008).

1.3.1. Direktni (novi) oralni antikoagulansi

Iako se navedeni „stari“ antikoagulacijski lijekovi, heparini i VKAs, desetljećima uspješno primjenjuju u prevenciji i liječenju tromboembolije, ovi lijekovi ujedno imaju i određene nedostatke, uključujući usku terapijsku širinu i posljedičnu potrebu za kontinuiranim laboratorijskim praćenjem, interakcije s hranom i brojnim drugim lijekovima (istodobna primjena VKA lijekova i drugih lijekova) ili isključivo parenteralna primjena (heparini), kao i neželjene učinke liječenja, među kojima je najvažniji povećana sklonost krvarenju kao nuspojava svih antikoagulantnih lijekova (Fitzmaurice i sur., 2002).

Nepostojanje „idealnog“ antikoagulacijskog lijeka koji bi imao izvrsnu kliničku učinkovitost, ali i sigurnost liječenja bez popratnih neželjenih učinaka, te istodobno sve bolje razumijevanje patofizioloških procesa u tromboembolijskim bolestima, posljednjih su godina rezultirali intenzivnim istraživanjima vezanim uz pronalazak novih oralnih antikoagulantnih lijekova čije bi djelovanje bilo selektivno i ciljano usmjereno na inhibiciju točno određenog dijela sustava zgrušavanja u svrhu postizanja veće kliničke učinkovitosti i sigurnosti u liječenju. Konačan rezultat ovih istraživanja bio je uvođenje nove generacije oralnih antikoagulacijskih lijekova neovisnih o vitaminu K, za koje koristimo naziv direktni (novi) oralni antikoagulansi (Barnes i sur., 2015). Prema mehanizmu djelovanja, DOAC lijekovi za sada dostupni u kliničkoj praksi dijele se u dvije skupine: izravni inhibitor trombina - dabigatran (zaštićeno ime Pradaxa[®], Boehringer Ingelheim) i izravni inhibitori aktiviranog čimbenika zgrušavanja X (FXa): rivaroksaban (zaštićeno ime Xarelto[®]; Bayer), apiksaban (Eliquis[®]; Pfizer) i najnoviji lijek edoksaban (Lixiana[®], Daiichi-Sankyo) (Slika 2).



Slika 2. Mehanizam djelovanja direktnih oralnih antikoagulansa.
 Preuzeto iz: Vuga I, Šupraha Goreta s, Margetić S. *Direktni oralni antikoagulacijski lijekovi. Farmaceutski glasnik. 2018;74;633-52.*

Odobrene kliničke indikacije za primjenu svih navedenih DOAC lijekova su primarna prevencija VTE u odraslih bolesnika koji se podvrgavaju ortopedskom kirurškom zahvatu, prevencija i liječenje VTE u odraslih bolesnika te prevencija moždanog udara i sistemne embolije (SE) u bolesnika s nevalvularnom fibrilacijom atrijske (NVA) (Mannucci i sur., 2011; Eikelboom i sur., 2010).

Osnovna obilježja navedenih DOAC lijekova u odnosu na VKA (varfarin) jesu bolja farmakodinamička i farmakokinetička svojstva uz posljedično predvidiv farmakološki odgovor na liječenje, primjena u fiksnim dozama, brzi početak djelovanja i značajno manje interakcija s hranom i drugim lijekovima (Masotti i sur., 2013). Zbog navedenih prednosti, posljednjih godina primjena DOAC lijekova u značajnom je i trajnom porastu te ovi lijekovi sve više zamjenjuju VKA, odnosno "stare" antikoagulantne lijekove.

1.3.1.1. Utjecaj direktnih oralnih antikoagulanasa na rezultate probirnih koagulacijskih pretraga

S uvođenjem DOAC lijekova u kliničku praksu, značajan izazov u području kliničke kao i laboratorijske medicine predstavljalo je pronalaženje i implementacija metoda prikladnih za procjenu antikoagulantnog učinka ovih lijekova. Naime, iako je temeljem dosadašnjih ispitivanja prihvaćeno stajalište da klinička primjena DOAC lijekova ne zahtijeva učestalo laboratorijsko praćenje jer se doziranje lijeka ne temelji na rezultatima laboratorijskih pretraga, rezultati prvih kliničkih iskustava pokazali su da liječenje DOAC lijekovima ne isključuje u potpunosti i potrebu za laboratorijskom dijagnostikom (Tripodi, 2013; Baglin i sur., 2012).

Temeljem niza dosadašnjih ispitivanja utvrđen je učinak pojedinih DOAC lijekova na probirne pretrage hemostaze, uključujući protrombinsko vrijeme (PV), APTV i trombinsko vrijeme (TV). Izravni inhibitor trombina (dabigatran) ima veći utjecaj na APTV, te izrazit utjecaj na TV, dok izravni inhibitori FXa (rivaroksaban, apiksaban, edoksaban) pokazuju jači utjecaj na rezultat pretrage PV. Međutim, značajne razlike u osjetljivosti različitih komercijalnih reagensa za mjerenje PV-a i APTV-a prema pojedinom DOAC lijeku te njihova nestandardiziranost za bolesnike liječene ovim lijekovima onemogućuju primjenu ovih pretraga u procjeni antikoagulantnog učinka DOAC-a (Adcock i sur., 2015; Adcock i sur., 2013). Nadalje, izravni inhibitor trombina, dabigatran, ima značajan utjecaj na rezultat pretrage TV, ali je ova pretraga zbog preosjetljivosti neprikladna za procjenu učinka dabigatana. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja i trenutno važećim smjernicama, opće pretrage hemostaze, zbog nestandardiziranosti za primjenu u bolesnika liječenih DOAC lijekovima, nisu prikladne za procjenu njihova antikoagulantnog učinka kao niti za procjenu doziranosti ili koncentracije lijeka u hitnim stanjima vitalno ugroženih bolesnika. (Gosselin i sur., 2018). Iako probirne koagulacijske pretrage nemaju odgovarajuću kliničku značajnost u bolesnika liječenih DOAC lijekovima, poznavanje utjecaja ovih lijekova na probirne pretrage hemostaze od ključne je važnosti jer je preduvjet za ispravnu interpretaciju dobivenih rezultata.

1.3.1.2. Metode kvantitativnog određivanja koncentracije direktnih oralnih antikoagulansa

Klinička iskustva primjene DOAC lijekova prvih nekoliko godina nakon njihova uvođenja pokazala su da je praćenje DOAC lijekova, odnosno određivanje koncentracije ovih lijekova u cirkulaciji potrebno u određenim kliničkim stanjima i populacijama bolesnika (Baglin i sur., 2013; Tripodi i sur., 2013). Stoga su, istovremeno s uvođenjem DOAC lijekova u kliničku primjenu, istraživanja bila usmjerena i na pronalaženje specifičnih koagulacijskih metoda koje omogućuju kvantitativno mjerenje koncentracije DOAC lijekova. Zlatni standard u određivanju koncentracije DOAC lijekova je metoda tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa (LC/MS-MS, engl. *liquid chromatography/mass spectrometry*), ali je ova metoda zbog svoje tehničke zahtjevnosti i skupoće opreme nedostupna u većini kliničkih laboratorija te je ograničena isključivo na istraživačku primjenu (Gosselin i sur., 2018). Stoga su kvantitativne metode određivanja DOAC lijekova razvijane u smjeru koji omogućuje njihovu implementaciju na automatizirane koagulacijske analizatore u specijaliziranim laboratorijima za ispitivanje poremećaja hemostaze. Tako primjenjive kvantitativne metode mjerenja koncentracije dabigatana uključuju koagulometrijske i kromogene metode (Douxflis i sur., 2013; Stangier i sur., 2012). Prva kvantitativna metoda određivanja dabigatana je tzv. razrijeđeno trombinsko vrijeme (dTV, engl. *diluted thrombin time*) koja se temelji na modifikaciji standardne metode koagulometrijskog mjerenja trombinskog vremena uz razrjeđivanje plazme normalnom plazmom i kalibraciju specifičnim kalibracijskim plazmama za lijek dabigatran. Razrjeđenje ispitivane plazme i primjena specifičnih kalibratora za izračun koncentracije dabigatana rezultira modifikacijom kojom se postiže linearan odnos trombinskog vremena i koncentracija dabigatana u širokom mjernom području (Božič-Mijovski i sur., 2016). Novije metode kvantitativnog mjerenja dabigatana temelje se na koagulometrijskoj i kromogenoj metodi uz primjenu zmijskog venoma ekarina kojim se protrombin prevodi u kratkoživući međuprodukt mezotrombin, čija se daljnja pretvorba u trombin određuje koagulometrijski ili kromogeno uz promjenu specifičnog kromogenog supstrata. Najnovija metoda određivanja dabigatana je kromogena metoda koja se temelji na određivanju tzv. anti-FIIa aktivnosti u kojoj se ispitivanoj plazmi dodaje FIIa u suvišku, a količina nevezanog ili ostatnog FIIa se određuje spektrofotometrijski uz primjenu specifičnog kromogenog supstrata

(Gosselin i sur., 2018). Metode kvantitativnog određivanja koncentracije DOAC lijekova iz skupine izravnih inhibitora FXa temelje se isključivo na kromogenoj metodi mjerenja anti-FXa aktivnosti uz primjenu odgovarajućih kalibracijskih plazmi specifičnih za lijek čija se koncentracija određuje (Harenberg i sur., 2011; Becker i sur., 2011). Uzorku ispitivane plazme dodaje se FXa u suvišku koji u prisutnosti lijeka koji djeluje kao inhibitor FXa stvara kompleks s lijekom, te se ostatna količina nevezanog FXa potom određuje spektrofotometrijski u reakciji sa specifičnim kromogenim supstratom. Opisane kvantitativne metode određivanja DOAC lijekova još se uvijek gotovo isključivo koriste u istraživačke svrhe, ali je za očekivati da će u narednih nekoliko godina uslijediti i njihovo uvođenje u rutinski rad specijaliziranih laboratorija za ispitivanje poremećaja hemostaze.

1.3.1.3. Utjecaj direktnih oralnih antikoagulansa na rezultate pretrage lupus antikoagulans

Liječenje bolesnika DOAC lijekovima ima značajan utjecaj i na rezultate brojnih specijalističkih pretraga među kojima je ključno naglasiti pretrage koje se izvode u sklopu laboratorijske dijagnostike trombofilija sa svrhom utvrđivanja nasljednih i/ili stečenih čimbenika rizika u bolesnika s tromboembolijskim bolestima (Favaloro i sur., 2017; Gosselin i sur., 2018). Tako liječenje DOAC lijekovima značajno utječe na rezultate gotovo svih koagulometrijskih pretraga u sklopu probira na trombofiliju, tj. na određivanje aktivnosti proteina S, proteina C i AT, APCr, aktivnosti FVIII i dokazivanje LA antifosfolipidnih protutijela. Određivanje pojedinih navedenih specijalističkih pretraga u sklopu probira na trombofiliju u bolesnika liječenih DOAC lijekovima rezultira lažno negativnim ili lažno pozitivnim rezultatima zbog interferirajućeg utjecaja lijekova na rezultate pojedinih pretraga. Dokazivanje LA antifosfolipidnih protutijela koagulacijskim pretragama probira i potvrde izrazito je podložno interferirajućem učinku svih DOAC lijekova te se očituje lažno pozitivnim rezultatom u velikom broju liječenih bolesnika kod kojih postoji klinička indikacija za određivanjem ove pretrage (Antovic i sur., 2017; Hoxha i sur., 2017; Ratzinger i sur., 2016; Martinuzzo i sur., 2014). Stoga, određivanje gotovo svih pretraga probira na trombofiliju u sklopu koagulacijskih laboratorija, među kojima je i dijagnostički postupak za dokazivanje LA protutijela, nije moguće u bolesnika liječenih DOAC

lijekovima, te je njihovo izvođenje u pravilu potrebno odgoditi kako bi se spriječilo pogrešno tumačenje dobivenih rezultata i posljedično postavljanje pogrešne dijagnoze.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Kako je već u uvodnom dijelu ovog rada objašnjeno, određivanje specijalističkih pretraga hemostaze uključenih u laboratorijsku dijagnostiku trombofilije onemogućeno je u bolesnika liječenih DOAC lijekovima zbog njihova značajnog interferirajućeg utjecaja na rezultate pretraga u smislu lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata. Jedna od specijalističkih pretraga koja se izvodi u sklopu dijagnostičkog probira na trombofiliju u bolesnika s venskom i arterijskom tromboembolijom je i određivanje LA antifosfolipidnih protutijela, na čije rezultate antikoagulantna terapija DOAC lijekovima značajno utječe rezultirajući lažno pozitivnim rezultatom pretrage. Stoga određivanje pretrage LA nije moguće učiniti u bolesnika liječenih DOAC lijekovima.

Cilj provedenog istraživanja bio je ispitati i usporediti učinak komercijalne DOAC-stop tablete i vlastite *in house* optimirane metode s medicinskim aktivnim ugljenom na uklanjanje interferencije DOAC lijekova u određivanju pretrage LA.

Specifični ciljevi rada su:

1. Ispitivanje utjecaja dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana na rezultate probirne i potvrdne dRVVT pretrage u dijagnostici LA.
2. Ispitivanje učinkovitosti komercijalno dostupnih tableta DOAC-Stop™ (Haematex Research, Hornsby, Australija) u uklanjanju interferencije DOAC lijekova na rezultate probirne i potvrdne dRVVT pretrage u dijagnostici LA.
3. Ispitivanje učinkovitosti medicinskog aktivnog ugljena (CARBOMED granule, Jadran - Galenski Laboratorij) u uklanjanju interferencije DOAC lijekova na rezultate probirne i potvrdne dRVVT pretrage u dijagnostici LA.
4. Usporedba učinkovitosti oba postupka navedena pod točkama 2. i 3. u uklanjanju interferencije DOAC lijekova na rezultate probirne i potvrdne dRVVT pretrage u dijagnostici LA.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U ispitivanje je bilo uključeno 57 uzoraka bolesnika liječenih dabigatranom, 58 uzoraka bolesnika liječenih rivaroksabanom i 28 uzoraka bolesnika liječenih apiksabanom. Svakom bolesniku zabilježeni su klinički podatci; dob, obiteljska anamneza i terapija. Uzorci ispitanika analizirani su u Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju Kliničkog zavoda za kemiju, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice. Cjelokupna laboratorijska dijagnostika, uključujući određivanje koncentracije DOAC lijekova kao i dRVVT pretrage probira i potvrde u sklopu dijagnostičkog postupka u ispitivanju LA, učinjeno je u sklopu istraživačkog projekta HRZZ 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 Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice.

3.2. Uzorci

Za pretrage određivanja koncentracije DOAC lijekova i dRVVT probirne i potvrdne pretrage u dijagnostici LA, uzorkovane su dvije epruvete venske krvi (Vacutainer, Becton Dickinson) uz antikoagulans 3,2 %-tni (109 mM) natrijev citrat (epruvete s plavim čepom koje se koriste za sve koagulacijske pretrage). Analitički uzorak za sve navedene pretrage je plazma siromašna trombocitima (PPP, engl. *platelet poor plasma*), dobiven centrifugiranjem uzorka pune venske krvi pri 2000 g u trajanju od 10 min. Nakon centrifugiranja, u čašicu za uzorke otpipetiran je uzorak PPP-a (volumen od 1-2 mL, ovisno o raspoloživoj količini uzorka) te je čašica označena oznakom PPP i identifikacijskim brojem (ID) uzorka.

Dodatno, svi uzorci PPP-a u kojima je određena koncentracija odgovarajućeg DOAC lijeka, probirna i potvrdna dRVVT pretraga, centrifugirani su i nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete, odnosno medicinskog aktivnog ugljena. Postupak pripreme

uzorka centrifugiranjem nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete i medicinskog aktivnog ugljena je objašnjen u odjeljcima 3.4.3.1 i 3.4.3.2.

3.3. Materijali

Innovance® DTI komercijalni reagens kit
(Siemens Healthineers, Njemačka)

Dabigatran komercijalni kalibratori
(Siemens Healthineers, Njemačka)

Dabigatran komercijalni kontrolni uzorci
(Siemens Healthineers, Njemačka)

Innovance® 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)

LA1 screen komercijalni reagens, dRVVT probirni test
(Siemens Healthineers, Njemačka)

LA2 confirm komercijalni reagens, dRVVT potvrdni test
(Siemens Healthineers, Njemačka)

Komercijalna kontrolna plazma N za pretrage LA1 i LA2
(Siemens Healthineers, Njemačka)

DOAC-Stop™ komercijalni pripravak adsorbensa u obliku tablete
(Haematex Research, Hornsby, Australija)

CARBOMED granule, aktivni medicinski ugljen u prahu
(Jadran galenski laboratorij, Hrvatska)

Čašice za uzorke, Behring coagulation cup
(Siemens Healthineers, Njemačka)

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

3.4. Metode

Pretrage određivanja koncentracije DOAC lijekova određene su na automatiziranom analitičkom sustavu Behring Coagulation System XP (BCSXP, Siemens Healthineers, Njemačka). Analizator radi na načelu optičkog mjerenja koagulometrijskih, kromogenih i imunokemijskih metoda detekcije reakcije. Kao izvor svjetla analizator rabi ksenonsku lampu koja stvara monokromatsku bijelu zraku svjetlosti kojom se mjeri apsorbancija 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. Određivanje koncentracije direktnih oralnih antikoagulansa

3.4.1.1. Određivanje koncentracije dabigatrana

Koncentracija izravnog inhibitora trombina dabigatrana određena je upotrebom Innovance®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-a. Ukoliko je u ispitivanoj plazmi prisutan lijek dabigatran, dio trombinskog reagensa se inaktivira, a višak neinhibiranog trombina (ostatni ili rezidualni trombin) potom se određuje uz dodatak specifičnog kromogenog supstrata, te se nastala promjena obojenja mjeri spektrofotometrijski na 405 nm. Porast apsorbancije razmjernan je količini nastalog obojenog produkta i obrnuto razmjernan koncentraciji lijeka u uzorku PPP-a.

Priprema reagensa Innovance®DTI: Komercijalni Innovance®DTI test je višekomponentni, te se sastoji od slijedećih sastavnica: Innovance®DTI reagens, Innovance®DTI diluent i Innovance®DTI supstrat. Reagens se za analizu priprema otapanjem liofiliziranog Innovance®DTI reagensa u 5 mL Innovance®DTI diluenta. Innovance®DTI supstrat je u tekućem obliku i spreman za uporabu. Reagens i supstrat se mogu koristiti neposredno nakon pripreme, a stabilni su 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®anti-FXa komercijalnog testa uz kalibracijske plazme specifične za pojedini lijek (rivaroksaban kalibrator i apiksaban kalibrator, 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-nitroanilin (p-NA), koji se određuje spektrofotometrijski na 405 nm. Količina nastalog p-NA obrnuto je razmjerna koncentraciji lijeka u ispitivanom uzorku.

Priprema reagensa Innovance®anti-FXa: Innovance®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 lupus antikoagulansa

Za određivanje pretrage LA u ispitivanje su uključene dvije ključne pretrage koje su sastavni dio dijagnostičkog postupka u dokazivanju LA protutijela : dRVVT probirni i dRVVT potvrdni test. Obje pretrage provedene su koagulometrijskom metodom s komercijalnim reagensima LA1 screen ili dRVVT probirni test (Siemens Healthineers, Njemačka) i LA2 confirm ili dRVVT potvrdni test (Siemens Healthineers, Njemačka). Načelo obje pretrage, dRVVT probirnog i potvrdnog testa, temelji se na primjeni reagensa koji sadrži određenu količinu zmijskog venoma Russellove ljutice (RVV, engl. Russell viper venom), uz jedinu razliku da dRVVT probirni test sadrži vrlo malu količinu fosfolipida, a dRVVT potvrdni test sadrži fosfolipide u suvišku. Dodatak RVV reagensa ispitivanoj plazmi dovodi do aktivacije zgrušavanja in vitro brzom i izravnom aktivacijom FX. Ukoliko u ispitanoj plazmi nisu prisutna LA protutijela, vremena zgrušavanja izmjerena dRVVT probirnim i potvrdnim pretragama su unutar referentnog intervala za odgovarajući komercijalni reagens u uporabi (LA1 do 31 - 41 sekundi i LA2 26 - 31 sekundi). Ako su u uzorku prisutna LA protutijela, vrijeme zgrušavanja izmjereno probirnim dRVVT testom je produženo i to razmjerno količini prisutnih protutijela. U prisutnosti LA protutijela, suvišak fosfolipida u potvrdnom dRVVT reagensu neutralizira učinak LA protutijela, što dovodi do korekcije vremena zgrušavanja.

Rezultat određivanja dRVVT probirne i potvrdne pretrage se izražava kao omjer vremena zgrušavanja dRVVT probirne pretrage (LA1) i dRVVT potvrdne pretrage (LA2):

$$LA \text{ omjer} = \frac{\text{Vrijeme zgrušavanja LA1 probirnog testa}}{\text{Vrijeme zgrušavanja LA2 potvrdnog testa}}$$

Pozitivan rezultat pretrage označava LA omjer veći od odgovarajuće granične vrijednosti. Za kombinaciju reagensa i analitičkog sustava korištenih u ovom ispitivanju, pozitivan rezultat pretrage LA predstavlja omjer > 1,37.

Priprema LA1 probirnog dRVVT i LA2 potvrdnog dRVVT reagensa: Oba reagensa su u liofiliziranom obliku te se priređuju otapanjem u 1 mL destilirane vode nakon čega se mogu odmah upotrijebiti. Stabilnost reagensa nakon rekonstitucije je 48 sati na temperaturi hladnjaka (2-8°C).

Određivanje dRVVT probirne i potvrdne pretrage je u svim analiziranim uzorcima učinjeno u nativnim uzorcima PPP ispitanika te nakon što su plazmama ispitanika dodane DOAC-Stop™ tableta i medicinski aktivni ugljen čije je ispitivanje djelotvornosti u uklanjanju interferencije bio predmet i cilj provedenog ispitivanja. Načela dRVVT probirne i potvrdne pretrage u dijagnostičkom postupku za lupus antikoagulans shematski su prikazana u odjeljku Uvod na Slici 1.

3.4.3. Postupak određivanja pretrage lupus antikoagulans nakon dodatka komercijalne DOAC-Stop™ tablete i medicinskog aktivnog ugljena

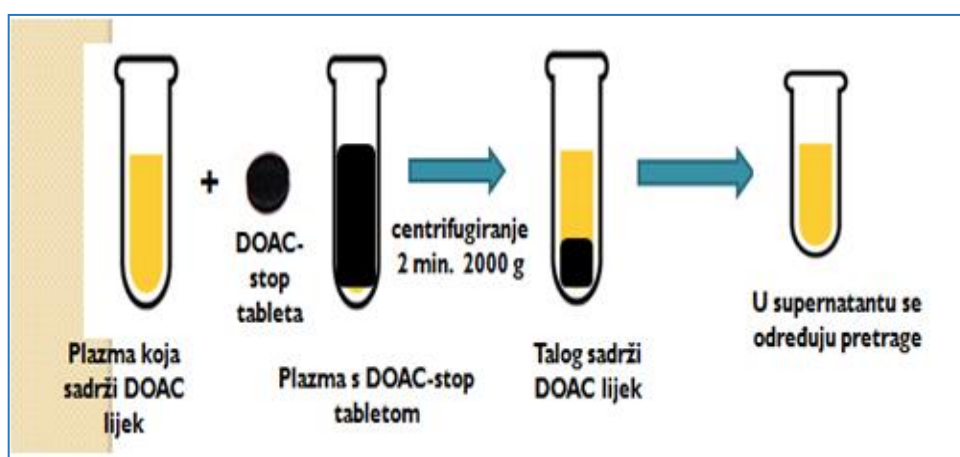
Postupak određivanja LA primjenom dRVVT probirne i potvrdne pretrage u analiziranim uzorcima s lažno pozitivnim rezultatom LA ponovljen je nakon dodatka komercijalnog pripravka, adsorbensa u obliku tablete (DOAC-Stop™, Haematex Research, Hornsby, Australija), prema uputi proizvođača. DOAC-Stop™ tableta djeluje kao adsorbens za DOAC lijekove prisutne u plazmi. Nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete, uzorak PPP-a (u kojemu je prvotno određena koncentracija odgovarajućeg DOAC lijeka te je učinjena dijagnostika LA) centrifugira se te se u supernatantu ponovno određuje LA primjenom istovjetnih dRVVT probirnih i potvrdnih pretraga. Dodatno, isti je postupak u određivanju pretrage LA u svim uzorcima učinjen i nakon dodatka medicinskog aktivnog ugljena (CARBOMED granule, Jadran Galenski Laboratorij, Hrvatska).

Komercijalni pripravak - adsorbens tablete DOAC-Stop™ i medicinski aktivni ugljen u prahu dodani su u određenoj količini u sve uzorke koji su inicijalnim određivanjem pokazali pozitivan rezultat LA (LA omjer > 1,37).

Dodatno, nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete i aktivnog ugljena u sve uzorke, u nasumično odabranim uzorcima (n=30) izmjerene su i koncentracije DOAC lijekova dabigatrana (n=5), rivaroksabana (n=5) i apiksabana (n=5) kako bi se potvrdila učinkovitost adsorbensa u uklanjanju pojedinih DOAC lijekova iz plazme. U svim tako učinjenim mjerenjima, koncentracije lijekova bile su ispod granice detekcije kvantitativne metode određivanja korištenom u ispitivanju.

3.4.3.1. Postupak s uzorkom kojemu je dodana DOAC-Stop™ tableta

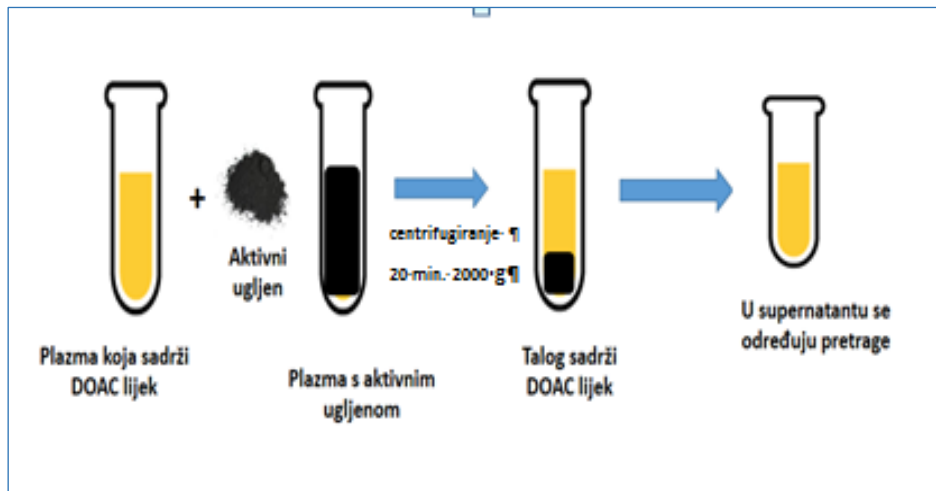
Jedna DOAC-Stop™ tableta dodana je u 1 mL PPP-a u uzorcima s pozitivnim rezultatom pretrage LA, nakon čega je uzorak lagano miješan 5 minuta te potom centrifugiran pri 2000 g tijekom 5 minuta kako bi se adsorbens i DOAC lijek istaložili iz plazme zahvaljujući adsorptivnom svojstvu DOAC-Stop™ tablete. Supernatant iznad nastalog taloga je alikvotiran u zasebni spremnik (čšašicu za uzorke) te je u tako dobivenom uzorku ponovljeno određivanje pretrage LA na istovjetan način kao i u uzorku native plazme ispitanika (Slika 3).



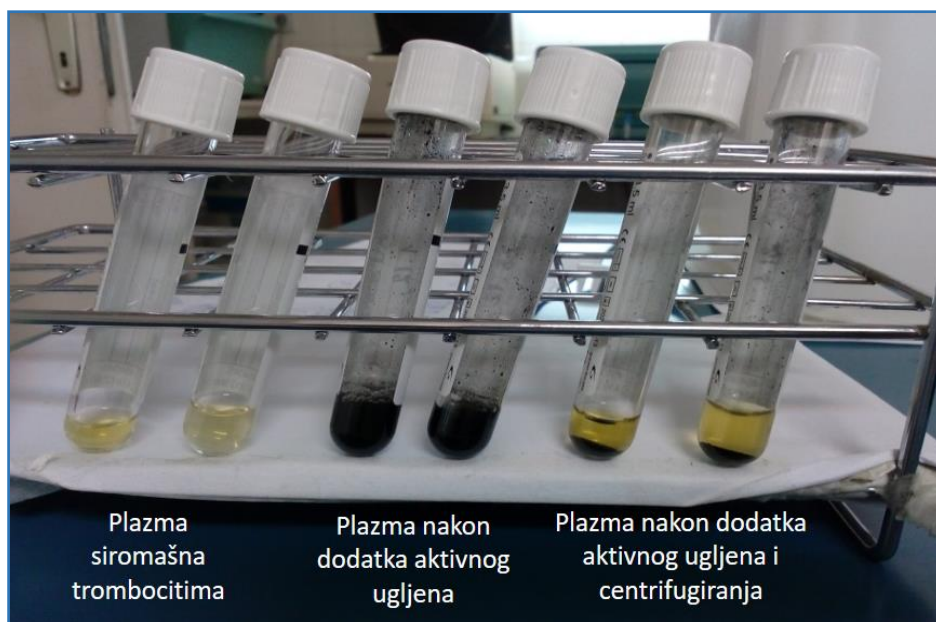
Slika 3. Shematski prikaz uklanjanja DOAC lijekova iz plazme uz uporabu DOAC Stop™ tablete čime se omogućuje određivanje pretraga u dobivenom supernatantu.

3.4.3.2. Postupak s uzorkom kojemu je dodan medicinski aktivni ugljen

Medicinski aktivni ugljen je dodan u uzorke s pozitivnim rezultatom pretrage LA nakon čega je uzorak lagano miješan 5 minuta te potom centrifugiran pri 2000 g tijekom 20 minuta kako bi se adsorbens i DOAC lijek istaložili iz plazme zahvaljujući adsorptivnom svojstvu aktivnog ugljena. Supernatant iznad nastalog taloga je alikvotiran u zasebni spremnik (čšašicu za uzorke), te je u tako dobivenom uzorku ponovljeno određivanje pretrage LA na istovjetan način kao i u uzorku native plazme ispitanika (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz uklanjanja DOAC lijekova iz plazme uz uporabu medicinskog aktivnog ugljena čime je omogućeno određivanje pretraga u dobivenom supernatantu.



Slika 5. Uzorci plazme siromašne trombocitima, plazme nakon dodatka medicinskog aktivnog ugljena prije centrifugiranja te uzorci plazme nakon dodatka aktivnog ugljena i provedenog centrifugiranja.

Sam postupak uklanjanja interferencije s medicinski aktivnim ugljenom obuhvaćao je optimiranje vlastite, jednostavne *in house* metode s obzirom na količinu medicinski aktivnog ugljena, volumena uzorka plazme i vremena centrifugiranja kako

bi se postigao očekivani učinak uklanjanja interferencije DOAC lijekova u određivanju pretrage LA.

U svrhu optimiranja, u alikvote uzoraka PPP-a volumena 0,5 i 1 mL, dodano je 100 µg aktivnog ugljena nakon čega su uzorci lagano ručno promiješani tijekom 5 minuta te potom centrifugirani tijekom 5 minuta, 10 minuta i 20 minuta pri 2000 g kako bi se aktivni ugljen i lijek istaložili iz plazme. Pokazalo se da centrifugiranje uzorka kojemu je dodan aktivni ugljen u trajanju od 5 minuta nije dostatno za učinkovito taloženje DOAC lijeka, centrifugiranje tijekom 10 minuta je rezultiralo adekvatnim taloženjem aktivnog ugljena, ali uz ostatke granula aktivnog ugljena na stijenkama spremnika, dok je centrifugiranje uzorka tijekom 20 minuta u uzorku plazme volumena i 0,5 mL i 1 mL dovelo do potpunog taloženja aktivnog ugljena na dno spremnika uz bistar izgled plazme bez ostataka granula aktivnog ugljena na stijenkama spremnika i u uzorku plazme (Slika 5). Tako dobiven supernatant iznad nastalog taloga je otpipetiran u zasebni spremnik u kojemu su u daljnjem postupku provedene probirna i potvrдна pretraga dRVVT u dijagnostici LA protutijela, analogno postupku nakon dodatka komercijalne DOAC-Stop™ tablete.

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).

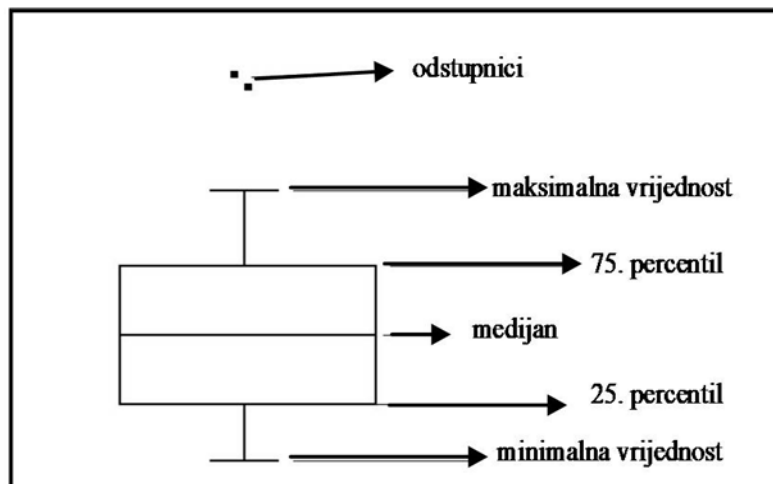
Svi su rezultati ispitani korištenjem deskriptivne (opisne) analize koja je pokazala osnovne značajke varijabli: srednju vrijednost, standardnu devijaciju (SD), medijan uz 95% -tni interval pouzdanosti (95% CI) i interkvartilni raspon između prvog i trećeg kvartila (IQR, Q1-Q3). Budući da je broj ispitanika u pojedinim skupinama bio manji od 30, rezultati deskriptivne analize su za sve skupine podataka prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom, a sve razlike testirane su neparametrijskim testovima.

Statistička značajnost razlike između skupina brojčanih podataka testirana je neparametrijskim Mann-Whitneyevim testom (za nezavisne uzorke između dvije skupine podataka) i Wilcoxonovim testom (za zavisne uzorke između dvije skupine

podataka) koji uspoređuju medijane tj. rangove analiziranih skupina podataka. Vrijednost $P < 0,050$ smatrana je statistički značajnom.

Statističku značajnost razlike između izračunatih udjela negativnih i pozitivnih rezultata pretrage LA za pojedine DOAC-lijekove ispitali smo χ^2 testom (Chi-squared test) za usporedbu proporcija.

Podatci koji opisuju izmjerene vrijednosti grafički su prikazane grafikonom okvira s ručicama (engl. *Box and Whisker*), kako je prikazano na Slici 6. Učrtani 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 6. Prikaz grafikona okvira s ručicama (engl. Box and Whisker)

4. REZULTATI

4.1. Rezultati određivanja koncentracije DOAC lijekova i probirne i potvrdne dRVVTpretrage u dijagnostici LA u bolesnika liječenih DOAC lijekovima

U ispitivanje je bilo uključeno 57 uzoraka bolesnika liječenih dabigatranom, 58 uzoraka bolesnika liječenih rivaroksabanom i 28 uzoraka bolesnika liječenih apiksabanom. U svim uzorcima je u svrhu istraživanja određena koncentracija odgovarajućeg DOAC lijeka, te probirna (dRVVTs, LA1) i potvrdna (dRVVTc, LA2) pretraga uz izračun LA omjera (LA1/LA2) u sklopu dijagnostičkog postupka za LA.

U prvom dijelu eksperimentalnog istraživačkog postupka, dobiveni rezultati statistički su obrađeni s obzirom na udio negativnih i lažno pozitivnih (LP) rezultata pretrage LA za svaki pojedini analizirani uzorak (Tablica 1).

Tablica 1. Udio negativnih i lažno pozitivnih (LP) rezultata pretrage LA i statistička značajnost razlike udjela LP rezultata između bolesnika liječenih dabigatranom, rivaroksabanom i apiksabanom.

| DOAC lijek | Ukupni broj analiziranih uzoraka | Broj LP rezultata LA | Udio LP rezultata LA | Statistička značajnost razlike (P) između DOAC lijekova |
|--------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|---|
| Dabigatran | 57 | 33 | 0,56 | Dabigatran – rivaroksaban P = 0,307 |
| Rivaroksaban | 58 | 39 | 0,67 | Dabigatran – apiksaban P = 0,214 |
| Apiksaban | 28 | 11 | 0,39 | Rivaroksaban – apiksaban P = 0,026 |

Udio lažno pozitivnih (LP) rezultata pretrage LA bio je najveći u podskupini bolesnika liječenih rivaroksabanom (0,67) te značajno veći u odnosu na udio LP rezultata u bolesnika liječenih apiksabanom (P = 0,026). Udio LP rezultata pretrage LA nije se značajno razlikovao između bolesnika liječenih dabigatranom i rivaroksabanom (P = 0,307), kao niti između bolesnika liječenih dabigatranom i apiksabanom (P = 0,026).

Tablica 2. Vrijednosti koncentracija dabigatrana, probirne dRVVT, potvrдне dRVVT pretrage i izračunatog LA omjera te statistička značajnost razlike izmjerenih vrijednosti ispitanih parametara u bolesnika s negativnim i lažno pozitivnim rezultatom pretrage LA.

| Koncentracija dabigatrana (ng/mL) medijan (95%CI) IQR | | dRVVT probirni test (LA1) (s) medijan (95%CI) IQR | | dRVVT potvrдни test (LA2) (s) medijan (95%CI) IQR | | LA omjer (LA1/LA2) medijan (95%CI) IQR | | Udio lažno pozitivnih rezultata LA |
|--|--------------------------------------|--|-----------------------------------|--|-----------------------------------|---|---|--|
| LP LA | Neg. LA | LP LA | Neg. LA | LP LA | Neg. LA | LP LA | Neg. LA | |
| 33 | 24 | | | | | | | 33/57 0,56 |
| 166 (100 - 279) 101 - 276 | 101 (33 - 167) 29 - 187 | 110 (84 - 134) 84 - 135 | 68 (58 - 85) 55 - 90 | 70 (42 - 95) 41 - 95 | 55 (48 - 69) 44 - 72 | 1,52 (1,4 - 1,6) 1,4 - 1,6 | 1,20 (1,2 - 1,3) 1,2 - 1,3 | |
| P = 0,066 | | P = 0,004 | | P = 0,242 | | P < 0,001 | | |

IQR = interkvartilni raspon; 95%CI = 95%-tni interval pouzdanosti za medijan; LA = lupus antikoagulans; LP LA = lažno pozitivan rezultat LA, Neg LA = negativan rezultat LA

Tablica 3. Vrijednosti koncentracija rivaroksabana, probirne dRVVT i potvrдне dRVVT pretrage i izračunatog LA omjera te statistička značajnost razlike izmjerenih vrijednosti ispitanih parametara u bolesnika s negativnim i lažno pozitivnim rezultatom pretrage LA.

| Koncentracija rivaroksabana (ng/mL) medijan (95%CI) IQR | | dRVVT probirni test (LA1) (s) medijan (95%CI) IQR | | dRVVT potvrđni test (LA2) (s) medijan (95%CI) IQR | | LA omjer (LA1/LA2) medijan (95%CI) IQR | | Udio lažno pozitivnih rezultata LA |
|---|-----------------------------------|---|---------------------------------|---|---------------------------------|--|---|------------------------------------|
| LP LA | Neg. LA | LP LA | Neg. LA | LP LA | Neg. LA | LP LA | Neg. LA | |
| 39 | 19 | | | | | | | 39/58 0,67 |
| 191 (163 - 255) 122 – 289 | 49 (6 – 104) 6 – 112 | 110 (82 - 119) 67 – 123 | 41 (38-46) 38 - 47 | 61 (56 – 66) 54 – 72 | 37 (35-39) 35 - 39 | 1,94 (1,7 – 2,0) 1,7 – 2,0 | 1,15 (1,1 – 1,2) 1,1 – 1,2 | |
| P < 0,001 | | P < 0,001 | | P < 0,001 | | P < 0,001 | | |

IQR = interkvartilni raspon; 95%CI = 95%-tni interval pouzdanosti za medijan; LA = lupus antikoagulans; LP LA = lažno pozitivan rezultat LA, Neg LA = negativan rezultat LA

Tablica 4. Vrijednosti koncentracija apiksabana, probirne dRVVT i potvrđne dRVVT pretrage i izračunatog LA omjera te statistička značajnost razlike izmjerenih vrijednosti ispitanih parametara u bolesnika s negativnim i lažno pozitivnim rezultatom pretrage LA.

| Koncentracija apiksabana (ng/mL) medijan (95%CI) IQR | | dRVVT probirni test (LA1) (s) medijan (95%CI) IQR | | dRVVTpotvrđni test (LA2) (s) medijan (95%CI) IQR | | LA omjer (LA1/LA2) medijan (95%CI) IQR | | Udio lažno pozitivnih rezultata LA |
|---|-------------------------------------|--|-----------------------------------|---|-----------------------------------|--|---|--|
| LP LA | Neg. LA | LP LA | Neg. LA | LP LA | Neg. LA | LP LA | Neg. LA | |
| 11 | 17 | | | | | | | 11/17 0,39 |
| 177 (122 – 314) 164 – 348 | 93 (63 – 207) 62 – 216 | 76 (58 – 109) 63 -88 | 66 (52 – 70) 53 – 70 | 46 (35 – 66) 38 – 56 | 57 (49 – 69) 49 - 68 | 1,60 (1,6 – 2,0) 1,6 – 1,8 | 1,10 (0,9 – 1,2) 0,9 – 1,2 | |
| P = 0,086 | | P = 0, 101 | | P = 0,152 | | P < 0,001 | | |

IQR = interkvartilni raspon; 95%CI = 95%-tni interval pouzdanosti za medijan; LA = lupus antikoagulans; LP LA = lažno pozitivan rezultat LA, Neg LA = negativan rezultat LA

Rezultati prikazani u Tablici 2 navode vrijednosti koncentracija dabigatrana, probirne dRVVT pretrage, potvrdne dRVVT pretrage i izračunatog LA omjera te statističku značajnost razlike izmjerenih vrijednosti ispitanih parametara u bolesnika s negativnim i lažno pozitivnim rezultatom pretrage LA. Iako su koncentracije dabigatrana u uzorcima bolesnika liječenih dabigatranom i s lažno pozitivnim rezultatom pretrage LA bile veće u odnosu na vrijednosti izmjerene u uzorcima bolesnika s negativnim rezultatom pretrage LA, razlika u koncentracijama dabigatrana nije bila statistički značajna između navedene dvije podskupine ($P = 0,066$). Rezultati ispitivanja pokazali su da je utjecaj dabigatrana na rezultat pretrage LA najveći na dRVVT probirnu pretragu, uz značajno produžene vrijednosti u bolesnika s lažno pozitivnim rezultatom LA u odnosu na bolesnike s negativnim rezultatom LA ($P = 0,004$). Suprotno tome, iako je u uzorcima bolesnika liječenih dabigatranom uočen značajan utjecaj lijeka i na rezultat potvrdne dRVVT pretrage, vrijednosti nisu pokazale statistički značajnu razliku između bolesnika s negativnim i lažno pozitivnim rezultatom LA ($P = 0,242$).

Sukladno dobivenim rezultatima probirne i potvrdne dRVVT pretrage, dobiveni rezultati pokazuju da lijek dabigatran značajno utječe na rezultat LA omjera uz statistički značajnu razliku vrijednosti LA omjera u bolesnika s negativnim i LP rezultatom pretrage LA ($P < 0,001$), uz medijan vrijednosti LA omjera 1,60 u uzorcima bolesnika s LP rezultatom i 1,20 u uzorcima bolesnika s negativnim rezultatom LA.

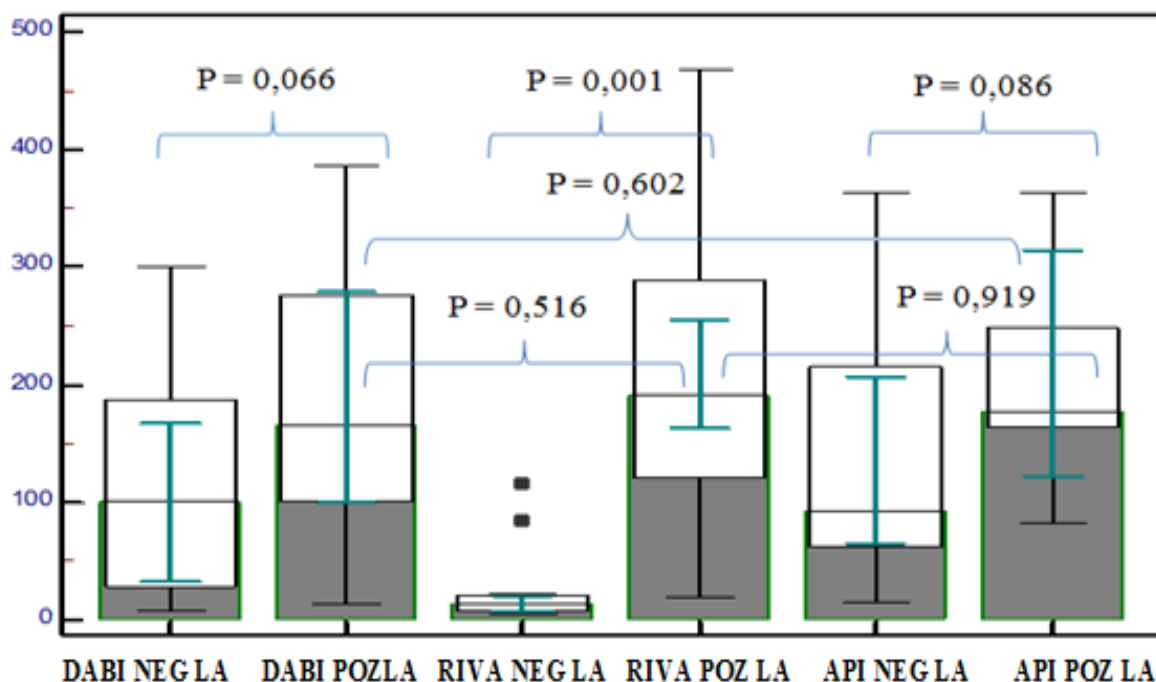
U Tablici broj 3 prikazane su koncentracije rivaroksabana koje su pokazale statistički značajnu razliku vrijednosti u uzorcima bolesnika s negativnim i LP rezultatom pretrage LA, uz značajno niže vrijednosti u bolesnika kod kojih lijek nije rezultirao LP rezultatom ($P < 0,001$). Nadalje, vrijednosti i probirne i potvrdne dRVVT pretrage značajno su se razlikovale u bolesnika s negativnim i LP rezultatom pretrage LA ($P < 0,001$), kao i izračunate vrijednosti LA omjera ($P < 0,001$) uz medijane izmjerenih vrijednosti 1,94 i 1,15 u navedene dvije podskupine.

Ispitivanje odnosa koncentracija apikasabana i vrijednosti probirne i potvrdne dRVVT pretrage i LA omjera, pokazalo je da se koncentracije apiksabana ne razlikuju značajno između bolesnika s negativnim i LP rezultatom pretrage LA ($P = 0,086$), iako su u bolesnika s negativnim rezultatom LA izmjerene koncentracije bile niže. Utjecaj lijeka apiksabana na rezultate probirne i potvrdne dRVVT pretrage bio je mjerljiv, iako niti za jednu pretragu nije pokazana statistički značajna razlika u

vrijednostima između bolesnika s negativnim i LP rezultatom LA ($P = 0,101$ i $P = 0,101$). Međutim, s obzirom da se utjecaj apikasabana očituje nižim izmjerenim vrijednostima potvrđne dRVVT pretrage, učinak na izračunati LA omjer bio je istovjetan kao i za ostala dva lijeka, uz značajno povećane vrijednosti LA omjera u bolesnika s LP rezultatom pretrage LA ($P < 0,001$) i izračunatim medijanima 1,60 i 1,10 između dvije podskupine uzoraka (Tablica 4). U Tablici broj 5 je prikazana statistička značajnost razlike (P) koncentracija pojedinih DOAC lijekova između bolesnika s negativnim i LP rezultatom pretrage LA.

Tablica 5. Statistička značajnost razlike koncentracija dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana u bolesnika s negativnim i lažno pozitivnim rezultatom pretrage LA.

| DOAC lijek | Rezultat pretrage LA | Koncentracija lijeka (ng/mL) medijan (95%CI) IQR | Statistička značajnost razlike (P) |
|--------------|----------------------|--|---|
| Dabigatran | negativan | 101 (32,7 – 167) 29 – 187 | Dabigatran – rivaroksaban P = 0,002 Dabigatran – apiksaban P = 0,659 Rivaroksaban – apiksaban P = 0,004 |
| Rivaroksaban | | 48,9 (6 – 104) 6 – 112 | |
| Apiksaban | | 93 (63 – 207) 62 – 216 | |
| Dabigatran | lažno pozitivan | 166 (100 - 279) 101 – 276 | Dabigatran – rivaroksaban P = 0,516 Dabigatran – apiksaban P = 0,602 Rivaroksaban – apiksaban P = 0,919 |
| Rivaroksaban | | 191 (163 – 255) 122 – 289 | |
| Apiksaban | | 177 (122 – 314) 164 – 348 | |



Slika 7. Grafički prikaz koncentracija dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana te statističke značajnosti razlika izmjerenih vrijednosti DOAC lijekova između bolesnika s negativnim i LP rezultatom pretrage LA.

U bolesnika s negativnim rezultatom pretrage LA, koncentracije rivaroksabana bile su značajno niže u odnosu na koncentracije druga dva DOAC lijeka, dabigatrana i apiksabana ($P = 0,002$ i $P = 0,004$). Koncentracije dabigatrana i apiksabana nisu se značajno razlikovale u bolesnika s negativnim rezultatom pretrage LA ($P = 0,659$). Nadalje, koncentracije sva tri DOAC lijeka nisu pokazale statistički značajnu razliku izmjerenih vrijednosti u bolesnika s LP rezultatom pretrage LA (Tablica 5 i Slika 7).

4.2. Rezultati određivanja probirne (dRVVTs) i potvrdne (dRVVTc) pretrage u dijagnostici LA u bolesnika liječenih DOAC lijekovima s lažno pozitivnim rezultatom pretrage LA nakon dodatka komercijalne DOAC-Stop™ tablete i medicinskog aktivnog ugljena

Drugi dio eksperimentalnog postupka uključio je bolesnike liječene sa sva tri DOAC lijeka u kojih je dobiven LP rezultat pretrage LA: 33 uzoraka bolesnika liječenih dabigatranom, 39 uzoraka bolesnika liječenih rivaroksabanom i 11 uzoraka

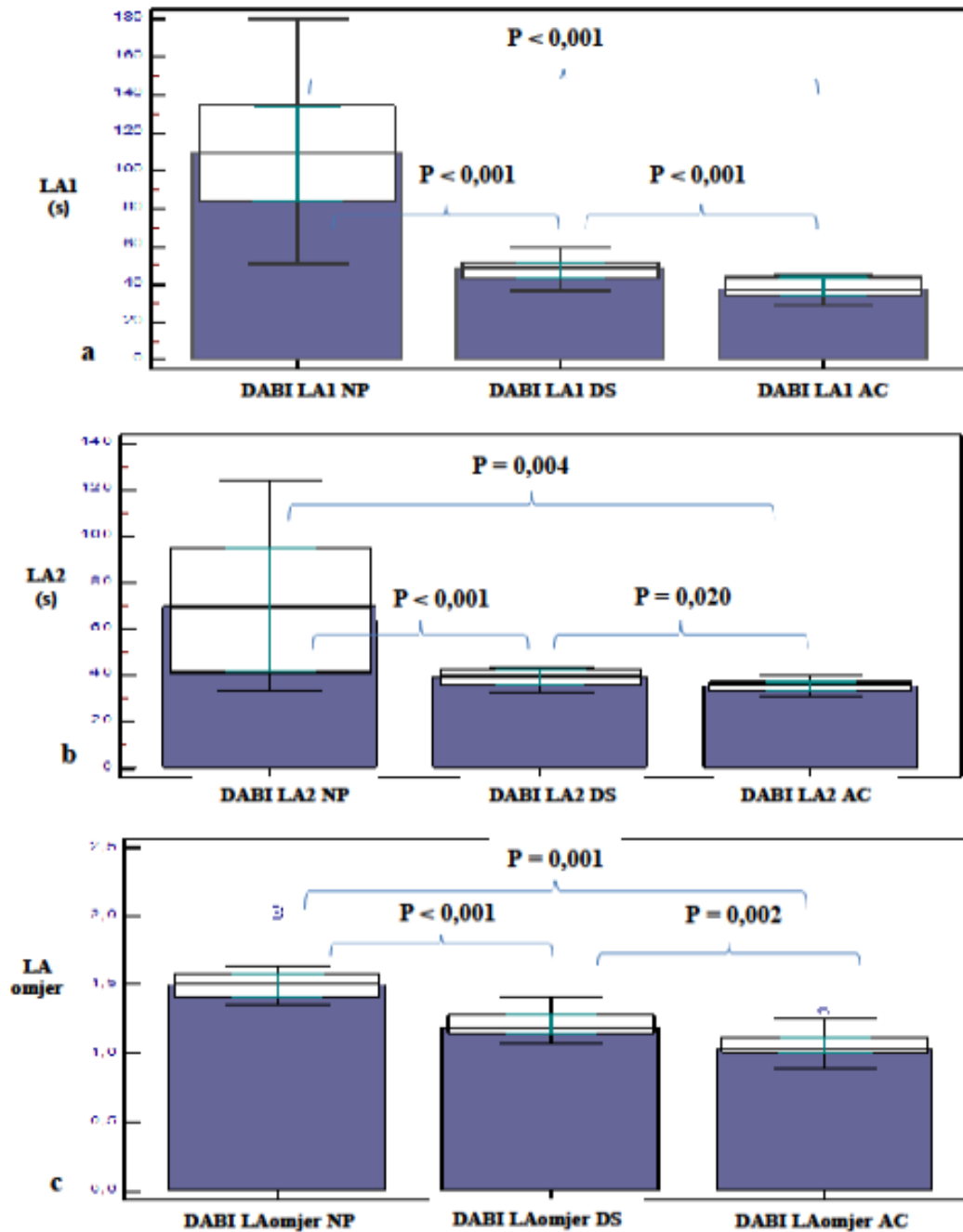
bolesnika liječenih apiksabanom. Svim uzorcima s lažno pozitivnim rezultatom pretrage LA, uzorku plazme siromašne trombocitima iz kojeg je u prethodnom eksperimentalnom postupku određena koncentracija odgovarajućeg DOAC lijeka te probirna i potvrdna dRVVT pretraga uz izračun LA omjera, dodana je komercijalna DOAC-Stop™ tableta u jedan alikvot uzorka te medicinski aktivni ugljen u drugi alikvot istovjetnog uzorka plazme. U tako priređenim uzorcima su nakon centrifugiranja ponovljene pretrage probira i potvrde za LA (dRVVTs i dRVVTc) uz izračun LA omjera, u svrhu ispitivanja učinka DOAC-Stop™ tablete i *in house* optimirane metode s medicinskih aktivnim ugljenom na uklanjanje interferencije u određivanju navedenih pretraga u sklopu dijagnostičkog postupka za LA.

Rezultati ispitivanja koje je imalo za cilj utvrditi da li komercijalna DOAC-Stop™ tableta i medicinski aktivni ugljen pokazuju djelotvornost uklanjanja interferencije u određivanju pretrage LA, pokazali su da oba korištena adsorbensa, i DOAC-Stop™ tableta i aktivni ugljen učinkovito uklanjaju interferenciju u određivanju LA. Primjenom oba korištena adsorbensa, rezultati i probirne i potvrdne dRVVT pretrage korigirani su unutar referentnog intervala, kao i izračunati LA omjer, što je dokazano i statistički značajnom razlikom u vrijednostima dRVVT probirne i dRVVT potvrdne pretrage te izračunatog LA omjera prije i nakon dodatka korištenih adsorbensa u uzorke plazme bolesnika s LP rezultatom pretrage LA u bolesnika liječenih dabigatranom (Tablica 6 i Slika 8).

Tablica 6. Rezultati probirne i potvrdne dRVVT pretrage i LA omjera (LA1/LA2) u ispitanika liječenih dabigatranom s lažno pozitivnim rezultatom pretrage LA: u nativnoj plazmi ispitanika (NP), u plazmi ispitanika nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete (NP + DS) i u plazmi ispitanika nakon dodatka aktivnog ugljena (NP + AC).

| Koncentracija dabigatrana (ng/mL) medijan (95% CI) IQR N = 33 | dRVVTprobirni test (LA1) | | | dRVVTpotvrđni test (LA2) | | | LA omjer (LA1/LA2) | | |
|--|--------------------------|--------------------|-----------------|--------------------------|-------------------|-----------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| | medijan (95% CI) | | | medijan (95% CI) | | | medijan (95% CI) | | |
| | IQR | | | IQR | | | IQR | | |
| | NP (s) | NP + DS (s) | NP + AC (s) | NP (s) | NP + DS (s) | NP + AC (s) | NP (s) | NP + DS (s) | NP + AC (s) |
| | 110 (84 – 134) | 49 (43 – 51) | 37 (34 – 44) | 70 (42 – 95) | 40 (36 – 42) | 36 (33 – 37) | 1,5 (1,4 - 1,6) | 1,2 (1,1 – 1,3) | 1,0 (1,0 – 1,1) |
| 166 (100 - 279) | P < 0,001 | | | P < 0,001 | | | P < 0,001 | | |
| 101 - 276 | | P<0,001* | | | P = 0,004* | | | P = 0,001* | |
| | | P = 0,001 | | | P = 0,020 | | | P = 0,002 | |

*P vrijednost između skupina NP i NP + AC; IQR = interkvartilni raspon; 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za medijan; LA = lupus antikoagulans; AC = aktivni ugljen; DS = DOAC-Stop™ tableta

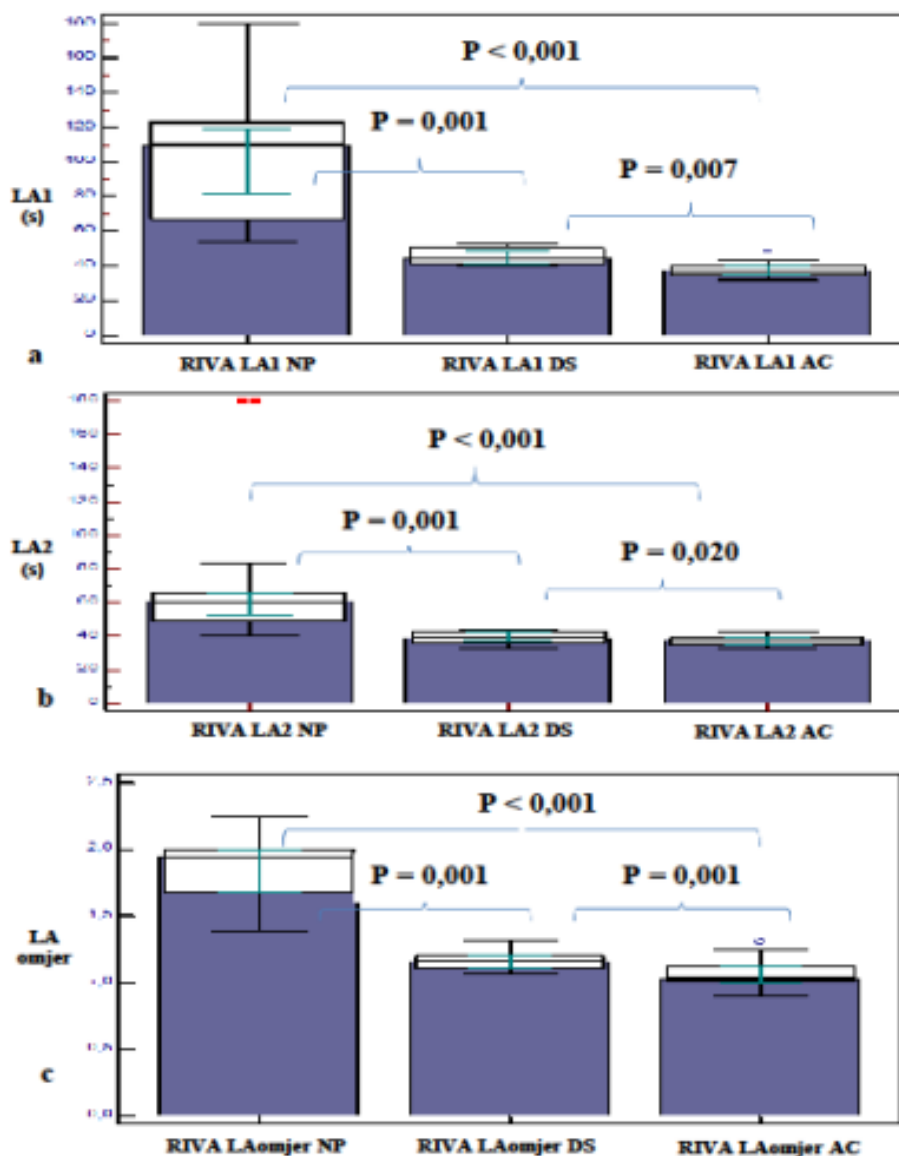


Slika 8. Grafički prikaz vrijednosti a) dRVVT probirne pretrage (LA1); b) dRVVT potvrđne pretrage (LA2) i c) LA omjera u nativnoj plazmi (NP), plazmi nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete (DS) i plazmi nakon dodatka aktivnog ugljena (AC) u uzorcima bolesnika s LP rezultatom pretrage LA liječenih dabigatranom.

Tablica 7. Rezultati probirne i potvrdne dRVVT pretrage (LA1 i LA2) i LA omjera (LA1/LA2) u ispitanika liječenih rivaroksabanom s LP rezultatom pretrage LA: u nativnoj plazmi ispitanika (NP), plazmi ispitanika nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete (NP + DS) i plazmi ispitanika nakon dodatka aktivnog ugljena (NP + AC).

| Koncentracija rivaroksabana (ng/mL) medijan (95%CI) IQR N = 39 | dRVVT probirni test (LA1) medijan (95%CI) IQR | | | dRVVT potvrdni test (LA2) medijan (95%CI) IQR | | | LA omjer (LA1/LA2) medijan (95%CI) IQR | | |
|---|---|----------------------------------|-----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|--|--|--|
| | NP (s) | NP + DS (s) | NP + AC (s) | NP (s) | NP + DS (s) | NP + AC (s) | NP (s) | NP + DS (s) | NP + AC (s) |
| | 110 (82 – 119) 67 – 123 | 45 (41– 48) 41 – 51 | 37 (35 – 40) 35 – 40 | 61 (56 – 66) 54 – 72 | 39 (37 - 42) 36 – 43 | 37 (35 – 39) 35 – 39 | 1,9 (1,7 - 2,0) 1,7 - 2,0 | 1,2 (1,1 – 1,2) 1,1 – 1,2 | 1,0 (1,0 – 1,1) 1,0 – 1,1 |
| 191 (163 - 255) 122 – 289 | P < 0,001 | | | P = 0,001 | | | P = 0,001 | | |
| | | P < 0,001* | | | P <0,001* | | | P < 0,001* | |
| | | P = 0,007 | | | P = 0,020 | | | P = 0,001 | |

P vrijednost između skupina NP i NP+AC; IQR = interkvartilni raspon; 95%CI = 95%-tni interval pouzdanosti za medijan; LA = lupus antikoagulans; AC = aktivni ugljen; DOAC-Stop™ tableta



Slika 9. Grafički prikaz vrijednosti a) dRVVT probirne pretrage (LA1); b) dRVVT potvrđne pretrage (LA2) i c) LA omjera u nativnoj plazmi (NP), plazmi nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete (DS) i plazmi nakon dodatka aktivnog ugljena (AC) u uzorcima bolesnika s LP rezultatom pretrage LA i liječenih rivaroksabanom.

U bolesnika liječenih rivaroksabanom kod kojih je dijagnostičkim postupkom izmjeren lažno pozitivan rezultat pretrage LA, primjena oba korištena adsorbensa rezultirala je potpunom korekcijom i probirne i potvrđne dRVVT pretrage kao i izračunatog LA omjera unutar referentnog intervala. Vrijednosti i probirne i potvrđne dRVVT pretrage i posljedično izračun LA omjera u dijagnostici LA, pokazali su statistički značajnu razliku izmjerenih rezultata u nativnim uzorcima plazme (NP) bolesnika i uzorcima plazme kojima su dodani ispitivani adsorbensi DOAC-Stop™

(DS) i aktivni ugljen (AC), kako je vidljivo iz Tablice 7. i Slike 9. Na temelju ovih rezultata pokazano je da primjena oba korištena adsorbensa učinkovito uklanja interferenciju u određivanju LA i u uzorcima plazme bolesnika liječenih rivaroksabanom.

Primjena ispitivanih adsorbensa, DOAC-Stop™ tablete i medicinskog aktivnog ugljena na uklanjanje interferencije u određivanju pretrage LA pokazala je statistički značajnu razliku vrijednosti i probirne i potvrdne dRVVT pretrage te izračuna LA omjera u uzorcima bolesnika liječenih apiksabanom kod kojih je u nativnoj plazmi (NP) bolesnika dobiven LP rezultat pretrage LA. Vrijednosti obe dRVVT pretrage, kao i LA omjera korigiraju se unutar referentnog intervala s oba adsorbensa, što dokazuje da se ovim postupkom učinkovito uklanja interferencija u određivanju LA i u uzorcima plazme bolesnika liječenih apiksabanom (Tablica 8, Slika 10).

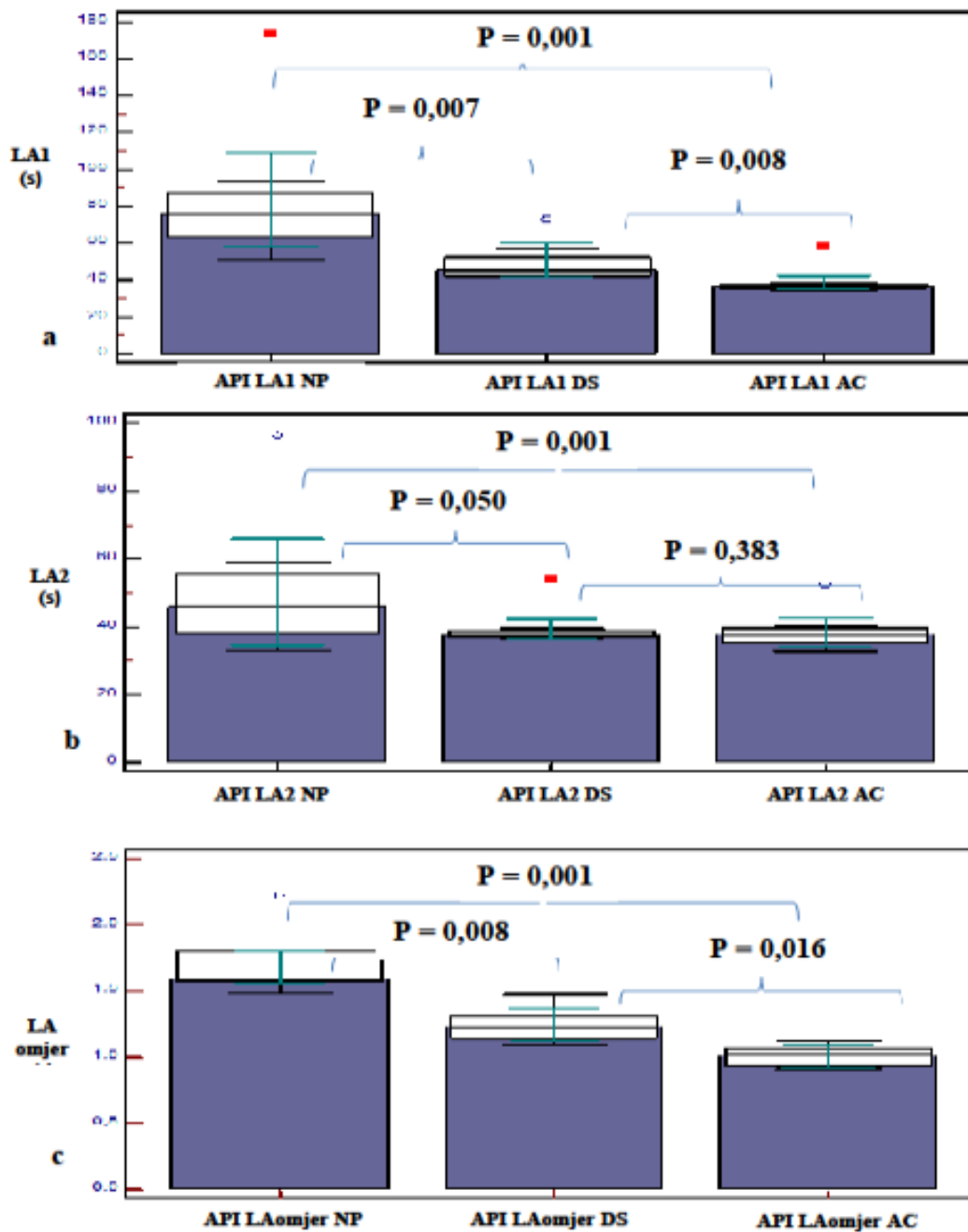
Tablica 8. Rezultati probirne i potvrdne dRVVT pretrage (LA1 i LA2) i LA omjera (LA1/LA2) u ispitanika liječenih apiksabanom s LP rezultatom pretrage LA: u nativnoj plazmi ispitanika (NP), plazmi ispitanika nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete (NP + DS) i plazmi ispitanika nakon dodatka aktivnog ugljena (NP + AC).

| Koncentracija apiksabana (ng/mL) medijan (95% CI) IQR N = 11 | dRVVT probirni test (LA1) medijan (95% CI) IQR | | | dRVVT potvrdni test (LA2) medijan (95% CI) IQR | | | LA omjer (LA1/LA2) medijan (95% CI) IQR | | |
|---|--|-----------------|-----------------|--|-----------------|-----------------|---|--------------------|--------------------|
| | NP (s) | NP + DS (s) | NP + AC (s) | NP (s) | NP + DS (s) | NP + AC (s) | NP (s) | NP + DS (s) | NP + AC (s) |
| 177 (122 – 314) 164 - 348 | 76 (58 – 109) | 46 (41 – 60) | 36 (35 – 42) | 46 (35 – 66) | 38 (37 – 42) | 38 (34 – 42) | 1,6 (1,6 - 2,0) | 1,2 (1,1 – 1,4) | 1,0 (0,9 – 1,1) |
| | 63 -88 | 42 – 52 | 36 – 38 | 38 – 56 | 37– 39 | 35 – 40 | 1,6 - 1,8 | 1,1 – 1,3 | 0,9 – 1,1 |
| | P = 0,007 | | | P = 0,050 | | | P = 0,008 | | |
| | | P=0,001* | | | P = 0,001* | | | P = 0,001* | |
| | | P = 0,008 | | | P = 0,383 | | | P = 0,016 | |

*P vrijednost između skupine NP i NP+AC

IQR = interkvartilni raspon; 95%CI = 95%-tni interval pouzdanosti za medijan; LA = lupus antikoagulans; AC = aktivni ugljen;

DS = DOAC-Stop™ tableta



Slika 10. Grafički prikaz vrijednosti a) dRVVT probirne pretrage (LA1); b) dRVVT potvrđne pretrage (LA2) i c) LA omjera u nativnoj plazmi (NP), plazmi nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete (DS) i plazmi nakon dodatka aktivnog ugljena (AC) u bolesnika s LP rezultatom pretrage LA i liječenih apiksabanom.

4.3. Rezultati određivanja koncentracije DOAC lijekova u uzorcima plazme bolesnika s lažno pozitivnim rezultatom pretrage LA nakon dodatka komercijalne DOAC-Stop™ tablete i medicinskog aktivnog ugljena

U svrhu potvrde adsorptivnih svojstava komercijalne DOAC-Stop™ tablete i medicinskog aktivnog ugljena, od ukupnog broja uzoraka bolesnika liječenih sa sva tri DOAC lijeka, nasumično je odabrano po 5 uzoraka plazme za svaki pojedinačni lijek u kojima je izmjeren LP rezultat pretrage LA te je u svim uzorcima nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete te medicinskog aktivnog ugljena, te je u svih 30 uzoraka (n=30; 15 uzoraka s DS i 15 uzoraka s AC) određena koncentracija odgovarajućeg DOAC lijeka. U svim analiziranim uzorcima koncentracija odgovarajućeg DOAC lijeka nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete i aktivnog ugljena bila je nemjerljiva, odnosno ispod granice detekcije kvantitativnim metodama određivanja korištenim u ovom istraživanju. Ovi rezultati pokazali su da oba korištena adsorbensa učinkovito uklanjaju sva tri DOAC lijeka iz plazme bolesnika, što objašnjava njihov djelotvoran učinak na uklanjanje interferencije u određivanju pretrage LA.

4.4. Rezultati određivanja probirne dRVVT i potvrdne dRVVT pretrage te izračun LA omjera u uzorcima plazme bolesnika sa stvarno pozitivnim rezultatom pretrage LA i nakon dodatka komercijalne DOAC-Stop™ tablete i medicinskog aktivnog ugljena

Dodatnu podskupinu činili su uzorci bolesnika s poznatim pozitivnim rezultatom pretrage LA (n = 3), a koji nisu liječeni DOAC lijekovima. Kako bismo provjerili da adsorbensi korišteni u ovom istraživanju nemaju utjecaj na rezultate određivanja LA kod bolesnika koji imaju dokazano pozitivan rezultat LA, u sva 3 uzorka bolesnika s pozitivnim LA, učinjeno je određivanje dRVVT probirne i dRVVT potvrdne pretrage te je izračunat LA omjer prije i nakon dodatka DOAC-stop tablete, odnosno medicinskog aktivnog ugljena.

Rezultati ispitivanja provedeni u uzorcima bolesnika s ranije dokazanim pozitivnim LA, a kojima su tijekom redovne laboratorijske kontrole određeni probirna i potvrdna dRVVT pretraga uz izračun LA omjera prije i nakon dodatka oba adsorbensa, pokazali su da dodatak adsorbensa nema interferirajući učinak na

rezultat pretrage LA, odnosno da stvarno pozitivan rezultat pretrage LA ostaje pozitivan prije i nakon dodatka oba adsorbensa, DOAC-stop tablete i aktivnog ugljena (Tablica 9).

Tablica 9. Rezultati probirne i potvrdne dRVVT pretrage (LA1 i LA2) i LA omjera (LA1/LA2) u bolesnika s ranije dokazanim LA (n=3): u nativnoj plazmi ispitanika (NP), plazmi ispitanika nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete (NP + DS) i plazmi ispitanika nakon dodatka aktivnog ugljena (NP + AC).

| | dRVVTprobirni test (LA1) (s) | | | dRVVTpotvrdni test (LA2) (s) | | | LA omjer (LA1/LA2) (s) | | |
|----------|---------------------------------|----------------|----------------|---------------------------------|----------------|----------------|---------------------------|----------------|----------------|
| | NP (s) | NP + DS (s) | NP + AC (s) | NP (s) | NP + DS (s) | NP + AC (s) | NP (s) | NP + DS (s) | NP + AC (s) |
| Bolesnik | | | | | | | | | |
| 1. | 99 | 93 | 91 | 45 | 43 | 43 | 2,2 | 2,2 | 2,1 |
| 2. | 46 | 47 | 46 | 30 | 31 | 31 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| 3. | 119 | 88 | 92 | 64 | 49 | 52 | 1,9 | 1,8 | 1,8 |

AC = aktivni ugljen; DS = DOAC-Stop™ tablet

5. RASPRAVA

Uvođenjem DOAC lijekova u kliničku praksu, specijalizirani laboratoriji za ispitivanje poremećaja hemostaze suočeni su s novim izazovima. Liječenje bolesnika DOAC lijekovima ima značajan utjecaj na rezultate većine koagulacijskih pretraga, uključujući probirne pretrage dostupne u većini koagulacijskih laboratorija (PV, APTV i TV), ali i brojne specijalističke pretrage hemostaze među kojima u svakodnevnoj kliničkoj praksi posebno značenje imaju pretrage koje se izvode u sklopu probira na trombofiliju sa svrhom utvrđivanja nasljednih i/ili stečenih čimbenika rizika u bolesnika s tromboembolijskim bolestima. Izvođenje većine pretraga probira na trombofiliju u okviru specijaliziranih koagulacijskih laboratorija otežano je, odnosno, onemogućeno u bolesnika liječenih DOAC lijekovima (jednako kao i „starim“ antikoagulantnim lijekovima, odnosno VKA) zbog njihova značajnog utjecaja na rezultate ovih pretraga u smislu lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata. Stoga je upravo antikoagulantna terapija DOAC lijekovima jedan od ključnih predanalitičkih čimbenika koje treba uvijek uzeti u obzir pri planiranju izvođenja pretraga u sklopu laboratorijske dijagnostike trombofilije. Poznavanje utjecaja DOAC lijekova na rezultate pretraga na trombofiliju preduvjet je njihove pravilne interpretacije. Izvođenje ovih pretraga u bolesnika liječenih DOAC lijekovima stoga može imati izravan negativan učinak na liječenje i skrb o bolesniku, s obzirom da pogrešna interpretacija rezultata ovih pretraga zbog nepoznavanja učinaka lijeka može rezultirati i pogrešnim postavljanjem dijagnoze.

Jedna od važnih i neizostavnih pretraga u sklopu probira na trombofiliju koje se izvode u specijaliziranim koagulacijskim laboratorijima je i dokazivanje lupus antikoagulansa. Za razliku od druge dvije podskupine antifosfolipidnih protutijela, aCL i anti- β 2-GP1, koje se određuju enzimimunokemijskim testovima i na koje antikoagulacijska terapija nema interferirajući učinak, određivanje pretrage LA koagulacijskim testovima izravno je podložno utjecaju antikoagulacijske terapije svim vrstama antikoagulantnih lijekova, uključujući i DOAC lijekove. Izvođenje dijagnostičkog postupka kojim se dokazuje prisutnost lupus antikoagulansa u cirkulaciji, kao jednog od kriterija u postavljanju dijagnoze antifosfolipidnog sindroma, stoga je vrlo otežano u bolesnika koji se liječe DOAC lijekovima. Naime, budući da terapija DOAC lijekovima uzrokuje lažno pozitivan rezultat pretrage LA kod

značajnog broja bolesnika, ispitivanje ovog čimbenika rizika nije moguće izvoditi u bolesnika liječenih ovim lijekovima. S druge strane, odgađanje laboratorijske dijagnostike probira na trombofiliju, uključujući i dijagnostiku LA protutijela, do završetka antikoagulantne terapije može imati izravne negativne ili štetne učinke na samo liječenje bolesnika.

Budući da niti jedna zasebno izvedena laboratorijska pretraga nema zadovoljavajuću dijagnostičku osjetljivost i specifičnost za određivanje LA protutijela u cirkulaciji, dokazivanje ovih protutijela u plazmi temelji se na kombinaciji pretraga koje uključuju pretrage probira i potvrde. Primjena dRVVT probirnog i potvrdnog testa prema svim trenutno važećim smjernicama krovnih međunarodnih organizacija čini neizostavni dio dijagnostičkog postupka u dokazivanju LA (Pengo i sur., 2018; Pengo i sur., 2009). Međutim, analogno većini ostalih pretraga probira na trombofiliju čije načelo mjerenja koristi koagulometrijsku metodu detekcije reakcije, na dRVVT probirnu i potvrdnu pretragu, DOAC lijekovi značajno utječu rezultirajući lažno pozitivnim rezultatom LA (Antovic i sur., 2017; Hoxha i sur., 2017; Ratzinger i sur., 2016; Martinuzzo i sur., 2014). Ispitivanja utjecaja DOAC lijekova na rezultate pretrage LA tako su nedvojbeno pokazala da izvođenje ove pretrage nije pouzdano, a time niti opravdano u bolesnika liječenih DOAC lijekovima.

Razumijevanje važnosti pouzdane laboratorijske dijagnostike čiji osnovni cilj mora biti točan i pouzdan rezultat pretrage s jedne strane te važnost pravovremene dijagnostike u svrhu optimiranja intenziteta i duljine antikoagulacijske terapije s druge strane, u posljednje dvije godine rezultirali su najnovijim istraživanjima koja su imala za cilj osmisliti potencijalne mehanizme uklanjanja interferencije DOAC lijekova u određivanju pojedinih pretraga probira na trombofiliju. Ova su istraživanja tek nedavno rezultirala prvim komercijalnim pripravkom, tzv. DOAC-StopTM tabletom (Haematex Research, Hornsby, Australija) koja zbog svojih adsorptivnih svojstava ima sposobnost uklanjanja DOAC lijekova iz plazme ispitanika čime se izravno poništava interferirajući utjecaj ovih lijekova na izvođenje koagulacijskih pretraga probira na trombofiliju. Primjena DOAC-StopTM tablete i prvi preliminarni rezultati ispitivanja objavljeni prošle godine označili su prekretnicu u laboratorijskoj dijagnostici probira na trombofiliju u bolesnika liječenih DOAC lijekovima (Favrese i sur., 2018). Za sada je primjena DOAC-StopTM postupka još uvijek na istraživačkoj razini, ali je za očekivati da će primjena DOAC-StopTM tablete u narednim godinama postati sastavni dio ispitivanja na trombofiliju u bolesnika koji se liječe DOAC lijekovima.

Cilj ovog rada bio je ispitati učinak i djelotvornost DOAC-Stop™ postupka u uklanjanju interferencije DOAC lijekova u dijagnostici LA protutijela, korištenjem komercijalno dostupne DOAC-Stop™ tablete (Upute za uporabu: DOAC-Stop™, Haematex Research, Hornsby, Australia). Međutim, u ovom smo radu otišli i korak dalje tako što smo optimirali i vlastitu metodu uklanjanja interferencije primjenom medicinskog aktivnog ugljena u prahu (Sažetak uputa o lijeku: CARBOMED granule, Jadran Galenski laboratorij). Naime, iako sastav DOAC-Stop™ tablete nije jasno naznačen na deklaraciji proizvođača, tijekom osmišljavanja vlastitog istraživanja uz primjenu DOAC-Stop™ tablete pretpostavili smo da je ključna djelatna tvar koja djeluje kao adsorbens za DOAC lijekove aktivni ugljen. Stoga je jedan od naših ključnih ciljeva u ovom radu bio usporediti i djelotvornost vlastite *in house* osmišljene metode uklanjanja interferencije uz primjenu medicinskog aktivnog ugljena (CARBOMED granule, Jadran Galenski Laboratorij) s učinkom koji se postiže primjenom komercijalno dostupne DOAC-Stop™ tablete. Kako bismo ispitali ispravnost naše pretpostavke te utvrdili djeluje li medicinski aktivni ugljen kao adsorbens DOAC lijekova te je li učinkovit u uklanjanju interferencije u određivanju pretrage LA, eksperimentalni dio istraživanja u cijelosti smo izveli na način da su sva mjerenja učinjena u svim analiziranim uzorcima uz istodobnu primjenu i komercijalne DOAC-Stop™ tablete i medicinskog aktivnog ugljena. Prvi dio našeg istraživanja odnosio se na optimiranje vlastitog postupka s obzirom na količinu aktivnog ugljena koja se dodaje određenom uzorku plazme ispitanika te duljinu centrifugiranja kako bi se postigao očekivani učinak uklanjanja interferencije. Pokazalo se da je u 0,5 do 1,0 mL plazme ispitanika potrebno dodati 100 µg granula aktivnog ugljena te se nakon centrifugiranja na 2000 g tijekom 20 minuta postiže potpuna adsorpcija DOAC lijekova na aktivni ugljen, a u supernatantu tako obrađenog uzorka moguće je dalje postupati kao i u slučaju korištenja komercijalne DOAC-Stop™ tablete.

Daljnji tijek našeg eksperimentalnog istraživanja uključivao je određivanje koncentracije DOAC lijekova, dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana, u plazmi ispitanika, izvođenje probirne i potvrdne dRVVT pretrage u dijagnostici LA te njihovo ponavljanje u istovjetnim uzorcima plazme nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete, odnosno medicinskog aktivnog ugljena na način kako je opisano u odjeljku Metode ovog rada.

Rezultati provedenog ispitavanja pokazali su da sva tri DOAC lijeka značajno utječu na rezultate dRVVT probirne i potvrdne pretrage rezultirajući LP rezultatom

pretrage LA u značajnom udjelu ispitanih bolesnika, odnosno u više od polovice svih ispitanih uzoraka bolesnika liječenih rivaroksabanom i dabigatranom, dok je udio LP rezultata u uzorcima bolesnika liječenih apiksabanom bio nešto niži. Analizom statističke značajnosti razlika proporcija potvrđeno je da je udio LP rezultata pretrage LA bio značajno veći u podskupini bolesnika liječenih rivaroksabanom u odnosu na udio LP rezultata u bolesnika liječenih apiksabanom. Udio LP rezultata pretrage LA nije se značajno razlikovao između bolesnika liječenih dabigatranom i rivaroksabanom kao niti između bolesnika liječenih dabigatranom i apiksabanom. Rezultati našeg istraživanja s obzirom na visok udio LP rezultata pretrage LA u bolesnika na DOAC lijekovima podudarni su s rezultatima drugih autora (Hillarp i sur., 2018; Antovic i sur., 2017; Ratzinger i sur., 2016; Merriman i sur., 2011). Nadalje, rezultati našeg istraživanja također potvrđuju prethodna opažanja drugih autora koji su pokazali da lijek apiksaban ima značajno niži potencijal uzrokovanja LP rezultata u odnosu na lijek rivaroksaban (Hoxha i sur. 2017; Ratzinger i sur., 2016; Bonar i sur., 2016; Hillarp i sur., 2014). S obzirom da studije navode da apiksaban u istoj mjeri produljuje vrijeme zgušavanja i probirnog i potvrdnog dRVVT testa, rezultirajući normalnim dRVVT omjerom, odnosno negativnim rezultatom pretrage LA, upravo bi to mogao biti razlog zašto je i u našem ispitivanju najmanji udio lažno pozitivnih rezultata dobiven u skupini bolesnika liječenih apiksabanom.

Nadalje, rezultati našeg ispitivanja pokazali su da se koncentracije sva tri DOAC lijeka ne razlikuju značajno u uzorcima bolesnika kod kojih je izmjeren LP rezultat pretrage LA. U uzorcima bolesnika s negativnim rezultatom pretrage LA, koncentracije dabigatrana i apiksabana bile su značajno veće u odnosu na koncentracije rivaroksabana, što upućuje da lijek rivaroksaban može uzrokovati LP rezultat pretrage LA i pri vrlo niskim koncentracijama koje vremenski odgovaraju minimalnim koncentracijama lijeka u cirkulaciji, odnosno onima koje odgovaraju vremenu uzorkovanja neposredno prije primjene sljedeće doze lijeka. Ovo opažanje je važno jer upućuje da laboratorijska dijagnostika LA nije pouzdana u bolesnika liječenih DOAC lijekovima niti ako se uzorkovanje izvodi u vremenskoj točki kada je koncentracija lijeka u cirkulaciji najniža, odnosno neposredno prije primjene sljedeće doze lijeka.

Rezultati našeg rada podudarni su s rezultatima drugih ispitivanja koja su pokazala da iako je utjecaj DOAC-lijekova na rezultate pretrage LA ovisan o plazmatskoj koncentraciji samoga lijeka, ovi lijekovi mogu čak i pri niskim

koncentracijama u cirkulaciji uzrokovati LP rezultat pretrage LA (Flieder i sur., 2018; Antovic i sur., 2017; Hoxha i sur., 2017; Ratzinger i sur., 2016; Martinuzzo i sur., 2014).

Ključni dio našeg ispitivanja odnosio se na ispitivanje učinkovitosti komercijalne DOAC-Stop™ tablete i medicinskog aktivnog ugljena u uklanjanju interferencije sva tri DOAC lijeka na rezultat pretrage LA. Kako bismo to ispitali, u zasebne alikvote svih uzoraka s LP rezultatom pretrage LA dodani su DOAC-Stop™ tableta i aktivni ugljen. Nakon centrifugiranja ovako obrađenih uzoraka, u supernatantu je ponovljeno određivanje probirne i potvrdne dRVVT pretrage uz izračun LA omjera. Rezultati ovako provedenog ispitivanja jasno su pokazali da i DOAC-Stop™ tableta i medicinski aktivni ugljen učinkovito i djelotvorno uklanjaju interferenciju sva tri DOAC lijeka na rezultat pretrage LA. Analiza statističke značajnosti razlike pokazala je značajne razlike u vrijednostima dRVVT probirne i potvrdne pretrage kao i LA omjera u nativnoj plazmi, plazmi kojoj je dodana DOAC-Stop™ tableta i plazmi kojoj je dodan aktivni ugljen. U svim ispitanim uzorcima, za sva tri lijeka, nakon dodatka i DOAC-Stop™ tablete i aktivnog ugljena, vrijednosti i probirne i potvrdne dRVVT pretrage te izračunatog LA omjera (dRVVTs/dRVVTc), došlo je do potpune korekcije vrijednosti unutar referentnog intervala.

Nadalje, iz rezultata našeg ispitivanja proizlazi da je djelotvornost DOAC-Stop™ tablete i vlastite optimirane metode s medicinskim aktivnim ugljenom jednaka i usporediva te na temelju ovih rezultata zaključujemo da se primjena medicinskog aktivnog ugljena može jednako učinkovito koristiti u uklanjanju interferencije DOAC lijekova u postupku izvođenja pretrage LA kod bolesnika liječenih DOAC-ima.

U svim nasumično odabranim alikvotima uzoraka plazme kojima su dodani DOAC-Stop™ tableta, odnosno medicinski aktivni ugljen, koncentracije sva tri DOAC lijeka bile su nemjerljivo niske, odnosno ispod granice detekcije metodom kvantitativnog određivanja koncentracije ovih lijekova. Ovi rezultati pokazuju da i DOAC-Stop™ tableta i medicinski aktivni ugljen u potpunosti adsorbiraju sva tri DOAC lijeka iz plazme bolesnika, čime se objašnjava njihova učinkovitost u uklanjanju interferirajućeg učinka na probirnu i potvrdnu dRVVT pretragu u sklopu dijagnostičkog postupka za LA.

Dodatno, kako bismo ispitali ima li primjena DOAC-Stop™ tablete, odnosno medicinskog aktivnog ugljena, utjecaja na stvarno pozitivan rezultat rezultata pretrage LA, ispitivanje je učinjeno kod 3 bolesnika s poznatim pozitivnim rezultatom

pretrage LA. Ovi bolesnici nisu bili na terapiji DOAC lijekovima, a određivanje pretrage LA učinjeno je u sklopu redovne kontrolne dijagnostičke obrade koja je uključivala i određivanje pretrage LA. Kod sva tri bolesnika, probirna i potvrdna dRVVT pretraga je učinjena u nativnoj plazmi, te u istovjetnim alikvotima uzoraka plazme nakon dodatka DOAC-Stop™ tablete, odnosno aktivnog ugljena. Rezultati ovog ispitivanja potvrdili su da primjena komercijalne DOAC-Stop™ tablete, kao i medicinskog aktivnog ugljena ne utječe na rezultat u bolesnika koji imaju stvarno pozitivan LA. Ovo zapažanje je od iznimne važnosti jer potvrđuje da se postupak primjene DOAC-Stop™ tablete, odnosno aktivnog ugljena, može pouzdano koristiti bez utjecaja na stvarno pozitivan rezultat pretrage LA, što je preduvjet da bi se sam postupak uopće mogao implementirati u svakodnevnu laboratorijsku praksu određivanja pretrage LA u bolesnika koji se liječe DOAC lijekovima.

Koliko nam je poznato, do sada nije provedeno niti jedno istraživanje u kojem je ispitan potencijalni učinak medicinskog aktivnog ugljena (uz izuzetak komercijalne DOAC-Stop™ tablete za koju smo pretpostavili da je ključna djelatna komponenta upravo aktivni ugljen) na uklanjanje interferencije DOAC lijekova u određivanju bilo koje pretrage hemostaze, uključujući i LA. Osnovna prednost primjene medicinskog aktivnog ugljena u odnosu na komercijalnu DOAC-Stop™ tabletu je ta što je medicinski aktivni ugljen lako dostupan i jeftin pripravak u odnosu na vrlo skupi komercijalni pripravak DOAC-Stop™ tablete čija primjena značajno povećava, odnosno udvostručava cijenu ionako skupih pretraga probira na trombofiliju. S druge strane, prednost primjene komercijalne DOAC-Stop™ tablete u odnosu na medicinski aktivni ugljen je znatno kraće vrijeme centrifugiranja uzoraka, što izravno utječe na brzinu izvođenja pretraga.

Na kraju ovog rada, važno je naglasiti da provedeno ispitivanje smatramo iznimno važnim u smislu doprinosa poboljšanju laboratorijske dijagnostike pretraga hemostaze u bolesnika liječenih DOAC-lijekovima. Laboratorijski stručnjaci u specijaliziranim koagulacijskim laboratorijima svakodnevno su suočeni s važnošću poznavanja svih predanalitičkih, analitičkih i postanalitičkih čimbenika koji mogu utjecati na točnost rezultata pretraga, a time u konačnici i na kvalitetu liječenja samog bolesnika. Za očekivati jest da će primjena opisanog postupka uklanjanja interferencije primjenom DOAC-Stop™ tablete ili medicinskog aktivnog ugljena na izvođenje LA pretrage značajno doprinijeti pouzdanoj laboratorijskoj dijagnostici u bolesnika na terapiji DOAC lijekovima u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

6. ZAKLJUČAK

1. Provedeno ispitivanje pokazalo je da sva tri ispitana DOAC lijeka, dabigatran, rivaroksaban i apiksaban, rezultiraju lažno pozitivnim (LP) rezultatom pretrage LA u značajnom udjelu ispitanih uzoraka, odnosno bolesnika. Najveći udio lažno pozitivnih rezultata izmjeren je u uzorcima bolesnika liječenih rivaroksabanom, a najmanji u uzorcima bolesnika liječenih apiksabanom.
2. Budući da sva tri DOAC lijeka imaju značajan dokazani interferirajući utjecaj na određivanje pretrage LA u smislu lažno pozitivnih rezultata u velikom udjelu analiziranih uzoraka, ova pretraga ne bi se smjela izvoditi u bolesnika tijekom liječenja DOAC lijekovima.
3. Primjena komercijalne DOAC-Stop™ tablete učinkovito uklanja interferirajući učinak sva tri DOAC lijeka u određivanju i probirne i potvrдне dRVVT pretrage u sklopu dijagnostičkog postupka dokazivanja LA protutijela. Temeljem rezultata ovog ispitivanja zaključujemo da se postupak s DOAC-Stop™ tabletom može pouzdano koristiti u svrhu laboratorijske dijagnostike LA u bolesnika koji su na terapiji DOAC lijekovima.
4. U našem ispitivanju, primjena medicinskog aktivnog ugljena pokazala se jednako učinkovitom kao i primjena komercijalne DOAC-Stop™ tablete u uklanjanju interferirajućeg učinka sva tri DOAC lijeka u postupku određivanja LA pretrage. Temeljem rezultata ovog ispitivanja zaključujemo da se i postupak s medicinskim aktivnim ugljenom može pouzdano koristiti u svrhu laboratorijske dijagnostike LA u bolesnika na terapiji DOAC lijekovima.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Sandri Šupraha Goreta i znanstvenoj suradnici dr. sc. Sandri Margetić, voditeljici istraživačkog projekta koji je financijski podržan od Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ), na ukazanom povjerenju, strpljenju i pomoći pri pisanju rada kao i osoblju Kliničkog zavoda za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre Milosrdnice za strpljivo usmjeravanje tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

8. LITERATURA

Adcock DM, Gosselin R, Kitchen S, Dwyre DM. The effect of dabigatran on select specialty coagulation assays. *Am J Clin Pathol.* 2013;139(1):102-9.

Adcock DM, Gosselin R. Direct Oral Anticoagulants (DOACs) in the Laboratory: 2015 Review. *Thromb Res.* 2015;136(1):7-12.

Andreoli L, Chighizola CB, Banzato A, Pons-Estel GJ, Ramire de Jesus G, Erkan D. Estimated frequency of antiphospholipid antibodies in patients with pregnancy morbidity, stroke, myocardial infarction, and deep vein thrombosis: a critical review of the literature. *Arthritis Care Res.* 2013;65(11):1869-73.

Ansell J, Hirsh J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M, Palareti G. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008;133(6 Suppl):160S-198S.

Antovic A, Norberg EM, Berndtsson M, Rasmuson A, Malmström RE, Skeppholm M, Antovic J. Effects of direct oral anticoagulants on lupus anticoagulant assays in a real-life setting. *Thromb Haemost.* 2017;117(9):1700-4.

Baglin T, Keeling D, Kitchen S. Effects on routine coagulation screens and assessment of anticoagulant intensity in patients taking oral dabigatran or rivaroxaban: guidance from the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol.* 2012;159(4):427-9.

Baglin T, Hillarp A, Tripodi A, Elalamy I, Buller H, Ageno W. Measuring oral direct inhibitors of thrombin and factor Xa: a recommendation from the Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Hemost.* 2013;11:756-60.

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(6):1154-6.

Becker RC, Yang H, Barrett Y, Mohan P, Wang J, Wallentin L, Alexander JH. Chromogenic laboratory assays to measure the factor Xa-inhibiting properties of apixaban—an oral, direct and selective factor Xa inhibitor. *J Thromb Thrombol.* 2011;32(2):183-7.

Bonar R, Favaloro EJ, Mohammed S, Ahuja M, Pasalic L, Sioufi J, Marsden K. The effect of the direct factor Xa inhibitors apixaban and rivaroxaban on haemostasis tests: a comprehensive assessment using in vitro and ex vivo samples. *Pathology.* 2016;48(1):60-71.

Božič-Mijovski M, Malmström RE, Malovrh P, Antovic JP, Vene N, Šinigoj P, Mavri A. Diluted thrombin time reliably measures low to intermediate plasma dabigatran concentrations. *Ann Clin Biochem.* 2016;53(4):446-51.

Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* 2015;29(1):17-24.

Chaturvedi S, McCrae K. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome. *Blood Rev.* 2017;31(6):406-17

Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, Arcelus JI, Bergqvist D, Brecht JG, Greer IA, Heit JA, Hutchinson JL, Kakkar AK, Mottier D, Oger E, Samama MM, Spannagl M; VTE Impact Assessment Group in Europe (VITAE). Venous thromboembolism (VTE) in Europe. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost.* 2007;98(4):756-64.

DOAC-Stop™, Haematex Research, Hornsby, Australija: upute za uporabu. Pristupljeno 27.04.2019. Dostupno na: <http://haematex.com/doacstop.html>

Douxflis J, Dogné JM, Mullier F, Chatelain B, Ronquist-Nii Y, Malmstrom RE, Hjemdahl P. Comparison of calibrated dilute thrombin time and aPTT tests with LC-MS/MS for the therapeutic monitoring of patients treated with dabigatran etexilate. *Thromb Haemost.* 2013;110(3):543-9.

Eikelboom JW, Weitz JI. New anticoagulants. *Circulation* 2010;121:1523–32.

Favaloro EJ, Lippi G. Interference of direct oral anticoagulants in haemostasis assays: high potential for diagnostic false positives and false negatives. *Blood Transfus.* 2017;15(6):491-4.

Favrese J, Lardionis B, Sabor L, Devalet B, Vandepapeliere J, Lessire S, Chatelain B, Mullier F. Evaluation of the DOAC-Stop® Procedure to overcome the effect of DOACs on several thrombophilia screening tests. *TH Open.* 2018;02(02): e202-e209.

Fitzmaurice DA, Blann AD, Lip GYH. Bleeding risks of antithrombotic therapy. *BMJ.* 2002;325(7368):828-31.

Flieder T, Weiser M, Eller T, Dittrich M, von Bargen K, Alban S, Kuhn J, Knabbe C, Birschmann I. Interference of DOACs in different DRVVT assays for diagnosis of lupus anticoagulants. *Thromb Res.* 2018;165:101-106.

Franchini M, Liumbruno GM, Bonfanti C, Lippi G. The evolution of anticoagulant therapy. *Blood Transfus.* 2016;14(2):175-84.

Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood.* 2003; 101(5):1827-32.

Gómez-Puerta JA, Cervera R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun.* 2014;48-49:20-5.

Gosselin RC, Adcock DM, Bates SM, Douxfils J, Favaloro EJ, Guoin-Thibault I, Guillermo C, Kawai Y, Lindhoff-Last E, Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) Recommendations for Laboratory Measurement of Direct Oral Anticoagulants. *Thromb Haemost.* 2018; 118(3):437-450.

Harenberg J, Krämer R, Giese C, Marx S, Weiss C, Wehling M. Determination of rivaroxaban by different factor Xa specific chromogenic substrate assays: reduction of interassay variability. *J Thromb Thrombol.* 2011;32(3):267-71.

Harter K, Levine M, Henderson SO. Anticoagulation drug therapy: A Review. *West J Emerg Med.* 2015;16(1): 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(9):1545-53.

Hillarp A, Strandberg K, Baghaei F, Fagerberg Blixter I, Kerstin Gustafsson M, Lindahl TL. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor edoxaban on routine coagulation assays, lupus anticoagulant and anti-Xa assays. *Scand J Clin Lab Invest.* 2018;78(7-8):575-83.

Hoffman M: A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev.* 2003;17:(Suppl 1):S1-5.

Hoxha A, Banzato A, Ruffatti A, Pengo V. Detection of lupus anticoagulant in the era of direct oral anticoagulants. *Autoimmun Rev.* 2017;16(2):173-178.

Hutchinson JL, Kakkar AK, Mottier D, Oger E, Samama MM, Spannagl M; VTE Impact Assessment Group in Europe (VITAE). Venous thromboembolism (VTE) in Europe. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost.* 2007;98(4):756-64.

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

Margetić S. Laboratory investigation of thrombophilia. J Med Biochem. 2014;33:28-46.

Margetić S, Čaržavec D. Bolesti hemostaze. U: Topić E i sur., Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi, 2. Izdanje, Zagreb, Medicinska naklada, 2018; str. 349-87.

Masotti L, Campanini M. Pharmacology of new oral anticoagulants: mechanism of action, pharmacokinetics, pharmacodynamics. Ital J Med. 2013;7(8s),1-7.

Mannucci PM, Franchini M. Old and new anticoagulant drugs: a minireview. Ann Med. 2011;43(2):116-23.

Martinuzzo ME, Barrera LH, D'adamo MA, Otao JC, Gimenez MI, Oyhamburu J. Frequent false-positive results of lupus anticoagulant tests in plasmas of patients receiving the new oral anticoagulants and enoxaparin. Int J Lab Hematol. 2014;36(2):144-50.

McKenzie SB, Williams JL. Primary hemostasis. U: Clinical Laboratory Hematology, 2. Izdanje, Edinburgh, Pearson, 2014; str. 713-42.

Merriman E, Kaplan Z, Butler J, Malan E, Gan E, Tran H. Rivaroxaban and false positive lupus anticoagulant testing. Thromb Haemost. 2011;105(2):385-6.

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost. 2006;4(2):295-306.

Moore GW. Recent guidelines and recommendations for laboratory detection of lupus anticoagulants. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(2):163-71.

Morrissey JH, Tajkhorshid E, Sligar SG, Rienstra CM. Tissue factor/factor VIIa complex: role of the membrane surface. *Thromb Res.* 2012;129(Suppl 2):S8-10.

Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, De Groot PG; Subcommittee on lupus anticoagulant/antiphospholipid antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on thrombosis and haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on lupus anticoagulant/ antiphospholipid antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on thrombosis and haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2009;7(10):1737-40.

Pengo V, Bison E, Denas G, Jose SP, Zoppellaro G, Banzato A. Laboratory diagnostics of antiphospholipid syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2018;44(5):439-444.

Perth haematology. Antifosfolipidni sindrom. Pristupljeno 27.04.2019. Dostupno na: <http://www.perthhaematology.com.au/aps.htm>.

Ratzinger F, Lang M, Belik S, Jilma-Stohlawetz P, Schmetterer KG, Haslacher H, Perkmann, Quehenberger P. Lupus-anticoagulant testing at NOAC trough levels. *Thromb Haemost.* 2016;116(2):235-40.

Sažetak uputa o lijeku: CARBOMED granule, Jadran - galenski laboratorij. Pristupljeno 27.04.2019. Dostupno na: http://www.almp.hr/upl/lijekovi/PIL/UP-I-530-09-05-02-148_381-06-L-1337.pdf.

Smith SA. Overview of hemostasis. U: Weiss D, Wardrop J, urednici. *Schlam's Veterinary Hematology.* 6. Izdanje. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins; 2011. str. 635–53.

Stangier J, Feuring M. Using the HEMOCLOT direct thrombin inhibitor assay to determine plasma concentrations of dabigatran. *Blood Coag Fibrinol.* 2012;23(2):138-43

Tripodi A. The laboratory and the new oral anticoagulants. *Clin Chem.* 2013; 59(2):353-62.

Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* 2013;93(1):327-58.

Vuga I, Šupraha Goreta S, Margetić S. Direktni oralni antikoagulacijski lijekovi. *Farmaceutski glasnik.* 2018;74;633-52.

Weitz JI. Blood coagulation and anticoagulant, fibrinolytic, and antiplatelet drugs. U: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, urednici. *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics.* 13. Izdanje. New York, McGraw Hill Education; 2017. str. 848-6.

9. SAŽETAK

Liječenje bolesnika izravnim oralnim antikoagulansima (DOAC) ima značajan utjecaj na rezultate brojnih specijalističkih koagulacijskih pretraga među kojima posebno značenje imaju pretrage probira na trombofiliju koje se izvode u svrhu utvrđivanja nasljednih i/ili stečenih čimbenika rizika tromboze. Određivanje gotovo svih pretraga probira na trombofiliju koagulacijskim testovima u bolesnika liječenih DOAC lijekovima, rezultira lažno negativnim (LN) ili lažno pozitivnim (LP) rezultatima zbog interferirajućeg utjecaja ovih lijekova na pojedine pretrage. Stoga određivanje pretraga na trombofiliju u bolesnika liječenih DOAC lijekovima nije moguće te je njihovo izvođenje u pravilu potrebno odgoditi do završetka terapije kako bi se spriječilo pogrešno tumačenje dobivenih rezultata i posljedično postavljanje pogrešne dijagnoze. Jedna od neizostavnih pretraga u sklopu probira na trombofiliju je dokazivanje antifosfolipidnih protutijela lupus antikoagulansa (LA) u cirkulaciji. Ključne pretrage u dokazivanju LA uključuju primjenu zmijskog venoma u tzv. dRVVT (engl. *diluted Russell's viper venom time*) probirnom i potvrdnom testu, na koje DOAC lijekovi značajno utječu rezultirajući LP rezultatom kod većine bolesnika. Stoga su najnovija istraživanja usmjerena na osmišljavanje potencijalnih mehanizama uklanjanja interferencije DOAC lijekova u određivanju pretraga na trombofiliju rezultirala prvim komercijalnim pripravkom, tzv. *DOAC-StopTM* tabletom (*DOAC-StopTM, Haematex Research, Hornsby, Australia*), koja ima sposobnost uklanjanja DOAC lijeka iz plazme bolesnika.

Cilj ovog rada bio je ispitati učinak komercijalne *DOAC-StopTM* tablete, kao i vlastite optimirane metode uz primjenu medicinskog aktivnog ugljena u prahu (CARBOMED granule, Jadran Galenski Laboratorij, Hrvatska) na uklanjanje interferencije u dijagnostici LA protutijela. U uzorcima bolesnika liječenih DOAC lijekovima, dabigatranom (n=57), rivaroksabanom (n=58) i apiksabanom (n=28), određene su probirna i potvrdna dRVVT pretraga za dokazivanje LA. U drugom, ključnom dijelu našeg ispitivanja, u svim uzorcima s LP rezultatom pretrage LA, ispitana je djelotvornost *DOAC-StopTM* tablete i medicinskog aktivnog ugljena na uklanjanje interferencije u dokazivanju LA. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da i *DOAC-StopTM* tableta i vlastiti optimirani postupak uz primjenu medicinskog aktivnog ugljena (0,5 ml plazme, 100 µg aktivnog ugljena, centrifugiranje na 2000 g

tijekom 20 minuta) učinkovito uklanjaju interferenciju u određivanju pretrage LA u svim analiziranim uzorcima s LP rezultatom za sva tri ispitana DOAC lijeka. Provedeno ispitivanje smatramo iznimno važnim u smislu značajnog doprinosa poboljšanju laboratorijske dijagnostike pretraga na trombofiliju koagulacijskim testovima u bolesnika liječenih DOAC lijekovima.

Ključne riječi: trombofilija, direktni oralni antikoagulansi (DOAC), interferencija, lupus antikoagulans

9. SUMMARY

Treatment of patients with direct oral anticoagulants (DOACs) has a significant impact on the results of many specialized coagulation tests, among which assays for thrombophilia testing are of special significance. They are performed with the purpose of determining hereditary and/or acquired thrombotic risk factors. Determination of almost all assays included in thrombophilia testing in patients treated with DOACs, results in false negative (FN) or false positive (FP) results due to the interfering effects of these drugs on individual assays. Therefore, determination of these assays is not possible in patients treated with DOACs, and their performance should be postponed until the therapy is over in order to prevent misinterpretation of the test results obtained and the consequent misdiagnosis. One of the indisputable assays included in thrombophilia testing is detection of lupus anticoagulant (LA) antiphospholipid antibodies in circulation. The key assays aimed at LA detection include the use of a snake venom in so-called dRVVT (*diluted Russell's viper venom time*) screening and confirmatory tests, at which DOAC drugs significantly affect of FP results in most patients. Therefore, recent research aimed at designing potential mechanisms for removing the interference of DOAC drugs in determination of thrombophilia tests resulted in the preparation of the first commercial *DOAC-Stop™* tablet (*DOAC-Stop™, Haematex Research, Hornsby, Australia*). The tablet has the ability of removing DOAC drugs from the patient's plasma.

The aim of this study was to investigate the effect of commercial DOAC-stop tablet as well as the efficiency of our own optimized method of using the activated charcoal powder (CARBOMED granules, Jadran-Galenski Laboratorij, Croatia) in removing interference in the detection of LA antibodies. In samples of patients treated with DOAC drugs, i.e. dabigatran (n = 57), rivaroxaban (n = 58) and apixaban (n = 28), both screening and confirmatory dRVVT assays for LA detection were determined. In the second, crucial part of our study, the effectiveness of both DOAC-stop tablet and medical activated charcoal were investigated in removing LA interference in all samples with FP results of LA testing. The results of our study have clearly shown that both *DOAC-Stop™* tablet and our own optimized procedure of using the medical activated charcoal (0.5 ml of plasma, 100 µg of activated charcoal, centrifugation 20 minutes at 2000 g), effectively eliminate the interference in

determining of LA antibodies in all samples with LP results of LA testing for all three DOAC drugs evaluated. The conducted study is considered to be of great importance in terms of contribution to the significant improvement in the laboratory diagnostics of thrombophilia using coagulation assays in patients treated with DOAC drugs.

Key words: thrombophilia, direct oral anticoagulants (DOACs), interference, lupus anticoagulant