

Klinički zavod za kemiju KBC Sestre milosrdnice

Sandra Marjetić, Ivana Čelap, Sandra Šupraha Goreta

Laboratorijska dijagnostika direktnih oralnih antikoagulansa (DOAK)

*Sandra Margetić, Ivana Ćelap, Sandra Šupraha Goreta
urednice i autorice*

**Laboratorijska dijagnostika
direktnih oralnih antikoagulansa (DOAK)**



NAKLADNIK: Klinički zavod za kemiju KBC Sestre milosrdnice

UREDNICE I AUTORICE: doc. dr. Sandra Margetić,
spec. med. biokemije

doc. dr. Ivana Ćelap,
spec. med. biokemije i lab. medicine

doc. dr. Sandra Šupraha Goreta,
spec. med. biokemije i lab. medicine

RECENZENTI: izv. prof. dr. Marija Grdić Rajković,
spec. med. biokemije i lab. medicine

dr. sc. Marija Milić, spec. med. biokemije

LEKTURA I KOREKTURA: izv. prof. Nada Vrkić, spec. med. biokemije

VRSTA PUBLIKACIJE: priručnik

GRAFIČKO OBLIKOVANJE: D.Point / Kreativna agencija

TISAK: Kerschoffset, Zagreb

ISBN 978-953-7822-35-4

CIP zapis je dostupan u računalnome katalogu
Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu pod brojem 001152593.

Izdavanje priručnika omogućeno je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) u sklopu istraživačkog projekta *Novi oralni antikoagulansi: povezanost koncentracije i antikoagulantnog učinka lijeka (LAB-NOAC, HRZZ-IP-2016-06-8208; <http://www.hrzz.hr>).*

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA DIREKTNIH ORALNIH ANTIKOAGULANSA (DOAK)

Urednice i autorice priručnika

Doc. dr. sc. **Sandra Margetić**, spec. med. biokemije
Klinički zavod za kemiju
Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb

Doc. dr. sc. **Ivana Ćelap**, spec. med. biokemije i lab. medicine
Klinički zavod za kemiju
Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb

Doc. dr. sc. **Sandra Šupraha Goreta**, spec. med. biokemije i lab. medicine
Zavod za biokemiju i molekularnu dijagnostiku
Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

SADRŽAJ

Predgovor	5
Direktni oralni antikoagulansi (DOAK) - klinička primjena i indikacije za određivanje koncentracije lijeka	10
Farmakološka svojstva DOAK lijekova.....	17
Farmakogenetika DOAK lijekova.....	27
Utjecaj DOAK lijekova na pretrage hemostaze	37
Metode određivanja DOAK lijekova	48
Preporuke za laboratorijsku dijagnostiku DOAK lijekova.....	55
Literatura	65
Prilog: Literaturni navodi objavljenih rezultata istraživačkog projekta IP-2016-06-8208 LAB-NOAC.....	69

PREDGOVOR

Tromboembolijske bolesti, uključujući arterijsku i vensku trombozu, zbog visoke pojavnosti i stupnja morbiditeta i mortaliteta u općoj populaciji, značajan su javnozdravstveni problem u razvijenim zemljama, pa tako i u Republici Hrvatskoj. S obzirom da osnovni pristup u prevenciji i liječenju ovih bolesti čine antikoagulacijski lijekovi, razumljivi su trajni naporci za pronalaženjem novih i djelotvornijih lijekova s ciljem poboljšanja skrbi o bolesniku.

Desetljećima su antagonisti vitamina K (VKA, engl. *vitamin K antagonists*) bili jedini oralni antikoagulacijski lijekovi u prevenciji i liječenju tromboembolijskih stanja. Premda pokazuju visoku terapijsku učinkovitost, istodobno imaju i značajna ograničenja zbog brojnih interakcija s hranom i drugim lijekovima, uske terapijske širine i posljedične potrebe za učestalim laboratorijskim praćenjem te pojavu neželjenih učinaka liječenja, u prvom redu krvarenja. Uvođenje direktnih oralnih antikoagulansa (DOAK) u kliničku praksu posljednjih desetak godina rezultat je upravo nepostojanja idealnog antikoagulacijskog lijeka te potrebe za novim generacijama lijekova čija su djelovanja selektivno i ciljano usmjerena na inhibiciju određenog dijela sustava zgrušavanja u svrhu postizanja veće kliničke učinkovitosti i sigurnosti u liječenju. Unatoč opće prihvaćenom stajalištu da primjena DOAK-a ne zahtijeva redovito laboratorijsko praćenje jer se doziranje lijeka ne temelji na rezultatima koagulacijskih laboratorijskih pretraga, rezultati prvih kliničkih iskustava

nisu potvrdili navedeno stajalište. Upravo suprotno, dosadašnja klinička iskustva jasno upućuju da je u određenim kliničkim stanjima i populacijama bolesnika potrebno odrediti koncentraciju DOAK lijeka u plazmi, u prvom redu kao pomoć u donošenju kliničkih odluka u hitnim stanjima, a potom i u svrhu procjene antikoagulacijskog učinka lijeka kod određenih bolesnika.

S uvođenjem DOAK lijekova u kliničku praksu i laboratoriji za ispitivanje hemostaze suočeni su s novim izazovima i praksom. S jedne strane, s obzirom da DOAK lijekovi utječu na rezultate probirnih kao i većine specifičnih koagulacijskih pretraga, poznavanje utjecaja ovih lijekova na rezultate pojedinih pretraga neophodno je za njihovu interpretaciju i sprječavanje pogrešaka u donošenju dijagnostičkih i kliničkih odluka. Nadalje, implementacija specifičnih kvantitativnih metoda koje omogućuju pouzdano određivanje koncentracije DOAK-a u plazmi nametnula se kao novo područje djelatnosti laboratoriјa. Istodobno s prvim kliničkim iskustvima u primjeni ovih lijekova istraživanja su usmjerena i na razvoj specifičnih metoda za njihovo određivanje.

Unatoč posvemašnjem porastu primjene DOAK-a u kliničkoj praksi tijekom posljednjih desetak godina, još uvijek postoje brojne nepoznanice. Poglavito se odnose na nedovoljno kliničko iskustvo u slučajevima opsežnih krvarenja, suspektnog predoziranja lijekom te pristup bolesniku u stanjima koja zahtijevaju hitnu kiruršku intervenciju ili invazivni dijagnostički odnosno terapijski postupak. Štoviše, nisu poznate ni optimalne terapijske koncentracije pojedinog lijeka kao ni potencijalne kritične vrijednosti koje značajno povećavaju rizik od krvarenja. Razumijevanje utjecaja DOAK lijekova na rezultate koagulacijskih pretraga te njihove interpretacije u bolesnika koji se liječe ovim lijekovima, također su predmet brojnih istraživanja posljednjih godina. Interakcije s drugim lijekovima kao i interakcije polimorfnih varijanti

gena kandidata uključenih u metabolizam DOAK-a postaju važan predmet istraživanja sa svrhom poboljšanja učinkovitosti i sigurnosti liječenja s naglaskom na individualni pristup liječenju.

Stoga je osnovni cilj ovog priručnika prikazati dosadašnja saznanja o DOAK lijekovima, uz poseban naglasak na sve ključne aspekte laboratorijske dijagnostike, uključujući prikaz utjecaja lijekova na rezultate pretraga hemostaze i njihovu interpretaciju, kao i prikaz specifičnih kvantitativnih metoda određivanja DOAK-a na automatiziranim analitičkim sustavima u sklopu laboratorija za ispitivanje hemostaze.

Sadržaj ovog priručnika temelji se na dosad objavljenim literaturnim podacima, kao i na spoznajama koje su izravan rezultat istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) pod nazivom *Novi oralni antikoagulansi: povezanost koncentracije i antikoagulantnog učinka lijeka* (IP-2016-06-8208, LAB-NOAC). Nositelj projekta je Klinički zavod za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu. Rezultati provedenog istraživanja važan su doprinos razumijevanju patofizioloških procesa u bolesnika liječenih DOAK lijekovima, kliničkih aspekata liječenja kao i laboratorijske dijagnostike. Ujedno se projekt LAB-NOAC pokazao izvrsnim temeljem za uvođenje kvantitativnih metoda određivanja DOAK-a u svakodnevni laboratorijski rad. Sagledani su i utvrđeni utjecaji DOAK-a na pretrage hemostaze, interpretacija tih nalaza te prednosti i ograničenja analitičkih metoda za mjerjenje koncentracije DOAK-a u plazmi. Nadalje, mjerjenje i praćenje vršnih i minimalnih koncentracija DOAK lijekova u bolesnika uključenih u projekt LAB-NOAC omogućilo je i izravan pregled u rasponu očekivanih terapijskih koncentracija i usporedbu rezultata u vlastitoj populaciji s ostalim objavljenim literaturnim podacima. Praćenje vrijednosti vršnih i minimalnih koncentracija uključenih bolesnika tijekom duljeg vremenskog razdoblja pokazalo se iznimno važnim za razumijevanje

intra- i inter-individualne varijabilnosti koncentracija lijeka u cirkulaciji i njihove izravne povezanosti s antikoagulacijskim učinkom, ali i s pojmom neželjenih događaja (krvarenje, trombotički događaji) u pojedinih bolesnika. Važan rezultat projekta *LAB-NOAC* jest i implementiranje preporuka za izvođenje pretraga probira na trombofiliju u bolesnika liječenih DOAK lijekovima s obzirom da ovi lijekovi utječu na gotovo sve fenotipske pretrage probira u smislu lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata. Sagledavajući činjenicu da interpretacija rezultata probira na trombofiliju utječe na daljnju kliničku odluku, a time i težinu moguće pogreške, kao i važnost implementacije kvantitativnih metoda određivanja koncentracije DOAK-a (uz razumijevanje svih čimbenika koji utječu na rezultat pretrage), neupitno je da je istraživanje *LAB-NOAC* polučilo izravan i jasan pozitivan učinak i na samu kliničku praksu. Rezultati projekta *LAB-NOAC* utkani su u ovaj priručnik.

U prvom dijelu priručnika prikazana je klinička primjena i indikacije za određivanje DOAK-a, važna farmakološka svojstva i do sada poznati farmakogenetski čimbenici koji se povezuju s varijabilnostima u koncentracijama lijeka i potencijalnom utjecaju na učinak liječenja. Potom je obrazložen utjecaj DOAK-a na probirne i specifične pretrage hemostaze, te su opisane dostupne kvantitativne metode određivanja DOAK-a u plazmi. Na kraju ovog priručnika navodimo i preporuke za laboratorijsko određivanje DOAK lijekova, uz poseban osvrt na sve bitne predanalitičke, analitičke i poslijeanalitičke čimbenike.

Sa završetkom projekta *LAB-NOAC* objavljena su tri izvorna i dva pregledna znanstvena rada iz područja istraživanja. Rezultati 21 posterskog rada prikazani su na međunarodnim znanstvenim skupovima među kojima je i jedan od radova proglašen najboljim na kongresu.

Obranjena su dva diplomska rada studenata Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a studentski znanstveni rad *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* nagrađen je Rektorovom nagradom Sveučilišta u Zagrebu za akademsku godinu 2018./2019. Tijekom projekta *LAB-NOAC* održana su pozvana predavanja na domaćim i međunarodnim stručnim i znanstvenim skupovima čime je šira stručna i znanstvena javnost upoznata s njegovim tijekom i rezultatima. Stoga kao prilog ovom priručniku navodimo i literaturne navode objavljenih rezultata provedenog istraživanja.

Na kraju ovog predgovora, u svojstvu voditelja projekta *LAB-NOAC*, želim zahvaliti kolegama liječnicima i laboratorijskim stručnjacima, suradnicima uključenim u projekt, što su svojim entuzijazmom, trudom i radom omogućili njegovu provedbu. Ovaj priručnik izdajemo s uvjerenjem u neupitnu važnost da što veći broj i liječnika i medicinskih biokemičara bude upoznat s ključnim kliničkim i laboratorijskim aspektima primjene DOAK lijekova u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Nadamo da će poslužiti kao pomoć i koristan vodič pri donošenju kliničkih odluka u cjelokupnom procesu liječenja bolesnika.

*Doc. dr. sc. Sandra Margetić,
specijalist medicinske biokemije*

DIREKTNI ORALNI ANTIKOAGULANSI (DOAK)

– KLINIČKA PRIMJENA I INDIKACIJE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE LIJEKA

DIREKTNI INHIBITORI TROMBINA (DTI)

Dabigatran (*Pradaxa[®], Behringer Ingelheim*) je u kliničkoj primjeni kao prvi lijek, iz skupine direktnih oralnih antikoagulansa (DOAK). Pripada skupini direktnih inhibitora trombina (DTI). Za sada, ujedno je i jedini DOAK iz skupine DTI lijekova. Uveden je u kliničku praksu 2008. godine s kliničkom indikacijom tromboprofilakse u bolesnika nakon ortopedskih operacija. Od 2011. do danas je i u kliničkoj primjeni kao profilaksa od nastanka tromboembolizma kod bolesnika s nevalvularnom atrijskom fibrilacijom (NVAF), a od 2014. godine počeo se primjenjivati i u liječenju bolesnika s dubokom venskom trombozom (DVT). Dabigatran je prvi DOAK lijek koji je 2021. godine dobio odobrenje Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *US Food and Drug Administration*, FDA) za primjenu kod djece starije od 8 godina u liječenju venske tromboembolije (VTE). Primjenjuje se u fiksnim dozama koje su ovisne o indikaciji, dobi bolesnika, bubrežnoj funkciji i indeksu tjelesne mase. Standardna doza lijeka za odraslu osobu je 2×150 mg. Kod djece primjenjena doza lijeka ovisi o težini djeteta, a najniža je 2×75 mg.

DIREKTNI INHIBITORI FXa

Prema antikoagulacijskom djelovanju, drugu skupinu čine lijekovi koji djeluju kao direktni inhibitori aktiviranog faktora zgrušavanja X (FXa), a obuhvaćaju nekoliko lijekova: rivaroksaban, apiksaban, edoksaban i najnoviji betriksaban koji za sada nije odobren u zemljama Europske Unije, pa time ni u Republici Hrvatskoj.

Rivaroksaban (*Xarelto®*, *Bayer Pharma AG*) je odobren 2008. godine od kada se primjenjuje kao tromboprofilaksa kod pacijenata nakon ortopedskih operacija. Od 2011. rivaroksaban je u kliničkoj primjeni i kao tromboprofilaksa kod bolesnika s NVAF te u liječenju DVT, a od 2012. godine i u liječenju plućne embolije (PE). Od 2013. godine rivaroksaban je indiciran i u tromboprofilaksi u akutnom koronarnom sindromu, a od 2020. odobren je za prevenciju i liječenje venske tromboembolije (VTE) i kod djece svih uzrasta. Uz navedeno, rivaroksaban se primjenjuje i kod osoba hospitaliziranih zbog druge akutne bolesti koja uzrokuje smanjenu pokretljivost, a kod kojih postoji visok rizik za nastanak VTE.

Danas je rivaroksaban u primjeni i u kombinaciji s inhibitorima agregacije trombocita kod bolesnika s koronarnom bolesti srca za prevenciju nastanka srčanog ili moždanog udara te kod bolesnika s perifernom arterijskom bolesti.

Primjenjena doza lijeka ovisi o indikaciji te o bubrežnoj funkciji. Standardne doze za odrasle osobe kreću se od $1 \times 2,5$ mg kod bolesnika koji ga uzimaju za prevenciju komplikacija kod periferne arterijske bolesti ili bolesti koronarnih arterija do 1×20 mg kod bolesnika sa NVAF te u liječenju VTE.

Kod bolesnika sa srednjim do teškim oštećenjem jetre primjena rivaroksabana nije preporučena.

Apiksaban (*Eliquis®*, *Bristol-Myers Squibb*) je drugi direktni inhibitor FXa koji je ušao u kliničku primjenu 2011. godine kao tromboprofilaksa nakon ortopedskih operacija, a od 2012. se koristi za prevenciju trombotičkih događaja kod pacijenata s NVAF. Od 2014. je u upotrebi za lijeчењe VTE, uključujući DVT i PE.

Apiksaban se primjenjuje u dozama od $2 \times 2,5$ ili $2 \times 5,0$ mg, ovisno o indikaciji, dobi, bubrežnoj funkciji i indeksu tjelesne mase, pa je prilagodbu doze potrebno učiniti kada se radi o bolesnicima starijima od 80 godina, smanjenoj bubrežnoj funkciji ili niskom indeksu tjelesne mase. Također, ne preporučuje se primjena kod bolesnika koji imaju srednji do visoki stupanj oštećenja jetre, a kontraindicirana je primjena kod hepatalne bolesti povezane s koagulopatijom.

Edoksaban (*Lixiana®*, *Savaysa®*, *Daiichi Sankyo; Roteas®*, *Berlin Chemie Menarin*) je odobren za kliničku primjenu 2015. godine. Primjenjuje se kao profilaksa kod bolesnika s NVAF za nastanak trombotičkih događaja, kod bolesnika s jednim ili više čimbenika rizika (visoki krvni tlak, dijabetes, srčano zatajenje, prethodno preboljeni moždani udar ili dob veća od 75 godina). Također se koristi za liječeњe i prevenciju ponovnog nastanka DVT i PE.

Primjenjuje se u dozi od 1×60 mg, ali se ona može prilagoditi ovisno o bubrežnoj funkciji, indeksu tjelesne mase ili istodobnoj primjeni drugih lijekova koji su inhibitori P-glikoproteina (P-gp).

Edoksaban se ne primjenjuje kod osoba koje akutno krvare, koje imaju hepatalne bolesti povezane s koagulopatijom, pate od nereguliranog

visokog krvnog tlaka ili imaju druge bolesti kod kojih postoji visok rizik za krvarenje.

INDIKACIJE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE LIJEKA

Radna grupa Međunarodnog savjeta za standardizaciju u hematologiji (engl. *International Council for Standardization in Hematology*, ICSH) izdala je preporuke koje potiču laboratorije na uvođenje testova za određivanje koncentracije DOAK lijekova u plazmi. Do danas nije prikupljeno dovoljno podataka da bi se određivanje koncentracije lijeka primjenjivalo u svrhu prilagodbe doze lijeka te se ono za sada u tu svrhu ne preporučuje.

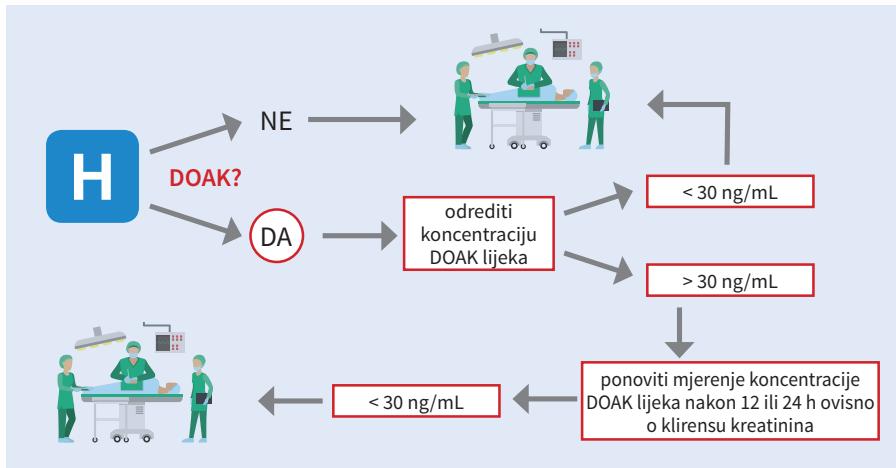
S druge strane, određivanje koncentracije lijeka u plazmi može biti izuzetno važno kod bolesnika kod kojih postoji mogućnost prevelike akumulacije lijeka u cirkulaciji ili njegove ubrzane eliminacije. Oba su slučaja nepovoljna za bolesnika jer mogu dovesti ili do krvarenja (kod akumulacije lijeka zbog oštećene bubrežne ili jetrene funkcije) ili do smanjenog antikoagulacijskog učinka (kod ubrzane eliminacije lijeka). U takvim slučajevima se strogo preporučuje mjerjenje koncentracije DOAK lijeka u plazmi.

Isto tako, postoje određena hitna stanja kod kojih je izuzetno važno izmjeriti koncentraciju lijeka i nalaz izdati u roku od 30, odnosno 60 minuta, ovisno o kliničkoj indikaciji. Uz to, postoje i situacije u ne-hitnim stanjima kada je klinički opravданo izmjeriti koncentraciju lijeka u plazmi.

Indikacije za određivanje koncentracije DOAK lijeka u plazmi prikazane su u Tablici 1., a postupak s bolesnikom liječenim DOAK lijekom prije hitnog invazivnog zahvata prikazan je na Slici 1.

Tablica 1. Indikacije za određivanje DOAK lijeka u plazmi.

Indikacija	Objašnjenje
Hitna stanja	
akutno krvarenje tromboembolijski događaj (moždani udar) hitni invazivni zahvat s povećanim rizikom za krvarenje	<p>Podatak o koncentraciji lijeka u plazmi pruža informaciju o mogućem uzroku krvarenja, primjerice zbog visoke koncentracije lijeka.</p> <p>Mjerenjem koncentracije lijeka u plazmi procjenjuje se učinak lijeka na akutni događaj (kod akutnog krvarenja) ili utjecaj koncentracije lijeka u plazmi na dodatni rizik za krvarenje (kod hitnih invazivnih zahvata). Klinički značajnom smatra se koncentracija lijeka u plazmi $> 30 \text{ ng/mL}$, odnosno $> 50 \text{ ng/mL}$ kod bolesnika koji krvare.</p> <p>Također, koncentraciju lijeka potrebno je izmjeriti i nakon primjene lijeka koji neutralizira učinak DOAK-a (antidota) da bi se utvrdila uspješnost terapije.</p>
Ne-hitna stanja	
visoka životna dob (> 80 god.)	Povećana sklonost krvarenju i povećana sklonost akumulaciji lijeka u cirkulaciji (zbog veće učestalosti smanjene bubrežne i jetrene funkcije) što povećava rizik krvarenja
teško bubrežno oštećenje	Uslijed smanjenog izlučivanja lijeka putem bubrega akumulira se lijek u cirkulaciji i povećava rizika od krvarenja. Posebno je značajno određivati koncentracije dabigatrana i rivaroksabana zbog prilagodbe doze ili promjene lijeka ako se utvrdi akumulacija lijeka u cirkulaciji.
indeks tjelesne mase (BMI) $> 40 \text{ kg/m}^2$	Za osobe s BMI $> 40 \text{ kg/m}^2$ još uvijek nisu dostupni nedvojbeni podaci postiže li se zadovoljavajući terapijski raspon primjenom standardnih doza lijeka
preoperativno (kada je kod planiranog zahvata povećan rizik za krvarenje)	Kod bolesnika koji će biti podvrnuti operacijskom zahvatu visokog rizika od krvarenja preporučuje se potpuna eliminacija lijeka iz cirkulacije zbog sigurnosti za pacijenta
interakcije s drugim lijekovima	Kod bolesnika koji primaju više lijekova a za koje su poznate ili još nisu dokazane interakcije s DOAK lijekovima, postoji mogućnost smanjenog ili pojačanog učinka DOAK lijeka te se mjerenjem njegove koncentracije procjenjuje rizik od akumulacije ili neučinkovitosti lijek



Slika 1. Postupak s bolesnikom na terapiji DOAK lijekom prije hitnog invazivnog zahvata.

LIJEKOVI KOJI NEUTRALIZIRAJU UČINAK DOAK LIJEKOVA (ANTIDOTI)

Idarucizumab (*Praxbind[®], Behringher Ingelheim*) je indiciran za primjenu kod bolesnika na terapiji dabigatranom prije hitnih operativnih ili drugih invazivnih zahvata te kod bolesnika kod kojih je prisutno po život opasno ili nekontrolirano akutno krvarenje. Idarucizumab je fragment humaniziranog monoklonskog protutijela i ima vrlo visok afinitet vezanja za dabigatran (300x viši od trombina).

Idarucizumab se primjenjuje u dozi od 5 g intravenski, a neutralizirajući učinak je trenutan. Bolesnik postiže normalnu hemostazu za 4 sata. Za sada nisu poznate kontraindikacije.

Andeksanet alfa (*Ondexxya[®], AstraZeneca*) je prvi i trenutno jedini uvjetno odobreni lijek od strane Europske medicinske agencije (engl. *European Medical Agency, EMA*) 2019. godine, koji neutralizira antikoagulacijski učinak direktnih inhibitora FXa (rivaroksabana i apiksabana). Isto kao i idarucizumab, primjenjuje se kod bolesnika koji moraju biti hitno podvrgnuti operativnom ili drugom invazivnom zahvatu te kod životno ugrožavajućih ili nekontroliranih akutnih krvarenja.

Primjenjuje se kao intravenski bolus uz infuziju sljedećih 120 minuta, a doza je ovisna o dozi DOAK-a koju bolesnik uzima kao i o vremenu proteklom od prethodne uzete doze lijeka. Neutralizirajući učinak na rivaroksaban i apiksaban postiže se 2 - 5 minuta nakon primjene bolusa, a potpuna normalizacija hemostaze u bolesnika za 12 sati.

FARMAKOLOŠKA SVOJSTVA DOAK LIJEKOVA

Primjena DOAK-a kao nove generacije lijekova u prevenciji i liječenju tromboembolijskih stanja u kontinuiranom je porastu tijekom posljednjih desetak godina. Prema mehanizmu antikoagulacijskog djelovanja, DOAK lijekovi dijele se u dvije skupine: direktni inhibitori trombina (dabigatran) i izravni inhibitori Fxa (rivaroksaban, apiksaban, edoksaban i betriksaban).

U usporedbi s varfarinom koji djeluje kao antagonist vitamina K (engl. *vitamin K antagonists*, VKA), DOAK lijekovi imaju znatno brži početak i prestanak terapijskog djelovanja, bolja farmakokinetička i farmakodinamička svojstva, primjenjuju se u fiksnoj dnevnoj dozi te ne zahtijevaju rutinsko laboratorijsko praćenje. Nakon oralne primjene, DOAK lijekovi brzo se apsorbiraju i imaju relativno kratko poluvrijeme života (5 - 20 sati). Ključne interakcije s drugim lijekovima (lijek-lijek interakcije) posredovane su uglavnom P-gp-om kao prijenosnikom (dabigatran), odnosno CYP3A4 enzimom i P-gp-om (rivaroksaban, apiksaban, edoksaban). Farmakološka svojstva pojedinih DOAK lijekova prikazana su u Tablici 2, a klinički značajne interakcije DOAK-a s drugim lijekovima navedene su u Tablici 3.

Direktni inhibitor trombina

Dabigatran (*Pradaxa[®], Boehringer Ingelheim*) ostvaruje antikoagulacijski učinak kao kompetitivni i irreverzibilni direktni inhibitor trombina (aktivirani faktor zgrušavanja II, FIIa). Lijek se veže za aktivno mjesto trombina slobodnog u cirkuaciji kao i na trombin vezan u ugrušku (trombu) i na taj način sprječava pretvorbu fibrinogena u fibrin. Primjenjuje se oralno kao esterski inaktivni proliječni dabigatran eteksilat (DABE) koji nakon apsorpcije prolazi kroz dva uzastopna koraka aktivacije karboksilazama (CES) u crijevima i jetri kako bi nastao farmakološki aktivni metabolit dabigatran (DAB). U prvom koraku DABE se pomoću crijevne karboksilesteraze 2 (CES2) prevodi u intermedijarni metabolit dabigatran etil ester (M2), koji dalje prelazi u konačni aktivni metabolit DAB pomoću jetrene karboksilesteraze 1 (CES1). Dabigatran se primjenjuje u fiksnim dozama ovisno o kliničkoj indikaciji, dobi i funkciji bubrega dva puta dnevno pri liječenju NVAF i VTE, a iznimno jednom dnevno u tromboprofilaksi (nakon ugradnje proteze koljena ili kuka u bolesnika s bubrežnim zatajenjem (klirens kreatinina (ClCr) 30 - 50 mL/min)) ili onih starijih od 75 godina te uz istodobnu primjenu P-gp inhibitora. Bioraspoloživost dabigatrana je oko 7 %. Na apsorpciju lijeka ne utječe hrana. Dabigatran se vrlo malo (5 – 8 %) apsorbira iz probavnog trakta jer ima visok afinitet za P-gp. Od svih DOAK lijekova dabigatran se najmanje veže na proteine plazme (35 %), pa je jedini lijek koji se iz cirkulacije može ukloniti hemodializom. Oko 20 % apsorbiranog dabigatrana metabolizira se u jetri konjugacijom u acil-glukoronide koji su također aktivni metaboliti dabigatrana.

Maksimalnu koncentraciju u cirkulaciji dabigatran postiže za oko 2 sata (1 - 3 sata) nakon oralne primjene. Stabilne koncentracije lijeka u plazmi postižu se unutar 3 dana od početka primjene lijeka.

Do 80 % cirkulirajućeg dabigatrana izlučuje se putem bubrega, a neapsorbirani lijek izlučuje se fecesom. S obzirom na vrlo visok udio lijeka koji se izlučuje putem bubrega i poluživot lijeka u cirkulaciji, doziranje lijeka ovisi o bubrežnoj funkciji. Prosječno poluvrijeme eliminacije u osobe s urednom funkcijom bubrega iznosi 12 - 14 sati, a produžuje se čak do 35 sati u bolesnika s bubrežnom insuficijencijom razmjerno težini bubrežne bolesti. U bolesnika liječenih dabigatranom koji imaju bubrežnu insuficijenciju treba pratiti bubrežnu funkciju jer je kod teških oštećenja bubrega ($\text{CrCl} < 30 \text{ mL/min}$) primjena dabigatrana kontraindicirana. Kod bolesnika s umjerenom bubrežnom insuficijencijom ($\text{CrCl} 30 - 50 \text{ mL/min}$) potrebno je primijeniti manje doze lijeka.

Dabigatran eteksilat ne metabolizira se enzimskim sustavom citokroma P450 (CYP450), ali je supstrat za P-gp. P-gp je o adenosin-trifosfatu (ATP-u) ovisan prijenosnik uključen u transport molekula substrata kroz membranu stanica koje ga izražavaju. Budući da se dabigatran eteksilat brzo prevodi u svoj aktivni oblik koji nije substrat za P-gp, interakcije s P-gp-om odvijaju se samo u gastrointestinalnom traktu. P-gp je izražen u različitim tkivima, a osobito u tankom crijevu i bubregu pa ima važnu ulogu u farmakokineticu dabigatran eteksilata. Stoga, istodobna primjena snažnih inhibitora P-gp (Tablica 3) može značajno povećati koncentraciju dabigatrana u plazmi zbog pojačanog transporta lijeka kroz membranu, povećane apsorpcije i smanjene ekskrecije, a to u konačnici može povećati rizik od neželjenih učinaka dabigatrana, u prvom redu od krvarenja. Također, istodobnu primjenu potrebno je izbjegavati i s induktorima P-gp-a jer ovi lijekovi mogu utjecati na smanjenje koncentracije dabigatrana u cirkulaciji, i time umanjiti njegov antikoagulacijski učinak.

Dabigatran nije supstrat, inhibitor ili induktor citokroma CYP450 pa nema klinički značajnih interakcija s lijekovima koji se metaboliziraju ovim putem.

Direktni inhibitori FXa

DOAK lijekovi ove skupine inhibiraju slobodni FXa kao i onaj vezan u kompleksu protrombinaze te FXa vezan u patološkom ugrušku (trombu). Imaju bolju oralnu bioraspoloživost u odnosu na dabigatran (47 – 66 % ovisno o lijeku). Hrana povećava apsorpciju, odnosno bioraspoloživost rivaroksabana, a nema značajan utjecaj na ostale lijekove iz ove skupine. Primjenjuju se u fiksnoj oralnoj dozijednom dnevno, uz izuzetak apiksabana koji se uzima dva puta dnevno. Za razliku od dabigatrana, DOAK lijekovi iz skupine direktnih inhibitora FXa nisu prolijekovi, već se uzimaju kao aktivni oblik lijeka. Maksimalnu koncentraciju u plazmi postižu 1 - 4 sata nakon primjene lijeka. Poluvrijeme života u cirkulaciji je 5 - 12 sati uz izuzetak betriksabana (19 - 25 sati). Direktni inhibitori FXa imaju niži bubrežni klirens u odnosu na dabigatran te se u manjoj mjeri (25 - 66 % doze ovisno o lijeku) izlučuju putem bubrega. Ostali putovi eliminacije iz organizma vezani su za hepatički metabolizam, bilijarnu i crijevnu eliminaciju. Lijekovi ove skupine vežu se na proteine plazme u znatno većoj mjeri u odnosu na dabigatran te se iz cirkulacije ne mogu ukloniti hemodializom.

Rivaroksaban i apiksaban metaboliziraju se citokromom P450, izoenzimima CYP3A4 i CYP3A5, dok se edoksaban minimalno, a betriksaban uopće ne metabolizira ovim enzimskim sustavom. Nadalje, svi DOAK lijekovi iz ove skupine substrati su za P-gp. Stoga, istodobna primjena drugih lijekova koji koriste navedene metaboličke puteve, odnosno CYP450 enzimski sustav i/ili P-gp, može izravno utjecati na koncentraciju pojedinih lijekova ove skupine, odnosno na njihovo antikoagulacijsko djelovanje i neželjene učinke lijeka.

Rivaroksaban

Rivaroksaban (Xarelto[®], Bayer) se nakon oralne primjene brzo apsorbira te mu je bioraspoloživost 66 % ako se uzima bez hrane, a povećava se na > 80 % kada se lijek uzima s hranom, pa se preporučuje uzimanje lijeka uz obrok. Najviša koncentracija u plazmi postiže se 2 - 4 sata nakon primjene. U cirkulaciji je čak 90 - 95% lijeka vezano na proteine plazme, uglavnom na albumin. Rivaroksaban se najvećim dijelom (dvije trećine uzete doze lijeka) metabolizira citokromom P450, izoenzimima CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8 i CYP2J2, a manjim dijelom i mehanizmima neovisnim o CYP450 te je supstrat za prijenosnike P-gp i BRCP (engl. *Breast Cancer Resistance Protein, BRCP*). Metaboličkim putevima nastaje 18 različitih neaktivnih metabolita koji se potom podjednako eliminiraju urinom i fecesom. Od svih DOAK lijekova iz skupine inhibitora FXa, rivaroksaban se u najvećoj mjeri izlučuje urinom (oko 66 %), od čega oko jedna trećina u nepromijenjenom obliku, a ostalo u obliku inaktivnih metabolita. Poluvrijeme života rivaroksabana u cirkulaciji je 6 - 9 sati, a do 13 sati u starijoj životnoj dobi (> 70 godina). Inter-individualna varijabilnost koncentracija rivaroksabana iznosi između 30 i 40 %.

Interakcije rivaroksabana s drugim lijekovima posredovane su CYP450 enzimima te P-gp i BRCP prijenosnicima. Istdobna primjena lijekova koji su snažni inhibitori CYP3A4, CYP3A5 i/ili P-gp i BRCP (Tablica 3) može utjecati na porast koncentracije rivaroksabana u cirkulaciji i time povećati rizik od krvarenja, pa snažne inhibitory CYP450 enzima i P-gp/BRCP treba izbjegavati u kombinaciji s rivaroksabanom. Prema rezultatima dosadašnjih ispitivanja, lijekovi koji su umjereni inhibitori CYP450 i P-gp mogu se primjenjivati u kombinaciji s rivaroksabanom jer za njih nije utvrđen značajan klinički utjecaj. Primjena lijekova koji su snažni induktori izoenzima CYP3A4, CYP3A5 i/ili P-gp može rezultirati smanjenjem koncentracije rivaroksabana u plazmi pa ih treba izbjegavati u kombinaciji s

rivaroksabanom. Također, potrebno je izbjegavati biljne pripravke i dodatke prehrani s antitrombocitnim /ili antikoagulananim djelovanjem (Tablica 3).

Apiksaban

Apiksaban (*Eliquis[®], Pfizer, Bristol-Myers Squibb*) je direktni oralni inhibitor FXa na koji, kao i rivaroksaban, ima reverzibilan i vrlo selektivan inhibicijski učinak. Bioraspoloživost apiksabana je 50 %, a maksimalnu koncentraciju u cirkulaciji postiže unutar 3 sata (1 - 3 sata) nakon uzimanja lijeka. Kao i rivaroksaban, i apiksaban se u cirkulaciji značajno veže na proteine plazme (87 %). Za razliku od rivaroksabana, hrana ne utječe na bioraspoloživost apiksabana. Nakon oralne primjene, nepromijenjeni apiksaban je glavna aktivna komponenta u plazmi bez prisutnosti aktivnih cirkulirajućih metabolita. Eliminira se iz organizma u znatno manjoj mjeri putem bubrega (25 %) i to u nepromijenjenom obliku, dok se ostatak lijeka i inaktivnih metablita izlučuje fecesom (56 %). Poluživot apiksabana u cirkulaciji iznosi prosječno 12 sati. Intra-individualna varijabilnost je 20 %, a inter-individualna varijabilnost 30 %.

Apiksaban se transportira putem P-gp i BCRP prijenosnika. Metabolički putevi apiksabana uključuju o-demetilaciju, hidroksilaciju i sulfataciju hidroksiliranog o-demetylapiksabana. Lijek se metabolizira u jetri prvenstveno putem CYP3A4 i CYP3A5 izoenzima, uz znatno manji doprinos ostalih izoenzima (CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19) te sulfotrasferazama SULT1A1 i SULT1A2. Interakcije s drugim lijekovima javljaju pri istodobnoj primjeni lijekova koji su snažni inhibitori ili induktori CYP3A4 i CYP3A5 i/ili P-gp (Tablica 3). Lijekovi koji su snažni inhibitori ovih izoenzima/prijenosnika povećavaju koncentraciju apiksabana u plazmi čak dvostruko. Suprotno, istodobna primjena snažnih induktora CYP3A4, CYP3A5 i/ili P-gp i apiksabana može rezultirati smanjenom koncentracijom apiksabana u plazmi. Umjereni inhibitori CYP3A4 i P-gp mogu se uzimati

istodobno s apiksabanom budući da nije utvrđen utjecaj varijabilnosti koncentracije na klinički učinak lijeka.

Edoksaban

Edoksaban (*Lixiana*[®], *Daiichi-Sankyo*) je noviji lijek iz skupine inhibitora FXa. Bioraspoloživost mu je oko 60 %, a hrana nema utjecaja na apsorpciju edoksabana. Najveća koncentracija u plazmi postiže se unutar 1 - 2 sata od uzimanja lijeka, a poluživot u cirkulaciji iznosi 8 - 10 sati. Oko 60 % lijeka u cirkulaciji veže se na proteine plazme (značajno manje u odnosu na rivaroksaban i apiksaban). Oko 35 % apsorbirane doze lijeka izlučuje se kao nepromijenjena frakcija bubregom, a ostatak se izlučuje fecesom.

Za razliku od rivaroksabana i apiksabana, edoksaban se vrlo malo (do 10 %) metabolizira pomoću CYP450 enzimskog sustava, već su u metabolismu uključeni izoenzimi jetrene karboksiesteraze (CES1), a u manjoj mjeri CYP3A4 i CYP3A5 te glukuronidacija pri čemu nastaju tri aktivna metabolita. Metaboliti M1 i M4 nastaju hidrolizom edoksabana uz djelovanje CES1, dok M6 nastaje djelovanjem CYP3A4 i CYP3A5 izoenzima. S obzirom da u metabolizmu edoksabana enzimi CYP sustava nisu značajno zastupljeni, interakcije s lijekovima koji su induktori ili inhibitori CYP3A4 i CYP3A5 nemaju klinički značajan utjecaj na koncentracije edoksabana u cirkulaciji.

Edoksaban je substrat za P-gp, pa su interakcije edoksabana prisutne pri istodobnoj primjeni snažnih i umjerenih induktora ili inhibitora P-gp (Tablica 3). Istodobna primjena snažnih P-gp inhibitora može povećati koncentraciju edoksabana u cirkulaciji za oko 1,5 do 2 puta.

Visoke doze acetilsalicilne kiseline (325 mg) u kombinaciji s edoksabanom povećavaju vršnu koncentraciju edoksabana jer smanjuju

njegovo izlučivanje putem bubrega, dok uobičajene doze od 100 mg za antiagregacijsku terapiju ne mijenjaju učinak ni koncentraciju edoksabana.

Betriksaban

Betriksaban (*Bevyxxa[®], Portola Pharmaceuticals*) je najnoviji lijek iz skupine direktnih oralnih inhibitora FXa. Za sada je lijek odobrila samo FDA, dok u Europi, a time i u Hrvatskoj još nije u kliničkoj primjeni. Bioraspoloživost betriksabana je oko 47 %. Budući da nije dokazano da hrana značajno utječe na apsorpciju, odnosno na bioraspoloživost lijeka, preporučuje se uzimanje lijeka uz obrok u svrhu smanjenja intra-individualne varijabilnosti koncentracije u plazmi. Oko 60 % apsorbirane doze lijeka u cirkulaciji se veže na proteine plazme. Najveća koncentracija postiže se 3 - 4 sata nakon uzimanja lijeka, a poluvrijeme eliminacije iz plazme dulje je u odnosu na ostale DOAK lijekove iz ove skupine te iznosi oko 20 sati (19 - 25 sati). Lijek se najvećim dijelom u nepromijenjenom obliku izlučuje putem žuči, odnosno fecesom (85 %), dok se putem bubrega eliminira samo oko 17 % lijeka.

Za razliku od ostalih direktnih inhititora FXa (rivaroksabana i apiksabana), betriksaban se minimalno (< 1 %) metabolizira CYP450 enzimskim sustavom pa istodobna primjena lijekova koji se metaboliziraju ovim putem nema utjecaja na koncentraciju lijeka u plazmi, što značajno smanjuje pojavnost interakcije s drugim lijekovima. Nakon apsorpcije lijek se prevodi u dva glavna inaktivna metabolita hidrolizom neovisnom o CYP450 enzimskom sustavu. Betriksaban je substrat za P-gp pa istodobna primjena snažnih P-gp inhibitora ili induktora utječe na koncentraciju lijeka u plazmi. Snažni inhibitori P-gp povećavaju koncentraciju, a induktori smanjuju koncentraciju betriksabana u plazmi. Osobito je značajan utjecaj snažnih inhibitora P-gp koji pri istodobnoj primjeni s betriksabanom mogu povećati njegovu koncentraciju u plazmi 2,5 do 5 puta.

Tablica 2. Farmakološka svojstva DOAK-a.

DOAK lijek					
Svojstva DOAK lijeka	Dabigatran	Rivaroksaban	Apiksaban	Edoksaban	Betriksaban
Mehanizam djelovanja	inhibicija FIIa (trombina)	inhibicija FXa	inhibicija FXa	inhibicija FXa	inhibicija FXa
Bioraspoloživost (%)	7	66 (bez hrane) >80 (s hranom)	50	62	47
Vrijeme postizanja vršne koncentracije u plazmi (sati)	1 - 3	2 - 4	1 - 3	1 - 2	3 - 4
Poluvrijeme eliminacije (sati)	12 - 17*	5 - 9 (odrasle osobe); 11 - 13* (> 70 god.)	12	8 - 10	19 - 25
Doziranje (mg)	2 × 75, 110 i 150 mg ili 1 × 75, 110 i 150 mg***	1 × 10, 15 i 20 mg**	1 × 2,5 i 5 mg	1 × 30 i 60 mg	1 × 40 i 80 mg
Vezanje na protein plazme (%)	35	90	87	60	60
Aktivni metaboliti	acil-glukuronidi	nema	nema	nema	nema
Metabolizam CYP450	ne	da	da	<10 %	ne
P-gp transport	da	da	da	da	da
Metabolizam BCRP	ne	da	da	ne	ne
Eliminacija lijeka (%)					
bubregom	80	66	25	35	17
fecesom	20	33	75	65	80 (ostalo biliarni sustav)
Uzimanje s hranom	ne	da**	ne	ne	da****

*u starijih osoba (>70 god.) vrijeme eliminacije može biti produženo i do 13 sati za rivaroksaban i do 24 sata za dabigatran; **uzimanje lijeka u dozi od 15 i 20 mg uz obrok poboljšava apsorpciju lijeka; ***tromboprofilaksa u nekih bolesnika (vidi Farmakološka svojstva DOAK lijekova, Direktni inhibitor trombina); ****doprinosi manjoj intra-individualnoj varijabilnosti koncentracija u cirkulaciji

Tablica 3. Interakcije DOAK-a s drugim lijekovima koji se transportiraju ili metaboliziraju istim metaboličkim putevima: P-gp transporterom i CYP3A4 enzimom.

DOAK lijek					
Farmako-kinetički čimbenici	Dabigatran	Rivaroksaban	Apiksaban	Edoksaban	Betriksaban
CYP3A4 inhibitori	NP	antimikotici: ketokonazol itrakonazol vorikonazol i posakonazol inhibitori HIV proteaza: ritonavir konivaptan Jaki inhibitori CYP3A4: atazanavir ceritinib klaritromicin kobicistat darunavir lopinavir nefazodin tukatinib telitromicin imatinib krizotinib	antimikotici: ketokonazol itrakonazol vorikonazol posakonazol inhibitori HIV proteaza: ritonavir klaritromicin	NP	NP
CYP3A4 induktori	NP	rifampicin fenitojn karbamazepin fenobarbital gospina trava midazolam atorvastatin apalutamid Lumakaftor-ivakaftor	rifampicin fenitojn karbamazepin fenobarbital gospina trava	NP	NP
P-gp inhibitori	kinidin ketokonazol verapamil amiodaron itrakonazol dronedaron klaritromicin tikagrelor ciklosporin takrolimus imatinib glekapeprevir/ pibrentasvir	antimikotici: ketokonazol, itrakonazol vorikonazol i posakonazol konivaptan inhibitori HIV proteaza: ritonavir imatinib krizotinib	antimikotici: ketokonazol itrakonazol vorikonazol i posakonazol inhibitori HIV proteaza: ritonavir imatinib krizotinib	ciklosporin eritromicin dronedaron ketokonazol kinidin verapamil amiodaron imatinib krizotinib	amiodarone kinidin verapamil
P-gp induktori	rifampicin karbamazepin fenitojn deksametazon gospina trava	rifampicin atorvastatin digoksin deksametazon	rifampicin fenitojn karbamazepin fenobarbital deksametazon gospina trava	rifampicin fenitojn karbamazepin fenobarbital deksametazon gospina trava	erdafitinib lasmiditan

CYP3A4 – citokrom 450 3A4; P-gp – P glikoprotein; NP – nije primjenjivo (do sada nisu utvrđene interakcije)

FARMAKOGENETIKA DOAK LIJEKOVA

Farmakogenomika DOAK lijekova novo je područje istraživanja radi ispitivanja potencijalne uloge genetskih čimbenika u inter-individualnoj varijabilnosti DOAK lijekova i posljedičnom učinku na ishod liječenja. Naime, unatoč predvidivoj farmakokineticici i farmakodinamici te širokom terapijskom rasponu, DOAK lijekovi pokazuju značajnu inter-individualnu varijabilnost koncentracija u plazmi koja može rezultirati različitim odgovorom na liječenje, odnosno pojavom neželjenih učinaka lijeka (krvarenje ili tromboembolijski događaji). Osim čimbenika kao što su dob, spol, rasa, pušenje ili prehrana koji mogu doprinositi inter-individualnoj varijabilnosti DOAK lijekova, dosadašnja ispitivanja upućuju i na potencijalni utjecaj genskih varijanti i interakcija s drugim lijekovima kao važnim čimbenicima inter-individualne varijabilnosti. Utjecaj genskih varijanti povezan je s polimorfizmima gena koji kodiraju proteine odgovorne za aktivaciju, transport ili metabolizam DOAK lijekova (Tablica 4). Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja, gen-lijek interakcije najčešće su posredovane genima CES1, ABCB1 i CYP3A4, odnosno polimorfizmima jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism, SNP*) ovih gena. Iako se pojedine polimorfne varijante gena kandidata povezuju s razlikama u vršnim i/ili minimalnim koncentracijama u plazmi, povezanost varijabilnosti koncentracija sa neželjenim učincima liječenja još je uvijek slabo ispitana i nejasna. Primjerice, do danas nije utvrđena povezanost povećanog rizika za krvarenje i određenog polimorfizma

gena uključenih u metabolizam DOAK lijekova. Jedino istraživanje koje upućuje na kliničku korisnost genotipizacije polimorfizama gena za DOAK lijekove odnosi se na jedan polimorfizam CES1 gena u bolesnika liječenih dabigatranom. Ostala istraživanja koja su uključivala ispitivane polimorfizme navedenih gena za sada ne zadovoljavaju kriterije za implementaciju u kliničkoj praksi. Drugim riječima, na temelju dosadašnjih rezultata istraživanja povezanosti farmakogenetike i ishoda liječenja nije moguće dati preporuke za farmakogenetsko testiranje DOAK lijekova. Za razliku od lijekova iz skupine antagonista vitamina K (VKA), za koje temeljem provedenih opsežnih farmakogenetskih testiranja postoje algoritmi doziranja povezani s genotipom bolesnika, za DOAK lijekove tek je potrebno provesti opsežne prospektivne kliničke studije. Dakle, nije zadovoljen osnovni preduvjet za utvrđivanje potencijalne kliničke korisnosti genotipizacije polimorfizama prije početka liječenja odgovarajućim DOAK lijekom. Razumijevanje utjecaja genskih varijanti na liječenje DOAK lijekovima moglo bi pridonijeti individualizaciji terapije s obzirom na vrstu i dozu lijeka, temeljenoj na specifičnim genskim varijantama svakog bolesnika kako bi se poboljšala učinkovitost i sigurnost liječenja. Naime, osnovni cilj primjene farmakogenetičkog testiranja za DOAK lijekove jest odabir najprikladnijeg lijeka za pojedinog bolesnika s najmanjim rizikom za varijabilnost koncentracija u plazmi i neželjene učinke liječenja. Pri interpretaciji varijabilnosti koncentracija lijeka i posljedične antikoagulantne učinkovitosti treba uzeti u obzir i moguću povezanost poznatih genskih varijanti s drugim, za sada još nepoznatim genskim varijantama. Uz to, osim do sada utvrđenih genskih varijanti, i drugi čimbenici, kao što su rijetke mutacije, epigenetski mehanizmi, metilacija DNA i okolišni čimbenici moraju se razmotriti kao potencijalni čimbenici inter-individualne varijabilnosti DOAK lijekova.

Tablica 4. Geni koji kodiraju proteine uključene u aktivaciju, transport i metabolizam DOAK lijekova.

DOAK	Aktivacija	Transport	Metabolizam
Dabigatran	CES1, CES2	ABCB1	UGT1A9, UGT2B7, UGT2B15
Rivaroksaban	-	ABCB1, ABCG2	CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8, CYP2J2, BCRP
Apiksaban	-	ABCB1, ABCG2	CYP3A4, CYP3A5, CYP1A2, CYP2J2 SULT1A1
Edoksaban	-	ABCB1, SLCO1B1	CES1, CYP3A4, CYP3A5
Betriksaban	-	ABCB1	Hidroliza neovisna o CYP450

ABCB1: o ATP-u ovisan prijenosnik potporodice B 1 (engl. *ATP-binding cassette sub-family B member 1*), također poznat kao MDR1 i P-glikoprotein; ABCG2: o ATP-u ovisan prijenosnik potporodice G 2 (engl. *ATP-binding cassette sub-family G member 2*), također poznat kao BCRP; CES: karboksiesteraza (engl. *carboxylesterase*); CYP: natporodica metaboličkih enzima citokroma P450 (engl. *Cytochrome P450*); SLCO1B1: porodica topljivih organskih anionskih transporter (engl. *Solute carrier organic anion transporter family, member 1B1*); UGT: UDP-glukuroniltransferaza (engl. *UDP-glucuronyltransferase*); SULT1A1: sulfotransferaza 1A1 (engl. *sulfotransferase 1A1*).

Farmakogenetika dabigatrana

Polimorfizmi CES1 i ABCB1 gena uključeni u aktivaciju i transport dabigatrana do sada su najčešće dokumentirane genske varijante koje doprinose promjenama u vršnoj i minimalnoj koncentraciji lijeka u plazmi.

Aktivacijski CES1 i CES2 enzimi (kodirani genima na 16. kromosomu) su karboksilesteraze koje hidroliziraju različite ksenobiotike i endogene substrate. Aktivacija dabigatran eteksilata u aktivni dabigatran znatno više ovisi o aktivnosti CES1 enzima u odnosu na CES2. Genske varijante za jetreni karboksilazu (CES1) koja katalizira pretvorbu M2 metabolita (intermedijarni metabolit koji nastaje djelovanjem crijevne karboksilaze CES2 na dabigatran eteksilat) u aktivni oblik dabigatrana utječe na farmakokinetiku dabigatrana. Kod ljudi, CES1 izoforma enzima je osim u jetri izražena i u crijevima te je do sada opisano oko 2000 polimorfizama. Za tri SNP polimorfizma do sada je utvrđena povezanost s farmakokinetičkim svojstvima dabigatrana, među kojima je i polimorfizam koji rezultira smanjenjem funkcije CES1 enzima te posljedično usporenim metabolizmom dabigatrana i njegovih metabolita (M1 i M2).

Za polimorfizme CES1 utvrđena je povezanost sa smanjenom koncentracijom dabigatrana u plazmi, što u liječenih bolesnika smanjuje i rizik od krvarenja (rizik je 15 % manji kod heterozigota i 28 % kod homozigota), dok istodobno nema povezanosti s povećanim rizikom za tromboembolijske događaje. Naime, pokazalo se da je kod bolesnika s visokom minimalnom koncentracijom dabigatrana rizik za krvarenje veći u odnosu na bolesnike s visokim vršnim koncentracijama dabigatrana. Niže minimalne koncentracije lijeka osiguravaju stvaranje privremenog stabilnijeg hemostatskog ugruška na mjestu ozljede krvne žile, čime se izravno smanjuje i rizik od krvarenja u slučaju ozljede bolesnika liječenog

dabigatranom. S obzirom da CES1 genski lokus ima više od 2000 genskih varijanti, istraživani su i drugi polimorfizmi i njihov potencijalni učinak na minimalne i vršne koncentracije dabigatrana. Pokazano je da je jedan od SNP polimorfizama povezan s varijabilnošću i vršnih i minimalnih koncentracija u smjeru povećanih vrijednosti, ali bez kliničkog utjecaja na rizik od krvarenja.

Osim polimorfizama CES1 gena i spol se pokazao čimbenikom koji može doprinositi varijabilnosti u farmakokinetici dabigatrana jer je aktivnost CES1 enzima u jetri žena značajno veća u odnosu na muškarce, što može imati izravan utjecaj metabolizam lijeka.

Na bioraspoloživost dabigatrana utječe i ABCB1 gen koji kodira prijenosnik P-gp ovisan o ATP-u. ABCB1 gen se nalazi na kromosomu 7 i do sada je opisano više od 1000 različitih polimorfnih varijanti od kojih su 4 najčešće. Među njima je za dva pokazana povezanost s povećanom vršnom koncentracijom dabigatrana u cirkulaciji. Najvažnijom genskom varijantom ABCB1 smatra se polimorfizam za koji je pokazana povezanost sa značajno povećanim vršnim koncentracijama dabigatrana i posljedično povećanim rizikom za krvarenje. Otkrivena je i druga polimorfna varijanta također povezana s povećanim vršnim koncentracijama dabigatrana za 12 %, ali bez povećanog rizika za krvarenje.

Uz navedene genske varijante enzima CES1 i ABCB1 koje mogu utjecati na biotransformaciju dabigatran eteksilata i učinkovitost aktivnog oblika dabigatrana, u metabolizmu tj. eliminaciji dabigatrana sudjeluju i glukuronidacijski enzimi UGT1A9, UGT2B7, UGT2B15. Smatra se da njihova aktivnost može imati utjecaj, u ovom slučaju, na sigurnost primjene dabigatrana. Među navedenim, najvažniji enzim za eliminaciju dabigatrana je UGT2B15 pa je pri primjeni dabigatrana važno voditi računa o mogućoj

interakciji s lijekovima koji se metaboliziraju ovim enzimom (acetaminofen, lorazepam, oksazepam, morfin, valproična kiselina). Kompetitivnom interakcijom s enzimom UGT2B15 ovi lijekovi mogu usporiti metabolizam dabigatrana i time povećati njegovu koncentraciju u cirkulaciji, a time povećati rizik od krvarenja. Međutim, utjecaj polimorfizama UGT gena na koncentraciju dabigatrana do sada nije ispitivan. O mogućem utjecaju polimorfizama UGT2B15 gena na interindividualnu varijabilnost u eliminaciji dabigatrana za sada se raspravlja isključivo na teoretskoj razini uz pretpostavku da bi polimorfizmi ovog gena mogli utjecati na brzinu i intenzitet glukoronidacije i time i na varijabilnost u eliminaciji lijeka. Međutim, budući da navedeni UGT geni nisu uključeni u stvaranje aktivnih metabolita, ne očekuje se klinički značajan utjecaj na koncentraciju dabigatrana u cirkulaciji.

Farmakogenetika rivaroksabana

ABCB1 i ABCG2 geni uključeni su u transport rivaroksabana pa je moguće očekivati da promjene nukleotida u ovim genima utječu na koncentraciju rivaroksabana (i apiksabana) u cirkulaciji. Dosadašnja ispitivanja polimorfizama ABCB1 nisu pokazala utjecaj na interindividualnu varijabilnost koncentracija rivaroksabana. Od velikog broja poznatih polimorfizama (> 100) ABCB1 gena, za dvije polimorfne varijante objavljen je prikaz slučaja krvarenja bolesnika liječenog rivaroksabanom te je pokazano da rezultiraju visokim vršnim koncentracijama lijeka. Suprotno, takav utjecaj opisanih polimorfizama ABCB1 gena nije potvrđen u dodatnom ispitivanju na zdravim dobrovoljcima.

Polimorfizmi ABCB1 gena koji kodira P-gp, te ABCG2 gena koji kodira BRCP, ispitivani su u malom broju studija s ciljem utvrđivanja utjecaja na farmakokinetiku rivaroksabana. Naime, P-gp i BRCP odgovorni su za

bubrežnu eliminaciju rivaroksabana jer omogućuju apsorpciju i ekskreciju rivaroksabana te imaju ulogu važnog prijenosnika lijeka u crijeva i bubrežne tubule. Polimorfne varijante ABCB1 i ABCG2 mogu utjecati na smanjeni transport lijeka kao substrata u slučaju istodobne primjene rivaroksabana i drugih lijekova. Najviše je proučavan polimorfizam ABCG2 gena za koji je pokazano da rezultira smanjenom aktivnošću BCRP-a i time smanjenim transportom rivaroksabana.

Metabolizam rivaroksabana u jetri posredovan je izoenzimima CYP3A4 i CYP2J2, kao i mehanizmima neovisnim o citokromu P450. Dosadašnja ispitivanja pokazuju da i vršne i minimalne koncentracije rivaroksabana koreliraju s aktivnošću izoenzima CYP3A4. Iako je poznat velik broj polimorfnih varijanti koje smanjuju aktivnost izoenzima CYP3A4, dosadašnji rezultati ispitivanja utjecaja polimorfizama CYP3A4 proturječni su, a nije ni dokazan utjecaj na klinički tijek ili ishod liječenja.

Farmakogenetika apiksabana

Do sada je opisana povezanost nekih polimorfnih varijanti za ABCB1, ABCG2 i CYP3A5 s klinički značajnim povećanim vršnim i/ili minimalnim koncentracijama apiksabana u cirkulaciji. Za samo jednu polimorfnu varijantu ABCB1 utvrđen je utjecaj na porast vršne koncentracije apiksabana u plazmi. Prema preliminarnim rezultatima postoje i polimorfne varijante ABCB1 gena koje mogu rezultirati i nižim vrijednostima vršnih koncentracija apiksabana, iako ovaj utjecaj tek treba biti istražen.

Najveći rizik za pojavu neželjenih učinaka tijekom liječenja apiksabonom povezan je sa usporenim metabolizmom lijeka u jetri, pri istodobnoj primjeni lijekova koji su snažni inhibitori CYP3A5 izoenzima. Među polimorfizmima CYP3A5 najvažniji je nefunkcionalni alel CYP3A5*3. Naime, fenotipski, osoba koja je nositelj barem jednog CY3A5*1 alela

metabolizirat će lijek brže od onih koji su nositelji CYP3A5*3 na oba alela. Većina Europljana nositelji su barem jednog CYP3A5*3 alela, dok su osobe afričkog podrijetla većinom nositelji CYP3A5*1 alela. Koncentracije apiksabana veće su kod homozigotnih nositelja CYP3A5*3 alela, zbog čega su kod ovih osoba izražene interakcije s drugim lijekovima koji se metaboliziraju CYP3A5 izoenzimom.

Pokazano je da nositelji nekoliko polimorfizama CYP1A2 gena rezultiraju smanjenom aktivnošću CYP1A2 izoenzima, što može imati klinički utjecaj pri dugotrajnoj terapiji apiksabanom. U osoba koje su uz to i homozigoti nefunkcionalnih alela CYP3A5 izoenzima, dolazi do usporenog metabolizma apiksabana uz povećane koncentracije u plazmi i posljedično povećanog rizika za krvarenje zbog kumulativnog učinka dvaju polimorfizma te izostanka pomoćnog puta u metabolizmu apiksabana u jetri putem CYP1A2 izoenzima.

Nadalje, nositelji SNP polimorfizama za CYP2C9 gen mogu različito metabolizirati apiksaban. S kliničkog stajališta nekoliko je značajnih polimorfizama CYP2C9 gena. Tako primjerice, kod nositelja nefunkcionalnih alela CYP2C9*2 i CYP2C9*3, apiksaban treba oprezno davati s antiagregacijskim lijekom klopidogrelom koji u terapijskim dozama inhibira CYP2C9 izoenzim. Ovo rezultira značajno usporenim metabolizmom (spori metabolizatori) lijekova koji se metaboliziraju putem izoenzima CYP2C9 u bolesnika koji su homozigoti za nefunkcionalne alele CYP2C9 gena, što povećava rizik od krvarenja pri istodobnoj primjeni apiksabana i klopidogrela.

Najvažniji metabolički putevi apiksabana uključuju o-demetilaciju, hidroksilaciju i sulfataciju, pri čemu je o-demetylapisaban najvažniji metabolit. Potencijalno važan metabolički put uključuje sulfotransferaze SULT1A1 i SULT1A2 koje prevode o-demetylapisaban u sulfatni

oblik. SULT1A1 enzim znatno je djelotvorniji od SULT1A2 u sulfataciji o-demetylapiksabana. O-demetylapiksaban, najvažniji je metabolit i čini čak 25 % aktivnog apiksabana, dok je sulfatni oblik tj. o-demetylapiksaban-sulfat neaktivan tj. nema inhibitorni učinak na FXa. Opisane su tri genske varijante SULT1A1 (SULT1A1*1, SULT1A1*2 i SULT1A1*3) koje doprinose razlikama u sulfataciji aktivnog apiksabana, ali klinički utjecaj ovih polimorfnih varijanti nije jasno utvrđen. Prepostavka je da različiti aloenzimi SULT1A1 enzima imaju različitu aktivnost te da tako mogu doprinositi razlikama u antikoagulantnoj učinkovitosti apiksabana zbog utjecaja na koncentraciju apiksabana u cirkulaciji. Međutim, utjecaj zastupljenih genskih varijanti SULT1A1 i SULT1A2 enzima na metabolizam apiksabana također tek treba biti istražen.

Farmakogenetika edoksabana

Može se očekivati da polimorfne varijante gena (CES1, CYP3A4, CYP3A5) koji kodiraju proteine uključene u metabolizam edoksabana te gena (ABCB1 i SLCO1B1) koji kodiraju proteine uključene u njegov transport, utječu na koncentraciju edoksabana. Sobzirom da se edoksaban uglavnom metabolizira putem CES1, a u znatno manjoj mjeri putem CYP3A4 i CYP3A5 izoenzima, te da se transportira putem P-gp, varijabilnost koncentracija edoksabana u plazmi najvjerojatnije je vezana za polimorfne varijante CES1 i ABCB1 gena.

Edoksaban se može metabolizirati u različite metabolite putem CES1 (< 10 %) i CYP3A4 (< 10 %) te glukoronidacijom, pri čemu nastali metaboliti ne doprinose značajno antikoagulantnoj aktivnosti edoksabana, uključujući i najzastupljeniji metabolit M4 (nastaje djelovanjem CES1 enzima). Edoksaban i metabolit M4 substrati su za P-gp kojeg kodira ABCB1 gen, a ujedno su i substrati za organski anionski protein nosač (engl. *organic*

anion carrier protein, OATP1B1) kojeg kodira SLCO1B1 gen, pa se može očekivati da genske varijante SLCO1B1 gena mogu utjecati na koncentraciju edoksabana i M4 u plazmi. Za sada nije utvrđen utjecaj polimorfizama ABCB1 i SLCO1B1 gena na farmakokinetiku edoksabana iako je pokazano da kombinirana primjena edoksabana i inhibitora P-gp ili OATP1 povećava koncentraciju edoksabana u cirkulaciji.

Za polimorfizme CES1 gena nije utvrđen utjecaj na koncentraciju edoksabana. Međutim, do danas je utjecaj polimorfnih varijanti ovih gena slabo ispitani te zahtijeva daljnja istraživanja.

Iako CYP3A5 enzim vrlo malim dijelom sudjeluje u metabolizmu edoksabana, interakcije edoksabana s lijekovima koji su snažni inhibitori CYP3A5 izoenzima mogu se očekivati u osoba koje su homozigotni nositelji nefunkcionalnih alela CYP3A5 gena. Takvi nositelji usporavaju metabolizam edoksabana u jetri te povećavaju koncentraciju edoksabana u cirkulaciji, a time izazivaju veći rizik od krvarenja.

Farmakogenetika betriksabana

S obzirom da je betriksaban najnoviji DOAK lijek, još nema rezultata istraživanja o utjecaju genskih polimorfizama na farmakokinetiku i farmakodinamiku betriksabana. Budući da je u transport betriksabana uključen ABCB1 gen koji kodira P-gp, moguće je da polimorfne varijante ovog gena imaju utjecaj na koncentraciju betriksabana u plazmi. Ostali geni kandidati uključeni u metabolizam drugih DOAK lijekova ne sudjeluju u metabolizmu betriksabana pa se očekuje manji utjecaj polimorfnih varijanti gena (interakcije gen-lijek), odnosno drugih lijekova koji koriste iste metaboličke puteve (interakcije lijek-lijek).

UTJECAJ DOAK LIJEKOVA NA REZULTATE KOAGULACIJSKIH PRETRAGA

DOAK lijekovi ostvaruju svoj antikoagulacijski učinak ciljanim djelovanjem na specifičan segment hemostatskog sustava što za posljedicu ima smanjenu koagulabilnost cirkulirajuće krvi. S obzirom na direktni učinak DOAK lijekova na aktivnost hemostatskog sustava, razumljivo je da DOAK lijekovi značajno utječu na rezultate većine probirnih i specifičnih pretraga hemostaze.

Utjecaj DOAK-a na probirne pretrage hemostaze

DOAK lijekovi utječu na rezultate sljedećih probirnih pretraga: protrombinsko vrijeme (PV), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) i trombinsko vrijeme (TV). Intenzitet utjecaja DOAK-a na pojedine probirne pretrage hemostaze ovisi o nizu čimbenika, uključujući mehanizam djelovanja lijeka, različitost lijekova unutar iste skupine, različitu koncentraciju lijeka u cirkulaciji i različitu osjetljivost komercijalnih reagensa za istu pretragu. Utjecaj DOAK lijekova na pojedine probirne pretrage hemostaze prikazan je u Tablici 5.

DOAK lijekovi različitog mehanizma djelovanja očekivano imaju i različit utjecaj na rezultate pojedinih probirnih pretraga. Primjerice, izravni inhibitor trombina (dabigatran) ima veći utjecaj na APTV u odnosu na PV, te izrazit utjecaj na TV, dok lijekovi iz skupine izravnih inhibitora FXa imaju veći utjecaj na PV, a znatno manji ili zanemariv utjecaj na APTV, a uopće ne utječu na rezultat pretrage TV.

Nadalje, čak i pojedini lijekovi iste skupine prema mehanizmu djelovanja (rivaroksaban, apiksaban i edoksaban) imaju različit utjecaj na istu probirnu pretragu. Primjerice, rivaroksaban ima najveći utjecaj na PV, dok apiksaban u terapijskim koncentracijama uopće nema značajan utjecaj na PV ni pri vršnoj koncentraciji lijeka. Utjecaj edoksabana na rezultat PV-a je između rivaroksabana i apiksabana.

Koncentracija lijeka u cirkulaciji također je važan čimbenik koji utječe na rezultat probirnih pretraga pri čemu je taj utjecaj razmjeran koncentraciji lijeka. Zbog kratkog poluživota u cirkulaciji (5 - 15 sati), koncentracije lijeka se značajno razlikuju. Utjecaj lijeka na rezultate probirnih pretraga najveći je u vrijeme vršne koncentracije (1-4 sata nakon uzimanja lijeka), a najmanji u vrijeme minimalne koncentracije lijeka (neposredno prije sljedeće doze). Stoga je i poznavanje vremena uzorkovanja krvi u odnosu na zadnju dozu lijeka od ključne važnosti za interpretaciju rezultata pojedinih probirnih pretraga.

Konačno, različiti komercijalni reagensi za istu probirnu pretragu pokazuju različitu osjetljivost za DOAK lijekove, pa tako primjerice isti DOAK lijek ima različit utjecaj na PV ovisno o primjenjenom tromboplastinskom reagensu.

Osobito ističemo neutemeljene pokušaje primjene internacionalnog normalizirajućeg omjera (INR) za procjenu antikoagulantog učinka DOAK lijekova iz skupine inhibitora FXa. Važno je naglasiti da je INR mjerna jedinica specifična za izražavanje rezultata pretrage PV u bolesnika liječenih antikoagulantnim lijekovima iz skupine VKA (s obzirom da kalibracijske plazme potječu od plazme bolesnika liječenih varfarinom), te se ova mjerna jedinica ne smije koristiti za interpretaciju rezultata PV-a u bolesnika na DOAK lijekovima.

Za dabigatran, pretraga PV je nedovoljno osjetljiva te se ova pretraga ni u kombinaciji s APTV-om ne može koristiti za isključivanje klinički

značajne koncentracije dabigatrana u cirkulaciji. U odnosu na PV, APTV je osjetljivija pretraga za dabigatran s obzirom da se radi o lijeku koji djeluje kao inhibitor trombina. Vrijednost APTV-a unutar referentnog intervala isključuje koncentracije dabigatrana iznad terapijskih vrijednosti, ali ne i unutar terapijskih vrijednosti. Međutim, utjecaj dabigatrana na rezultat APTV-a ovisi o korištenom reagensu jer različiti komercijalni APTV reagensi imaju i različitu osjetljivost za dabigatran.

Pokazano je da se kombiniranim određivanjem PV-a i APTV-a uz primjenu osjetljivih reagensa, a u slučaju rezultata unutar referentnog intervala za obje pretrage, može isključiti koncentracija dabigatrana iznad 50 ng/mL u cirkulaciji, ali ne i rivaroksabana. Koncentracije apiksabana mogu biti i do 200 ng/mL uz vrijednosti obje pretrage unutar referentnog intervala. Prema tome, važno je naglasiti da rezultati PV-a i APTV-a unutar referentnog intervala ne isključuju prisutnost terapijske koncentracije DOAK lijekova u cirkulaciji.

Jedina potencijalna korisnost probirnih koagulacijskih pretraga PV i APTV u bolesnika liječenih DOAK lijekovima isključivo je orientacijska ili kvalitativna procjena prisutnosti lijeka. Gruba procjena važna je u hitnim stanjima vitalno ugroženih bolesnika kad su nedostupne analitičke metode za mjerjenje koncentracije lijeka u plazmi. Među svim DOAK lijekovima iz skupine izravnih inhibitora FXa, apiksaban ima najmanji utjecaj na rezultate probirnih pretraga. Stoga ove probirne pretrage nije moguće koristiti ni za kvalitativnu procjenu prisutnosti apiksabana u cirkulaciji pri terapijskim dozama lijeka.

Suprotno, pretraga TV izrazito je analitički osjetljiva na dabigatran te je čak i u bolesnika s niskim koncentracijama dabigatrana u cirkulaciji (≥ 50 ng/mL), TV je najčešće produženo iznad gornje granice mjernog raspona (> 150 sekundi) za većinu komercijalnih reagensa. Iako dabigatran kao izravni inhibitor trombina ima značajan utjecaj na rezultat pretrage

TV, ova je pretraga zbog izrazite preosjetljivosti neprikladna za procjenu koncentracije ili antikoagulantnog učinka dabigatrana. Stoga je jedina potencijalna primjena pretrage TV u bolesnika liječenih dabigatranom isključivanje klinički značajne koncentracije ($> 30 \text{ ng/mL}$) ako je rezultat pretrage unutar referentnog intervala.

DOAK lijekovi nemaju značajan utjecaj na određivanje fibrinogena. Izuzetak mogu biti neki reagensi za određivanje funkcionalne aktivnosti fibrinogena čija primjena može rezultirati lažno nižim vrijednostima fibrinogena. Primjena DOAK lijekova ne utječe na rezultate određivanja D-dimera, što je od izuzetne kliničke važnosti u hitnim stanjima kada se ova pretraga koristi za isključivanje VTE.

Premda su probirne pretrage hemostaze relativno jeftine, brze i dostupne za izvedbu tijekom 24 sata u većini laboratorija, nažalost nisu standardizirane za DOAK lijekove zbog značajne razlike u analitičkoj osjetljivosti pojedinih reagensa, kao i zbog ovisnosti o vremenu uzorkovanja u odnosu na zadnju dozu. Zbog njihove nedovoljne dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti, probirne pretrage nisu prikladne ni za kvantitativnu procjenu koncentracije lijeka niti za procjenu njihova antikoagulacijskog učinka. S druge strane, poznavanje utjecaja DOAK lijekova na rezultate probirnih pretraga, kao i čimbenika koji uzrokuju taj utjecaj, od iznimne je važnosti za njihovu ispravnu interpretaciju.

Činjenica da probirne pretrage nisu pouzdan pokazatelj procjene koncentracije i/ili učinka DOAK-a, nametnula je usporedo s uvođenjem ovih lijekova u kliničku praksu i razvoj analitičkih metoda za kvantitativno određivanje koncentracije DOAK lijekova. Razvoj se odvijao u smjeru osmišljavanja specifičnih metoda koje se mogu primijeniti na automatiziranim analitičkim sustavima (koagulometrima) u sastavu laboratorija za ispitivanje hemostaze, a o čemu će biti riječ u sljedećem poglavlju o analitičkim metodama.

Tablica 5. Utjecaj DOAK lijekova na probirne pretrage hemostaze

Pretraga	Direktni inhibitor trombina	Direktni inhibitori FXa	Obrazloženje
Protrombinsko vrijeme (PV)	+/-	+//+	<p>Najveća osjetljivost na prisutnost rivaroksabana, umjerena za edoksaban, a pretraga je neosjetljiva na prisutnost apiksabana i pri vršnim koncentracijama lijeka</p> <p>Različita je osjetljivost za isti lijek ovisno o korištenom reagensu (različiti tromboplastini)</p> <p>Nedovoljna osjetljivost i specifičnost – pretraga nije prikladna ni za kvalitativnu niti za kvantitativnu procjenu DOAK lijekova</p> <p>Rezultat PV-a unutar referentnog raspona ne isključuje terapijske vrijednosti DOAK lijeka</p>
Aktvirano parcijalno trombo-plastinsko vrijeme (APTV)	++	+/-	<p>Najveća osjetljivost za dabigatran</p> <p>Slaba osjetljivost za lijekove iz skupine inhibitora FXa</p> <p>Različita osjetljivost za isti lijek ovisno o korištenom reagensu (različiti aktivatori i fosfolipidi)</p> <p>Nedovoljna osjetljivost i specifičnost – pretraga nije prikladna ni za kvalitativnu niti za kvantitativnu procjenu DOAK lijekova</p> <p>Rezultat APTV-a unutar referentnog raspona ne isključuje terapijske vrijednosti DOAK lijeka</p>
Trombinsko vrijeme (TV)	+++	-	<p>Rezultat TV-a unutar referentnog intervala isključuje klinički značajnu koncentraciju dabigatrana ($> 30 \text{ ng/mL}$) – može se koristiti kao brza probirna metoda u hitnim stanjima u nedostatu kvantitativne metode za dabigatran</p> <p>Rezultat TV-a produžen je već kod minimalnih koncentracija lijeka ($> 30 \text{ ng/mL}$) pa je pretraga zbog preosjetljivosti neprikladna za procjenu koncentracije dabigatrana</p> <p>Pri terapijskim koncentracijama lijeka, rezultat TV-a je najčešće iznad gornje granice mjernog raspona ($> 150 \text{ s}$) za sve komercijalne reagense</p>
Fibrinogen	-/+	-	DOAK lijekovi nemaju značajan utjecaj na funkcionalnu aktivnost fibrinogena. Nije utvrđen utjecaj ni jedne kvantitativne metode za lijekove iz skupine inhibitora FXa Za neke reagense, aktivnost fibrinogena može biti lažno snižena u prisutnosti terapijskih vrijednosti dabigatrana.
D-dimer	-	-	DOAK lijekovi nemaju utjecaj na određivanje D-dimera

+ = lijek utječe; - = lijek ne utječe na rezultat pretrage; +/- i -/+ = lijek može, ali i ne mora imati utjecaj na rezultat pretrage

Utjecaj DOAK-a na specifične pretrage hemostaze

Osim na rezultate probirnih pretraga hemostaze, DOAK lijekovi značajno utječu i na rezultate većine specifičnih pretraga čije se određivanje temelji na koagulometrijskom načelu mjerjenja. To je očekivano s obzirom da ovi lijekovi inhibiraju stvaranje fibrina izravnom inhibicijom specifičnog cilja (FIIa ili FXa) u hemostatskom sustavu.

Utjecaj DOAK lijekova na rezultate pojedinih specifičnih pretraga hemostaze prikazan je u Tablici 6. Od posebnog kliničkog značaja je poznavanje utjecaja na rezultate većine fenotipskih pretraga ispitivanja trombofilije, uključujući određivanje fizioloških inhibitora zgrušavanja: antitrombina (AT), proteina C (PC) i proteina S (PS), određivanje rezistencije na aktivirani protein C (APCR) i dokazivanje prisutnosti lupus antikoagulansa (LA). Ovisno o pretrazi, utjecaj DOAK-a očituje se lažno pozitivnim ili lažno negativnim rezultatom pojedinog čimbenika trombofilije, što može imati izravan učinak i na postavljanje pogrešne dijagnoze, a time i na samo lijeчењe bolesnika.

Aktivnost AT određuje se kromogenim metodama koje se temelje na primjeni ili FIIa (trombina) ili FXa kao ciljnog enzima, pa stoga i utjecaj pojedinih DOAK lijekova ovisi o korištenoj metodi za AT. Dabigatran utječe na rezultat pretrage AT u metodama koje se temelje na inhibiciji trombina, dok lijekovi iz skupine inhibitora FXa značajno utječu na metode za AT koje se temelje na inhibiciji FXa. Rezultat utjecaja DOAK lijekova na određivanje aktivnosti AT očituje se lažno višim vrijednostima AT. Stoga, kod bolesnika koji se liječe dabigtranom, aktivnost AT može se određivati isključivo metodom koja se temelji na inhibiciji FXa jer u ovom slučaju nema interferencije DOAK-a na rezultat pretrage AT. Obrnuto, kod bolesnika koji se liječe nekim od DOAK lijekova iz skupine inhibitora

FXa, aktivnost AT može se određivati isključivo metodom koja se temelji na inhibiciji trombina. S obzirom da laboratoriji najčešće ne koriste dvije metode za mjerjenje AT (najčešće onu koja koristi FXa kao ciljni enzim jer je ovo metoda izbora), nije moguće odrediti AT u bolesnika koji uzimaju DOAK-e iz skupine inhibitora FXa.

Utjecaj DOAK lijekova na koagulometrijske metode određivanja aktivnosti PC i PS očituje se lažno višim vrijednostima pa rezultat pretrage može biti lažno negativan u bolesnika s nasljednim manjkom PC ili PS. U slučaju proteina C, osim koagulometrijske metode dostupna je i kromogena metoda u kojoj DOAK lijekovi ne interferiraju. Zato se aktivnost PC u bolesnika na DOAK lijekovima može određivati ako se koristi kromogena metoda. Za određivanje PS nema takvih mogućnosti jer postoji isključivo koagulometrijska metoda za funkcionalni test mjerjenja aktivnosti PS pa interferencije DOAK-a nije moguće ukloniti. Međutim, određivanje slobodnog proteina S moguće je za bolesnike na terapiji DOAK lijekovima jer na imunokemijsku analitičku metodu DOAK lijekovi nemaju interferirajući utjecaj.

DOAK lijekovi utječu i na koagulometrijsko određivanje APCR-a, probirne pretrage u otkrivanju mutacije faktor V Leiden (FVL) kao uzroka rezistencije na aktivirani protein C. Na temelju rezultata APCR pretrage odlučuje se je li potrebno učiniti genotipizaciju FVL mutacije kao sljedeći dijagnostički korak. Naime, negativan (uredan) rezultat koagulacijskog testa za APCR isključuje FVL mutaciju pa je genotipizacijsko testiranje nepotrebno. Obrnuto, pozitivan rezultat APCR testa upućuje na mutaciju FVL te je kao drugi dijagnostički korak potrebno učiniti molekularnu dijagnostiku FVL. Svi DOAK lijekovi mogu imati izravan interferirajući učinak na rezultat koagulacijske pretrage APCR u smislu lažno veće vrijednosti APCR-a, odnosno lažno negativnog rezultata, pa se ova

pretraga ne izvodi u bolesnika tijekom liječenja DOAK lijekovima, već je potrebno osloniti se isključivo na molekularnu dijagnostiku FVL mutacije koja nije podložna interferenciji antikoagulantne terapije.

Od posebne je važnosti utjecaj svih DOAK lijekova na rezultat koagulometrijskih pretraga koje se određuju u sklopu dijagnostičkog postupka za dokazivanje LA. Svi DOAK lijekovi značajno utječu na rezultate i probirnih i potvrđnih pretraga za dokazivanje prisutnosti antifosfolipidnih protutijela iz skupine LA, a interferencija se očituje lažno pozitivnim rezultatom LA pretrage, i to već pri minimalnim koncentracijama DOAK lijeka u cirkulaciji. Stoga se LA pretraga ne smije izvoditi tijekom liječenja DOAK lijekovima. Za razliku od LA protutijela, na dokazivanje ostalih skupina antifosfolipidnih protutijela (antikardiolipinska i anti- β 2-glikoproteinska protutijela) enzimimunokemijskim metodama, DOAK lijekovi nemaju interferirajući utjecaj te se ove pretrage mogu izvoditi tijekom liječenja.

DOAK lijekovi značajno utječu i na aktivnost pojedinih čimbenika zgrušavanja pri čemu aktivnost čimbenika može biti lažno snižena. Dabigatran ima veći utjecaj na rezultate čimbenika zgrušavanja čije se određivanje temelji na modifikaciji APTV metode (FVIII, FIX, FXI i FXII), dok lijekovi iz skupine inhibitora FXa imaju veći utjecaj na rezultate pretraga čije se mjerjenje temelji na modifikaciji PV testa (FII, FV, FVII i FX). Pri tome, rivaroksaban ima najveći utjecaj (pri koncentraciji > 100 ng/mL), edoksaban umjeren, dok apiksaban u terapijskim koncentracijama ne utječe na rezultate aktivnosti faktora zgrušavanja (utječe tek pri koncentraciji od oko 500 ng/mL). Ako je potrebno odrediti aktivnost pojedinih faktora zgrušavanja, utjecaj DOAK lijekova može se ukloniti određivanjem ovih pretraga uz razrjeđenje uzorka plazme.

Nadalje, budući da se određivanje aktivnosti heparina i DOAK lijekova iz skupine direktnih inhibitora FXa temelji na istom analitičkom načelu metodom anti-FXa, nefrakcionirani i niskomolekularni heparin u terapijskim dozama (izuzev manjih profilaktičkih doza) mogu interferirati u određivanju koncentracije DOAK lijekova iz skupine direktnih inhibitora FXa u smislu lažno viših vrijednosti DOAK lijekova. Ovaj je podatak od kliničke važnosti u bolesnika kod kojih je zbog operativnog zahvata privremeno ukinuto lijeчењe DOAK lijekom i uveden heparin jer može rezultirati lažno višim vrijednostima izmjerene ostatne koncentracije DOAK-a (iznad vrijednosti koja je klinički značajna, tj. $> 30 \text{ ng/mL}$). Stoga je u slučaju privremenog prijelaza s DOAK lijeka na heparin pri određivanju ostatne koncentracije DOAK-a u plazmi (nakon ukidanja lijeka) potrebno imati klinički podatak o heparinskoj terapiji.

Općenito, intenzitet utjecaja na rezultate navedenih specifičnih pretraga ovisi o koncentraciji DOAK-a u cirkulaciji. Međutim, za većinu pretraga, utjecaj lijeka može biti prisutan već pri minimalnim koncentracijama lijeka. Ordiniranje pretraga na koje ovi lijekovi imaju utjecaj nije prihvatljivo tijekom terapije DOAK-a, čak ni uz uvjet da se krv uzorkuje neposredno prije uzimanja lijeka kad je u cirkulaciji najniža koncentracija lijeka. S obzirom da je utjecaj DOAK lijekova na većinu navedenih specijalističkih pretraga klinički značajan i očituje se lažno pozitivnim ili lažno negativnim rezultatom, jasno je da takav interferirajući utjecaj DOAK-a može rezultirati izravnim dijagnostičkim pogreškama, klinički pogrešnim odlukama i posljedicama za bolesnika.

U skladu sa svim navedenim činjenicama, liječeњe DOAK lijekovima predstavlja ključan predanalitički čimbenik u određivanju specifičnih pretraga hemostaze, a s posebnih naglaskom na pretrage probira na trombofiliju. Medicinski biokemičari koji izvode pretrage hemostaze

moraju poznavati prednosti i ograničenja analitičkih metoda koje koriste u svojemu laboratoriju te pružiti informaciju i obrazloženje liječnicima o utjecaju DOAK-a na rezultate pojedinih pretraga. Kad je potrebno, liječnicima valja obrazložiti odbijanje ili odgoditi neke pretrage da bi se spriječili lažno pozitivni ili lažno negativni rezultati i posljedično postavljanje pogrešne dijagnoze.

Sve opisane fenotipske pretrage na čije rezultate DOAK lijekovi imaju interferirajući utjecaj potrebno je odgoditi najmanje 3 dana nakon završetka terapije DOAK lijekovima (ili duže u bolesnika s bubrežnom insuficijencijom). Izuzetak su metode molekularne dijagnostike na koje DOAK lijekovi nemaju interferirajući učinak.

Alternativno, ukoliko je nužno provesti određivanje pojedinih pretraga, moguće je primijeniti metodu *in vitro* uklanjanja DOAC lijeka iz uzorka plazme primjenom komercijalnih pripravaka čije se djelovanje temelji na adsorptivnoj sposobnosti aktivnog ugljena. Na tržištu su dostupni komercijalni adsorbensi *DOAC-Stop™* (*Hematex Research, Hornsby, Australia*) i *DOAC-Remove™* (*5-Diagnostics, Basel, Switzerland*), koji omogućuju laboratorijima primjenu postupka za uklanjanje interferirajućeg utjecaja DOAK lijekova na pojedine specijalističke pretrage hemostaze.

Tablica 6. Utjecaj DOAK lijekova na specifične pretrage hemostaze

Laboratorijska pretraga	Lijekovi direktni inhibitori trombina	Lijekovi direktni inhibitori FXa	Obrazloženje i preporuka
Lupus antikoagulans (LA)	da	da	Lažno pozitivan LA. Ne raditi pretragu tijekom DOAK terapije.
Protein C (PC) aktivnost	da	da	Koagulometrijska metoda – lažno negativan PC
	ne	ne	Kromogena metoda – DOAK ne utječe
			Koristiti isključivo kromogenu metodu
Protein S (PS) aktivnost	da	da	Koagulometrijska metoda (aktivnost PS) – lažno negativan PS
	ne	ne	Imunokemijska metoda (slobodni PS) – DOAK ne utječe
			Odrediti isključivo slobodni PS
Antitrombin (AT)	da	ne	Metoda s trombinom (FIIa) – lažno negativan rezultat uz dabigatran, inhibitori FXa ne utječu na rezultat
	ne	da	Metoda s FXa – lažno negativan rezultat uz inhibitore FXa, dabigatran ne utječe na rezultat
			Koristiti isključivo metodu koja ne interferira za pojedinu skupinu DOAK-a
Rezistencija na aktivirani protein C (APCR)	da	da	Lažno negativan APCR Umjesto APCR-a izravno odrediti faktor V Leiden molekularnom dijagnostikom – nema utjecaja DOAK-a
Faktori zgrušavanja – modifikacija PV metode (FII, FV, FVII, FX)	da	da	Lažno snižena aktivnost faktora zgrušavanja Veća osjetljivost na inhibitore FXa rivaroksaban i edoksaban (apiksaban ne utječe na vrijednost) nego na dabigatran
			Odrediti aktivnosti faktora zgrušavanja u razrjeđenom uzorku plazme
Faktori zgrušavanja VIII, IX, XI, XII (FVIII, FIX, FXI, FXII) – modifikacija APTV metode	da	da	Lažno snižena aktivnost faktora zgrušavanja Veća osjetljivost na dabigatran nego na inhibitore FXa (rivaroksaban i edoksaban)
			Odrediti aktivnosti faktora zgrušavanja u razrjeđenom uzorku plazme
Faktor zgrušavanja FXIII (FXIII)	da	ne	Kromogena metoda – lažno snižena aktivnost uz dabigatran, inhibitori FXa ne utječu na rezultat
			FXIII ne raditi tijekom liječenja dabigatranom.
Nefrakcionirani heparin (UFH) i niskomolekularni heparin (LMWH)	ne	da	Lažno veće koncentracije DOAK-a (rivaroksaban, apiksaban, edoksaban) kod terapijskih (a ne i profilaktičkih) doza heparina kao zamjenske terapije nakon ukidanja DOAK-a prije operativnog zahvata
			Ne određivati ostatnu koncentraciju DOAK-a iz skupine inhibitora FXa u bolesnika na terapijskim dozama heparina.

METODE ODREĐIVANJA DOAK LIJEKOVA

Referentna metoda za određivanje koncentracije DOAK-a u krvi je dvostruka spektrometrija masa spregnuta s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (LC/MS-MS). Ovom metodom direktno se mjeri koncentracija pojednog lijeka, a odlikuje ju niska donja granica kvantifikacije i širok mjerni raspon (5 – 500 ng/mL). Zbog nedostupnosti potrebne opreme, visoke cijene LC/MS-MS tehnologije i potrebne ekspertize u tom analitičkom području, ova metoda nije dostupna većini laboratorija. Dosadašnja istraživanja pokazala su visok stupanj slaganja rezultata koncentracije DOAK-a dobivenih LC/MS-MS metodom i rutinskim koagulacijskim metodama na automatiziranim analitičkim sustavima (koagulometrima), posebno u klinički značajnom mjernom području. U ovom pregledu detaljnije će biti opisane metode koje se mogu implementirati u svakom medicinsko-biokemijskom laboratoriju u kojem se izvode pretrage hemostaze. Analitički uzorak za određivanje DOAK lijekova koagulacijskim metodama je isključivo plazma dobivena centrifugiranjem uzorka venske krvi uzete na 3,2 %-tni natrijevitrat. Kvantitativne kromogene i koagulometrijske metode određivanja DOAK lijekova navedene su u Tablici 7., a načela ovih analitičkih metoda shematski su prikazana na Slici 2.

METODE ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE DABIGATRANA

Diluirano trombinsko vrijeme (dT_V)

Diluirano trombinsko vrijeme (dT_V, engl. *diluted thrombin time, dTT*) najjednostavnija je koagulometrijska metoda za određivanje koncentracije dabigatrana koju može implementirati svaki laboratorij koji određuje trombinsko vrijeme (TV). Metoda se temelji na modifikaciji testa TV zbog visoke osjetljivosti ove pretrage na klinički značajne koncentracije dabigatrana u krvi. Plazmu bolesnika potrebno je razrijediti s normalnom plazmom u omjeru 1:8 čime se postiže linearost mjerjenja u širokom koncentracijskom rasponu. Zbog prevelike osjetljivosti pretrage TV na dabigatran, originalnom TV metodom nije moguće mjeriti terapijske koncentracije lijek a jer je rezultat TV-a iznad gornje granice mjernog raspona već kod koncentracija dabigatrana > 50 ng/mL. Nakon razrjeđenja, uzorku plazme bolesnika dodaje se isti volumen pročišćenog humanog trombina pri čemu dolazi do aktivacije zgrušavanja. Vrijeme potrebno za nastanak ugruška je diluirano trombinsko vrijeme koje je linearno povezano s koncentracijom lijeka u plazmi bolesnika. Za kalibraciju metode koristi se lijek dabigatran. Test se može izvoditi pomoću tzv. *in house* metode (npr. modifikacija pretrage TV uz kalibraciju komercijalnim standardima dabigatrana) ili s komercijalno dostupnim kitovima koji u sastavu imaju pripadajući reagens i kalibrator. Mjerni raspon ove metode je 100 – 400 ng/mL u standardnoj diluciji uzorka (1:8), dok je uz diluciju uzorka u omjeru 1:2 moguće mjeriti i vrlo niske koncentracije dabigatrana 20 - 30 ng/mL primjenom većine komercijalnih testova (granica kvantifikacije), uz granicu detekcije 2 – 8 ng/mL.

Ekarinski koagulometrijski test (ECT)

Ekarinski koagulometrijski test (engl. *ecarin coagulometric test, ECT*) je koagulacijska metoda koja se bazira na djelovanju ekarina (zmijskog otrova) na protrombin pri čemu nastaje meizotrombin kojeg inhibira dabigatran te se mjeri brzina nastanka ugruška. Nedostatak ove metode je to što je zbog koagulometrijskog načela mjerena osjetljiva na deficijenciju protrombina (FII) i fibrinogena u uzorku bolesnika pa aktivnosti ovih faktora zgrušavanja mogu utjecati na rezultat ECT testa.

Ekarinska kromogena metoda (ECA)

Ekarinska kromogena metoda (engl. *ecarin chromogenic assay, ECA*) temelji se na istom načelu kao i ECT, ali povećava točnost izmjerene koncentracije dabigatrana jer se određuje kromogenom, a ne koagulometrijskom metodom pa ne ovisi o koncentraciji fibrinogena i protrombina (FII). Uzorak bolesnika razrjeđuje se puferom koji sadrži protrombin te uz dodatak ekarina nastaje meizotrombin kojeg inhibira dabigatran prisutan u plazmi bolesnika. Iz izmjerene apsorbancije nastalog kromogenog kompleksa određuje se koncentracija dabigatrana u plazmi.

Anti-FIIa test

Anti-FIIa je najnovija metoda određivanja koncentracije dabigatrana. Na tržištu je dostupno nekoliko komercijalnih anti-FIIa testova koji se zasnivaju na načelu određivanja stupnja inhibicije trombina kromogenom metodom. Svišak trombina nakon reakcije dabigatrana i trombina veže se s kromogenim supstratom specifičnim za trombin te se iz izmjerene apsorbancije nastalog kompleksa određuje koncentracija dabigatrana u plazmi. Ova metoda ima nešto nižu granicu detekcije od ekarinskih metoda (15 ng/mL) i pokazuje izvrsno slaganje s LC/MS-MS metodom za koncentracije dabigatrana < 150 ng/mL.

METODE ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE RIVAROKSABANA, APIKSABANA I EDOKSABANA

Određivanje koncentracije DOAK lijekova koji inhibiraju aktivirani čimbenik X (FXa) izvodi se kromogenom anti-Xa metodom pomoću komercijalnih testova uz primjenu kalibratora specifičnih za svaki pojedini lijek.

Anti-Xa test

Metoda anti-Xa zasniva se na mjerenu apsorbancije p-nitroanilina iz kromogenog supstrata nastalog spajanjem suviška FXa i kromogena iz reakcije specifičnog lijeka (rivaroksabana, apiksabana ili edoksabana) i FXa. Apsorbancija je obrnuto proporcionalna koncentraciji lijeka u plazmi.

Anti-Xa testovi za određivanje direktnih inhibitora FXa kalibrirani s kalibratorima specifičnima za lijek koji se mjeri, pokazuju dobru korelaciju s LC/MS-MS metodom u klinički značajnom mjerom rasponu.

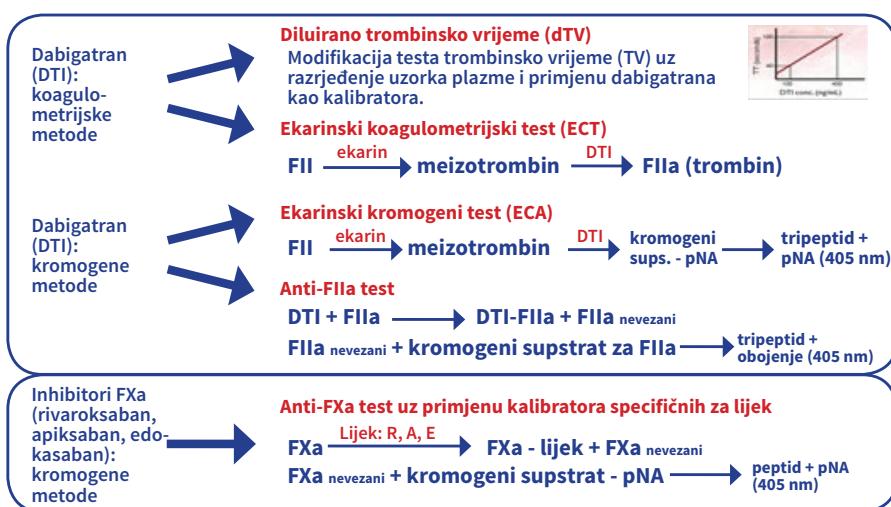
Dostupni komercijalni kitovi imaju granicu kvantifikacije za rivaroksaban 30 ng/mL, za apiksaban 15 ng/mL i za edoksaban 10 ng/mL. Niže koncentracije moguće je izmjeriti kalibracijom u nižim područjima, ali na uštrb granica mjernog raspona u višim koncentracijskim područjima. U tom slučaju potrebno je koristiti zasebne kalibracijske krivulje za nisko i visoko područje koncentracija lijeka.

Važno je napomenuti da je istom anti-Xa metodom moguće i određivanje nefrakcioniranog i niskomolekularnog heparina uz primjenu istog reagensa, ali uz kalibraciju s odgovarajućim heparinskim pripravkom. Stoga je u slučaju privremenog ukidanja DOAK lijeka i uvođenja heparina u terapijskim dozama moguća interferencija heparina pri mjerenu koncentracije DOAK lijekova iz skupine direktnih inhibitora FXa u smislu lažno viših vrijednosti odgovarajućeg DOAK lijeka. Za razliku od terapijskih, profilaktičke doze heparina ne utječu na rezultate određivanja DOAK lijekova anti-Xa metodom.

Tablica 7. Kvantitativne metode određivanja koncentracije DOAK lijekova.

DOAK lijek	Analitička metoda	
	Koagulometrijska	Kromogena
Dabigatran	dTV, ECT	ECA, anti-FIIa
Rivaroksaban	/	Anti-FXa kalibriran uz rivaroksaban
Apiksaban	/	Anti-FXa kalibriran uz apiksaban
Edoksaban	/	Anti-FXa kalibriran uz edoksaban

dTV = diluirano trombinsko vrijeme; ECT = ekarinski koagulometrijski test; ECA = ekarinska kromogena metoda



Slika 2. Shematski prikaz kvantitativnih koagulometrijskih i kromogenih metoda za određivanje koncentracije DOAK lijekova na automatiziranim koagulometrima.

(DTI = direktni inhibitor trombina; R = rivaroksaban; A = apiksaban; E = edoksaban; p-NA = para-nitroanilin)

OSTALE METODE ZA ODREĐIVANJE DOAK LIJEKOVA

Osim gore navedenih kvantitativnih metoda za određivanje koncentracije DOAK-a u plazmi, postoje i kvalitatitive i polukvantitativne metode koje se izvode iz drugih vrsta uzoraka, najčešće iz pune krvi ili urina. Ove metode nemaju za cilj određivanje točne koncentracije lijeka u krvi bolesnika već služe za procjenu utjecaja koncentracije lijeka u hitnim stanjima na rizik od neželjenih učinaka (najčešće krvarenja) ili za isključivanje klinički značajne koncentracije DOAK lijekova u cirkulaciji.

U određenim hitnim kliničkim stanjima kod bolesnika liječenih DOAK lijekovima potrebno je isključiti klinički značajnu koncentraciju lijeka u krvi ($> 30 \text{ ng/mL}$). Prema do sada objavljenim radovima, najbliže kliničkoj primjeni je tzv. test uz postelju bolesnika (engl. point of care, POC) koji se temelji na kvalitativnom određivanju prisutnosti ili odsutnosti lijeka u urinu pomoću test trake (*DOAC Dipstick™, DOASENSE GmbH*). U prisutnosti određenog DOAK lijeka testno polje na trakici promijenti će boju koja se može očitati vizualno (usporednom s vizualiziranim rezultatom-slikom prema proizvođaču) ili pomoću automatiziranog čitača trakica. Ova metoda ima testno polje za dabigatran i testno polje za DOAK lijekove iz skupine direktnih inhibitora FXa, pa njome nije moguće razlikovati pojedine DOAK lijekove iz druge skupine. Napominjemo, ovom metodom nije moguće izmjeriti koncentraciju lijeka, ali se pokazala pouzdanom za isključivanje klinički značajne koncentracije svih DOAK lijekova u cirkulaciji ($> 30 \text{ ng/mL}$).

Kod metoda kojima se procjenjuje globalna koagulacija i fibrinoliza iz pune krvi poput tromboelastometrije, tromboelastografije, aktiviranog vremena zgrušavanja, vremena stvaranja trombina i sl., intenzivno

se istražuju mogućnosti za procjenu antikoagulacijskog učinka DOAK lijekova. POC metode iz pune krvi koje su za sada pokazale zadovoljavajuće rezultate u hitnim stanjima, temelje se na ekarinskoj metodi za određivanje dabigatrana te na vremenu zgrušavanja potaknutom pomoću otrova Russell-ove ljutice (engl. *Russell Viper Venom, RW*) za određivanje inhibitora FXa. Međutim, zbog nedovoljne osjetljivosti i standardiziranosti, primjena ovih pretraga ne preporučuje se u svrhu procjene koncentracije i/ili antikoagulacijskog učinka DOAK lijekova.

PREPORUKE ZA LABORATORIJSKU DIJAGNOSTIKU DOAK LIJEKOVA

Preporuke za određivanje koncentracije DOAK lijekova uključuju sve faze laboratorijske dijagnostike: prijeanalitičku, analitičku i poslijeanalitičku. Odnose se na DOAK lijekove dabigatran, rivaroksaban, apiksaban i edoksaban, odobrene su od strane EMA-e i u kliničkoj su primjeni u RH.

Preporuke koje navodimo u nastavku temelje se na do sada objavljenim preporukama od strane krovnih stručnih organizacija (ICSH, *Međunarodni savjet za standardizaciju u hematologiji*) kao i na rezultatima provedenog istraživačkog projekta *LAB-NOAC*, IP-2016-06-8208.

Prijeanalitički čimbenici

1. Za sve kvantitativne metode određivanja koncentracije DOAK-a na automatiziranim koagulometrima analitički uzorak je isključivo plazma koja se dobiva centrifugiranjem (10 minuta na 4000 okretaja/min) uzorka venske krvi uzete na antikoagulans 3,2 %-tni natrijev citrat.
2. Za određivanje koncentracije DOAK lijekova LC/MS-MS metodom kao analitički uzorak mogu se koristiti plazma ili serum.
3. Koncentracije DOAK lijekova u serumu i plazmi se razlikuju. Ako se određivanje koncentracije DOAK lijekova LC/MS-MS metodom izvodi u serumu, očekivane terapijske vrijednosti za uzorak plazme navedene u Tablici 1 ne odnose se na serum.
4. Stabilnost uzorka plazme za određivanje koncentracije dabigatrana je 24 sata na sobnoj temperaturi i na temperaturi hladnjaka (2 – 8 °C).

5. Za određivanje koncentracije rivaroksabana i apiksabana, stabilnost uzorka plazme je 8 sati na sobnoj temperaturi i 48 sati na temperaturi hladnjaka ($2 - 8^{\circ}\text{C}$).
6. Stabilnost uzorka plazme za edoksaban se smanjuje tijekom pohrane 8 sati na sobnoj temperaturi pa je određivanje edoksabana potrebno učiniti unutar 4 sata od uzorkovanja, kao i za sve ostale koagulacijske pretrage.
7. Ukoliko se određivanje koncentracije odgovarajućeg DOAK lijeka ne može učiniti unutar navedenog prihvatljivog vremena u uzorku plazme, preporučuje se zamrzavanje plazme na $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
8. Stabilnost zamrznutog uzorka plazme na $\leq -20^{\circ}\text{C}$ za određivanje koncentracije DOAK lijekova iznosi 14 mjeseci za dabigatran i najmanje 30 dana za sve lijekove iz skupine direktnih inhibitora FXa.
9. Ukoliko se iz uzorka plazme osim koncentracije odgovarajućeg DOAK lijeka određuju i hitne koagulacijske pretrage (PV, APTV, TV, fibrinogen) i/ili specifične koagulacijske pretrage, uzorak je potrebno analizirati unutar 4 sata od uzorkovanja krvi za sve koagulacijske pretrage, dok se koncentracija DOAK lijeka iz svježeg uzorka plazme može odrediti u skladu sa stabilnošću navedenom u točkama 4 do 6.
10. Ukoliko se analiza ne može učiniti unutar 4 sata od uzorkovanja, pretraga se izvodi iz uzorka plazme zamrznutog na $\leq -20^{\circ}\text{C}$ uz stabilnost najmanje 30 dana.
11. Iako ispitivanja višekratnih ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja nisu pokazala značajne razlike u stabilnosti uzorka plazme za određivanje DOAK lijekova kvantitativnim koagulacijskim metodama, preporučuje se isključivo postupak jednokratnog zamrzavanja ($\leq -20^{\circ}\text{C}$) i odmrzavanja (tijekom 15 minuta na 37°C) uzorka za određivanje koncentracije DOAK-a, kao i za sve ostale koagulacijske pretrage.
12. U svrhu dugotrajne pohrane uzorka plazme (> 1 mjesec), preporučuje se pohrana zamrzavanjem na $\geq -60^{\circ}\text{C}$.

13. DOAK lijekovi imaju značajan utjecaj na rezultat probirnih kao i na rezultate većine specifičnih koagulacijskih pretraga (pretrage probira na trombofiliju, određivanje faktora zgrušavanja) u smislu lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata. Utjecaj na pojedine koagulacijske pretrage različit je i ovisi o vrsti DOAK lijeka (direktni inhibitori trombina vs. direktni inhibitori FXa), koncentraciji DOAK lijeka (minimalna vs. vršna koncentracija) i o metodi određivanja pojedinih pretraga (koagulometrijske vs. kromogene). Poznavanje utjecaja pojedinih DOAK lijekova na probirne i specifične koagulacijske pretrage ključno je za pravilnu interpretaciju analitičkih rezultata.
14. S obzirom da DOAK lijekovi mogu utjecati na rezultate pojedinih specifičnih koagulacijskih pretraga i pri minimalnim koncentracijama lijeka u cirkulaciji (neposredno prije sljedeće doze), određivanje pretraga na koje DOAK lijekovi imaju utjecaj ne preporučuje se ni pri minimalnim koncentracijama lijeka (prije uzimanja lijeka na dan uzorkovanja).
15. Specifične koagulacijske pretrage za koje postoji značajan utjecaj određenog DOAK lijeka na rezultat, potrebno je, kad god je to moguće, odgoditi do završetka liječenja.
16. Uzorkovanje krvi za specifične koagulacijske pretrage na čiji rezultat utječu DOAK lijekovi, izvodi se uz odgodu, u razmaku od najmanje 3 dana od prestanka uzimanja lijeka (ili više dana u bolesnika s bubrežnom insuficijencijom).
17. Ako nije moguće odgoditi određivanje specifičnih koagulacijskih pretraga na čiji rezultat utječu DOAK lijekovi, može se primijeniti *in vitro* metoda uklanjanja lijeka iz plazme pripravcima na bazi aktivnog ugljena (komercijalni pripravci *DOAC-Stop™*, *DOAC-Remove™* ili tzv. *in house* optimirana metoda s aktivnim ugljenom) kojom se iz plazme postupkom centrifugiranja uklanja lijek (adsorpcija lijeka na aktivni ugljen) nakon čega se u uzorku plazme mogu odrediti specifične koagulacijske pretrage.

18. Svaki zahtjev za određivanjem koncentracije DOAK lijeka treba sadržavati podatak o zadnjoj dozi lijeka. U slučaju nedostupnosti ovog podatka (npr. u hitnim stanjima) potrebno je na nalazu naznačiti da je nepoznato vrijeme uzimanja zadnje doze lijeka.
19. Nefrakcionirani i niskomolekularni heparin u terapijskim dozama (za razliku od profilaktičkih doza) mogu interferirati u određivanju koncentracije DOAK lijekova iz skupine direktnih inhibitora FXa u smislu lažno viših vrijednosti DOAK lijekova. Stoga je u slučaju privremenog prijelaza s DOAK lijeka na heparin pri određivanju ostatne koncentracije DOAK-a u plazmi (nakon ukidanja lijeka) potrebno poznavati podatak o terapiji heparinom.
20. Vrijeme uzorkovanja za određivanje koncentracije DOAK lijeka u ne-hitnim stanjima
 - u bolesnika starije životne dobi (> 70 god.) i bolesnika s bubrežnom insuficijencijom s/bez hemodijalize ili pri sumnji na interakciju s drugim lijekovima, potrebno je odrediti minimalnu koncentraciju DOAK lijeka (uzorkovanje krvi neposredno prije sljedeće doze) uz uvjet da je bolesnik uzeo uzastopno najmanje 5 doza lijeka čime se osigurava stabilno ravnotežno stanje koncentracije lijeka u cirkulaciji,
 - kod bolesnika s indeksom tjelesne mase (BMI) $> 40 \text{ kg/m}^2$ potrebno je odrediti i minimalnu (neposredno prije sljedeće doze) i vršnu (2 sata nakon uzimanja lijeka) koncentraciju DOAK lijeka uz uvjet da je bolesnik uzeo uzastopno najmanje 5 doza lijeka čime se osigurava stabilno ravnotežno stanje koncentracije lijeka u cirkulaciji,
 - prije planiranog operativnog zahvata s visokim rizikom od krvarenja potrebno je odrediti koncentraciju DOAK lijeka unutar nekoliko sati prije planiranog zahvata u svrhu isključivanja klinički značajne koncentracije ($\geq 30 \text{ ng/mL}$) u cirkulaciji, uz uvjet da kod bolesnika prethodno privremeno

- ukinuta terapija najmanje 12 ili 24 sata (ovisno o tome uzima li se lijek jednom ili dvaput dnevno),
- pri istodobnoj primjeni drugih lijekova koji u kombinaciji s DOAK-om mogu rezultirati lijek-lijek interakcijama potrebno je odrediti minimalnu i vršnu koncentraciju DOAK lijeka uz uvjet da je bolesnik uzeo uzastopno najmanje 5 doza lijeka čime se osigurava stabilno ravnotežno stanje koncentracije lijeka u cirkulaciji,
 - pri sumnji na nepridržavanje zadane terapije potrebno je odrediti minimalnu i vršnu koncentraciju DOAK lijeka uz uvjet da je prošlo vrijeme za uzastopno najmanje 5 doza lijeka čime se osigurava stabilno ravnotežno stanje koncentracije lijeka u cirkulaciji.

U svim navedenim ne-hitnim stanjima, uz određivanje minimalne koncentracije DOAK lijeka, preporučuje se i dodatno određivanje vršne koncentracije lijeka u istom danu, kad god je to moguće. Određivanje i minimalne i vršne koncentracije lijeka pruža bolji uvid o dinamici koncentracija lijeka u cirkulaciji pojedinog bolesnika.

Vrijeme uzorkovanja za određivanje koncentracije DOAK lijeka u hitnim stanjima nije moguće definirati s obzirom na minimalnu ili vršnu koncentraciju te se uzorkovanje izvodi tijekom hitne obrade bolesnika kod:

- akutnog krvarenja i donošenja odluke o potrebi hitnog poništavanja učinka lijeka (primjena specifičnih antidota) ili odluke o vremenu izvođenja hitnog operativnog zahvata; koncentraciju DOAK lijeka u plazmi potrebno je odrediti da bi se isključile klinički značajne koncentracije lijeka u plazmi ($\geq 30 \text{ ng/mL}$ u bolesnika kod kojih je potreban hitan operativni zahvat, odnosno $\geq 50 \text{ ng/mL}$ u bolesnika s akutnim krvarenjem s/bez potrebe za hitnim operativnim zahvatom),

- povećanog rizika krvarenja: bolesnici s bubrežnom insuficijencijom (akumulacija zbog usporene eliminacije lijeka), s bolestima jetre, sumnje na predoziranje lijekom, bolesnika sa znakovima krvarenja, zbog donošenja kliničke odluke o trombolitičkoj terapiji ovisno o koncentraciji DOAK lijeka u cirkulaciji,
- tromboembolijskih događaja tijekom terapije DOAK lijekom,
- ostalih hitnih stanja za koje liječnik procjeni da je potrebno odrediti koncentraciju DOAK lijeka u cirkulaciji.

Analitički čimbenici

1. Utjecaj pojedinih DOAK lijekova na probirne koagulacijske pretrage PV, APTV i TV ovisi o vrsti lijeka (direktni inhibitori trombina ili FXa), pojedinom lijeku iste skupine (rivaroksaban vs apiksaban i edoksaban), koncentraciji lijeka (minimalna ili vršna koncentracija) i osjetljivosti različitih komercijalnih reagensa za istu probirnu pretragu.
2. Zbog nestandardiziranosti i nespecifičnosti, probirne koagulacijske pretrage PV, APTV i TV nisu prikladne za procjenu koncentracije i/ili antikoagulacijskog učinka DOAK lijekova.
3. Pretraga TV izuzetno je osjetljiva na dabigatran pa rezultat TV-a unutar referentnog intervala, neovisno o korištenom reagensu, isključuje klinički značajnu koncentraciju ($\geq 30 \text{ ng/mL}$) dabigatrana u plazmi.
4. Koncentracije dabigatrana $\geq 30 \text{ ng/mL}$ rezultiraju produženim TV-om, a koncentracije dabigatrana $\geq 50 \text{ ng/mL}$ nemjerljivo produženim TV-om (iznad gornje granice mjernog raspona), te se pretraga TV zbog preosjetljivosti na dabigatran ne može koristiti za kvantitativnu procjenu koncentracije ili antikoagulacijskog učinka dabigatrana.

5. DOAK lijekovi iz skupine direktnih inhibitora FXa ne utječu na rezultat pretrage TV-a.
6. Za procjenu doziranosti i/ili antikoagulacijskog učinka DOAK lijekova potrebno je koristiti isključivo specifične kvantitativne metode određivanja koncentracije DOAK lijekova.
7. LC/MS-MS analitička metoda predstavlja zlatni standard za određivanje koncentracije DOAK lijekova u širokom koncentracijskom rasponu od 5 - 500 ng/mL. Zbog tehničke zahtjevnosti, educiranosti osoblja, skupoće opreme i posljedične nedostupnosti u većini laboratorija, ova metoda nije prikladna za svakodnevni rad, odnosno izvan istraživačkih institucija.
8. Specifične koagulometrijske i kromogene metode na automatiziranim koagulometrima omogućuju pouzdano kvantitativno određivanje koncentracije DOAK lijekova u širokom koncentracijskom rasponu od 20 - 500 ng/mL, što ih čini prikladnima za mjerenje i minimalnih i vršnih koncentracija lijeka u cirkulaciji.
9. Kvantitativne metode na automatiziranim koagulometrima omogućuju određivanje koncentracije DOAK lijekova unutar 60 minuta, a u iznimnim slučajevima i unutar 30 minuta od uzorkovanja krvi, što zadovoljava zahtjev za izdavanjem nalaza u svim hitnim stanjima u kojima je potrebno odrediti koncentraciju DOAK lijeka.
10. Za određivanje koncentracije dabigatrana dostupne su koagulometrijske (dTV i ECT) i kromogene (ECA i anti-FIIa) za kvantitativno određivanje koncentracije dabigatrana pri čemu se za svaku navedenu metodu kalibracija izvodi primjenom specifičnog kalibratora, u ovom slučaju dabigatrana.
11. Kromogene metode za dabigatran (ECA i anti-FIIa) metode su izbora jer na rezultat ne utječu vrijednosti fibrinogena i FII (protrombina) za razliku od koagulometrijskih metoda (dTV i ECT).

12. Za određivanje koncentracije DOAK lijekova iz skupine direktnih inhibitora FXa dostupne su kromogene metode koje se temelje na anti-FXa metodi uz primjenu kalibratora specifičnih za lijek koji se određuje.
13. Prije uvođenja svake pojedine metode određivanja koncentracije DOAK lijeka u svakodnevni rad potrebno je napraviti validaciju analitičke metode prema unaprijed definiranim kriterijima validacijskog postupka za kvantitativne automatizirane metode.
14. Primjena anti-FXa metode kalibrirane za nefrakcionirani ili niskomolekularni heparin nije prikladna za procjenu antikoagulacijskog učinka ili koncentracije pojedinih DOAK lijekova iz skupine direktnih inhibitora FXa zbog nespecifičnosti i nestandardiziranosti.
15. Kod bolesnika kod kojih je preoperativno privremeno ukinut DOAK lijek i uveden nefrakcionirani ili niskomolekularni heparin u terapijskoj dozi, određivanje koncentracije DOAK lijeka iz skupine direktnih inhibitora FXa nije pouzdano zbog interferencije heparina u smislu lažno povećane koncentracije DOAK lijeka s obzirom da je isto načelo određivanja anti-FXa metodom i za heparine i za direktne inhibitore FXa.
16. Ukoliko laboratorij nije u mogućnosti izvoditi kvantitativne automatizirane metode određivanja DOAK lijekova, u hitnim stanjima preporučuje se primjena kvalitativne metode za DOAK lijekove kojom je moguće isključiti prisutnost klinički značajne koncentracije DOAK lijeka (npr. DOASENSE test trake za dokazivanje prisutnosti lijeka u urinu).
17. Kvalitativne probirne metode određivanja DOAK lijeka u urinu nisu prikladne za procjenu koncentracije lijeka u cirkulaciji.
18. Negativan rezultat probirne metode za DOAK lijekove u urinu isključuje prisutnost klinički značajne koncentracije ($\geq 30 \text{ ng/mL}$) DOAK lijekova u cirkulaciji. Suprotno, pozitivan rezultat probirne metode za DOAK lijekove u urinu upućuje na prisutnost DOAK

lijeka u cirkulaciji u koncentraciji približno ili iznad vrijednosti koja je klinički značajna ($\geq 30 \text{ ng/mL}$). Sljedeći dijagnostički korak treba biti isključivo kvantitativno određivanje koncentracije odgovarajućeg DOAK lijeka u plazmi specifičnom metodom.

19. Pretrage uz bolesnika kojima se procjenjuje globalna koagulabilnost i fibrinoliza cirkulirajuće krvi (tromboelastografija, tromboelastometrija, test stvaranja trombina i dr.) nisu prikladne za procjenu antikoagulacijskog učinka ili koncentracije DOAK lijekova te se u tu svrhu ne preporučuje njihova primjena zbog nedovoljne osjetljivosti i nestandardiziranosti.
20. Za sve metode određivanja koncentracije DOAK-a koje su u primjeni potrebno je izvoditi unutarnju analitičku kontrolu najmanje jednom u 24 sata na dvije razine koncentracije lijeka (niska i visoka).
21. Za sve metode određivanja koncentracije DOAK lijekova u primjeni preporučuje se uključivanje u program vanjske kontrole kvalitete.

Poslijeanalitički čimbenici

1. Rezultat kvantitativnih metoda određivanja koncentracije DOAK lijekova izražava se isključivo mjernom jedinicom ng/mL.
2. Iako nisu definirane terapijske vrijednosti za pojedine DOAK lijekove i kliničke indikacije, potrebno je uz rezultat pretrage na nalazu navoditi i odgovarajuće očekivane minimalne (MK) i vršne (VK) koncentracije za pojedinu dozu lijeka i kliničku indikaciju (Tablica 8).
3. Rezultat mjerena koncentracije odgovarajućeg DOAK lijeka mora se uvijek interpretirati u skladu s anamnestičkim podacima bolesnika, dozom lijeka i vremenom uzorkovanja krvi u odnosu na zadnju dozu lijeka.

Tablica 8. Očekivane terapijske minimalne (MK) i vršne (VK) koncentracije DOAK lijekova s obzirom na kliničku indikaciju i dozu lijeka.

Preuzeto iz: Douxfils J i sur. 2021 Update of the International Council for Standardization in Haematology Recommendations for Laboratory Measurement of Direct Oral Anticoagulants. *Thromb Haemost* 2021;121:1008-20.

	Dabigatran		Rivaroksaban				Apiksaban				Edoksaban	
	NVAF ̄x (10 - 90 percentil)	VTE medijan (IQR)	NVAF ̄x (5 - 95 percentil)	VTE ̄x (10 - 90 percentil)	ACS ̄x (10 - 90 percentil)	NVAF medijan (5 - 95 percentil)	VTE medijan (5 - 95 percentil)	NVAF medijan (IQR)	VTE medijan (IQR)	VTE medijan (IQR)	VTE medijan (IQR)	
Indi- kacija	2x150	2x150	1x20	1x20	1x10	1x2,5	2x5	2x2,5	2x10	2x5	1x30	1x60
Doza, mg	91 (40-215)	60 (39-95)	44 (12-137)	32 (6-239)	14 (4-51)	9 (4-18)	103 (41-230)	79 (34-162)	120 (41-335)	63 (22-177)	32 (11-90)	36 (19-62)
MK, ng/mL	175 (74-383)	175 (117-275)	249 (184-343)	215 (22-535)	101 (7-273)	47 (13-123)	171 (91-321)	123 (69-221)	251 (111-572)	132 (59-302)	67 (30-153)	170 (125-245)
VK, ng/ ml											85 (55-120)	170 (125-245)

MK=minimalna konc. lijeka, VK=vršna konc. lijeka, NVAF=ne-valvularna fibrilacija atrija, ACS = akutni koronarni sindrom; \bar{x} = srednja vrijednost; IQR – interkvartilni raspon

LITERATURA

1. Blommel ML, Blommel AL. Dabigatran etexilate: A novel oral direct thrombin inhibitor. American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of HealthSystem Pharmacists. 2011;68:1506–19.

2. Laizure SC, Parker RB, Herring VL, Hu ZY. Identification of carboxylesterase-dependent dabigatran etexilate hydrolysis. Drug Metab Dispos. 2014;42:201–6.

3. Pradaxa: Summary of Product Characteristics.

Available online:https://www.ema.europa.eu/en/documents/productinformation/pradaxa-epar-productinformation_en.pdf (pristupljeno 15.06.2022.)

4. Bertoletti L, Ollier E, Duvillard C, Delavenne X, Beyens MN, De Magalhaes E, Bellet F, Basset T, Mismetti P, Laporte S. Direct oral anticoagulants: Current indications and unmet needs in the treatment of venous thromboembolism. Pharmacol Res 2017;118:33–42.

5. O'Connor CT, Kiernan TJ, Yan, BP. The genetic basis of antiplatelet and anticoagulant therapy: A pharmacogenetic review of newer antiplatelets (clopidogrel, prasugrel and ticagrelor) and anticoagulants (dabigatran, rivaroxaban, apixaban and édoxaban). Expert Opin Drug Metab Toxicol 2017;13:725–39.

6. Xarelto: Summary of Product Characteristics. Available online:https://www.ema.europa.eu/en/documents/productinformation/xarelto-epar-product-information_en.pdf (pristupljeno 15.6.2022.)

7. Eliquis: Summary of Product Characteristics. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/productinformation/eliquis-epar-product-information_en.pdf (pristupljeno 15.6.2022.)

8. Lixiana: Summary of Product Characteristics. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/productinformation/lixiana-epar-product-information_en.pdf (pristupljeno 5.6.2022.)

9. Palladino M, Merli G, Thomson L. Evaluation of the oral direct factor Xa inhibitor-Betrixaban. Expert Opin Investig Drugs 2013;22:1465–72.

10. Bevyxxa: Highlights of Prescribing Information. Available online: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/208383s000lbl.pdf (pristupljeno 15.6.2022.)

11. Kanuri SH, Kreutz RP. Pharmacogenomics of Novel Direct Oral Anticoagulants: Newly Identified Genes and Genetic Variants. *J Pers Med* 2019;17:9:7.
12. Picard N, Boyer JC, Etienne-Grimaldi MC, Barin-Le Guellec C, Thomas F, Loriot MA. French National Network of Pharmacogenetics (RNPGx). Pharmacogenetics-based personalized therapy: Levels of evidence and recommendations from the French Network of Pharmacogenetics (RNPGx). *Therapie* 2017;72:185–92.
13. Raymond J, Imbert L, Cousin T, Duflot T, Varin R, Wils J, Lamoureux F. Pharmacogenetics of Direct Oral Anticoagulants: A Systematic Review. *J Pers Med* 2021;11:37.
14. Dimatteo C, D'Andrea G, Vecchione G, Paoletti O, Cappucci F, Tiscia, GL, Buono M, Grandone E, Testa S, Margaglione M. Pharmacogenetics of dabigatran etexilate interindividual variability. *Thromb Res* 2016;144:1–5.
15. Shi J, Wang X, Nguyen J, Bleske BE, Liang Y, Liu L, Zhu HJ. Dabigatran Etexilate Activation is Affected by the CES1 Genetic Polymorphism G143E (rs71647871) and Gender. *Biochem Pharmacol* 2016;119:76–84.
16. Gouin-Thibault I, Delavenne X, Blanchard A, Siguret V, Salem JE, Narjoz C, Gaussem P, Beaune P, Funck-Brentano C, Azizi M, Mismetti P, Loriot MA. Interindividual variability in dabigatran and rivaroxaban exposure: contribution of ABCB1 genetic polymorphisms and interaction with clarithromycin. *J Thromb Haemost* 2017;15:273–83.
17. Lenoir C, Terrier J, Gloor Y, Gosselin P, Daali Y, Combescure C, Desmeules JA, Samer CF, Reny JL, Rollason V. Impact of the Genotype and Phenotype of CYP3A and P-gp on the Apixaban and Rivaroxaban Exposure in a Real-World Setting. *J Pers Med* 2022;12:526.
18. Gulilat M, Keller D, Linton B, Pananos AD, Lizotte D, Dresser GK, Jeffrey A, Tirona RG, Kim RB, Ute I Schwarz UI. Drug interactions and pharmacogenetic factors contribute to variation in apixaban concentration in atrial fibrillation patients in routine care. *J Thromb Thrombolysis* 2020;49:294–303.
19. Ferri N, Colombo E, Tenconi M, Baldessin L, Corsini A. Drug-Drug Interactions of Direct Oral Anticoagulants (DOACs): From Pharmacological to Clinical Practice. *Pharmaceutics* 2022;14:1120.
20. Wieland E, Shipkova M. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Drug Monitoring of Direct-Acting Oral Anticoagulants: Where Do We Stand? *Therapeutic Drug Monitoring* 2019;41:180–91.
21. Adcock DM, Gosselin R. Direct Oral Anticoagulants (DOACs) in the Laboratory: 2015 Review. *Thromb Res* 2015;136:7–12.

22. Baglin T, Hillarp A, Tripodi A, Elalamy I, Buller H, Ageno W. Measuring Oral Direct Inhibitors (ODIs) of thrombin and factor Xa: a recommendation from the Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 2013;11:756-60.
23. Gosselin R, Adcock DM. The laboratory's 2015 perspective on direct oral anticoagulant testing. *J Thromb Haemost* 2016;14:886-93.
24. Gosselin RC, Adcock DM, Bates SM, Douxfils J, Favaloro EJ, Gouin-Thibault I i sur. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) Recommendations for Laboratory Measurement of Direct Oral Anticoagulants. *Thromb Haemost* 2018;118:437-50.
25. Dunois C. Laboratory Monitoring of Direct Oral Anticoagulants (DOACs) Review. *Biomedicines* 2021;9:445.
26. Douxfils J, Adcock DM, Bates SM, Favaloro EJ, Gouin-Thibault I, Guillermo C i sur. 2021 Update of the International Council for Standardization in Haematology Recommendations for Laboratory Measurement of Direct Oral Anticoagulants. *Thromb Haemost* 2021;121:1008-20.
27. Lim MS, Chapman K, Swanepoel P, Enjeti AK. Sensitivity of routine coagulation assays to direct oral anticoagulants: patient samples versus commercial drug-specific calibrators. *Pathology* 2016;48:712-9.
28. Douxfils J, Ageno W, Samama CM, Lessire S, Ten Cate H, Verhamme P Dogme JM, Mullier F. Laboratory testing in patients treated with direct oral anticoagulants: a practical guide for clinicians. *J Thromb Haemost*. 2018;16:209-19.
29. Bonar R, Favaloro EJ, Mohammed S, Mohammed S, Pasalic L, Sioufi J, Marsden K. The effect of dabigatran on haemostasis tests: a comprehensive assessment using in-vitro and ex-vivo samples. *Pathology* 2015;47:355-64.
30. Favaloro EJ, Pasalic L, Curnow J, Lippi G. Laboratory monitoring or measurement of direct oral anticoagulants (DOACs): advantages, limitations and future challenges. *Curr Drug Met* 2017;18:598-608.
31. Gosselin RC, Adcock DM, Douxfils J. An update on laboratory assessment for direct oral anticoagulants (DOACs). *Int J Lab Hematol* 2019;41:33-9.
32. Platton S, Hunt C. Influence of DOAC Stop on coagulation assays in samples from patients on rivaroxaban or apixaban. *Int J Lab Hematol* 2018;41:227-33.
33. Favresse J, Lardinois B, Sabor L, Devalet B, Vandepapeliere J, Braibant M, Lessire S, Chatelain B, Jacqmin H, Douxfils J, Mullier F. Evaluation of the DOAC-Stop Procedure to Overcome the Effect of DOACs on Several Thrombophilia Screening Tests TH Open 2018;2:e202-e209.

34. Exner T, Michalopoulos N, Pearce J, Xavier R, Ahuja M. Simple method for removing DOACs from plasma samples. *Thromb Res* 2018;163:117-22.
35. Siriez R, Dogne JM, Gosselin R, Laloy J, Mullier F, Douxfils J. Comprehensive review of the impact of direct oral anticoagulants on thrombophilia diagnostic tests: practical recommendations for the laboratory. *Int J Lab Hematol* 2020;00:1-14.
36. Dunois C. Laboratory monitoring of direct oral anticoagulants (DOACs). *Biomedicines* 2021;9:445.
37. Levy JH, Ageno W, Chan NC, Crowther M, Verhamme P, Weitz JI, for the Subcommittee on Control of Anticoagulation. When and how to use antidotes for the reversal of direct oral anticoagulants: guidance from the SSC of the ISTH *J Thromb Haemost* 2016;14:623-7.
38. Shaw JR, Li N, Vanassche T, Coppens M, Spyropoulos AC, Syed S, Radwi M, Duncan J, Schulman S, Douketis J. Predictors of preprocedural direct oral anticoagulant levels in patients having an elective surgery or procedure. *Blood Adv* 2020;4:3520-7.
39. Douketis JD, Spyropoulos AC, Duncan J, Carrier M, Le Gal G, Tafur AJ, Verhamme P, Shivakumar S, Le Gross P, Lee AYY, Yeo E i sur. Perioperative management of patients with atrial fibrillation receiving a direct oral anticoagulant. *JAMA Intern Med* 2019;179:1469-78.
40. Ćelap I, Margetić S, Brčić M, Mihić R. Analytical verification and comparison of chromogenic assays for dabigatran, rivaroxaban and apixaban determination on BCSXP and STA Compact Max analyzers. *Biochem Med* 2020;30:010706.
41. Margetić S, Ćelap I, Delić Brkljačić D, Pavlović N, Šupraha Goreta S, Kobasić I, Lovrenčić-Huzjan A, Bašić Kes V. Chromogenic anti-FXa assay calibrated with low molecular weight heparin in patients treated with rivaroxaban and apixaban: possibilities and limitations. *Biochem Med* 2020;30:01070.
42. Margetić S, Ćelap I, Lovrenčić Huzjan A, Bosnar Puretić M, Šupraha Goreta S, Čajević Glojnarić, Delić Brkljačić D, Mioč P, Harenberg J, Hetjens S, Weiss C. DOAC Dipstick testing can reliably exclude the presence of clinically relevant DOAC concentrations in circulation. *Thromb Haemost* 2022;9:1542-8..
43. Cox-Morton S, MacDonald S, Thomas W. Adiagnostic solution for haemostasis laboratories for patients taking direct oral anticoagulants using DOAC-Remove. *Br J Haematol* 2019;187:377-85.
44. Exner T, Michalopoulos N, Pearce J, Xavier R, Ahuja M. Simple method for removing DOACs from plasma samples. *Thromb Res* 2018;163:117-22.

PRILOG

Literaturni navodi objavljenih radova istraživačkog projekta

Novi oralni antikoagulansi: povezanost koncentracije i antikoagulantnog učinka lijeka

LAB-NOAC IP-2016-06-8208

Kao prilog ovom priručniku prilažemo literaturne navode objavljenih rezultata istraživačkog projekta HRZZ-a: *Novi oralni antikoagulansi: povezanost koncentracije i antikoagulantnog učinka lijeka (LAB-NOAC IP-2016-06-8208)*.

Svi objavljeni rezultati dostupni su na mrežnoj stranici <https://www.kbcsm.hr/zavodi/klinicki-zavod-za-kemiju/hrzz-novi-oralni-antikoagulansi-lab-noc-ip-2016-06-8208/>.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi

1. Margetić S, Šupraha Goreta S, Ćelap I, Razum M. Direct oral anticoagulants (DOACs): from the laboratory point of view. *Acta Pharm* 2022;72:459-482.
2. Margetić S, Ćelap I, Lovrenčić Huzjan A, Bosnar Puretić M, Šupraha Goreta S, Čajević Glojnarić, Delić Brkljačić D, Mioč P, Harenberg J, Hetjens S, Weiss C. DOAC Dipstick testing can reliably exclude the presence of clinically relevant DOAC concentrations in circulation. *Thromb Haemost* 2022; 9:1542-8.
3. Ćelap I, Margetić S, Brčić M, Mihić R. Analytical verification and comparison of chromogenic assays for dabigatran, rivaroxaban and apixaban determination on BCSXP and STA Compact Max analyzers. *Biochem Med* 2020;30:010706.
4. Margetić S, Ćelap I, Delić Brkljačić D, Pavlović N, Šupraha Goreta S, Kobasić I, Lovrenčić-Huzjan A, Bašić Kes V. Chromogenic anti-FXa assay calibrated with low molecular weight heparin in patients treated with rivaroxaban and apixaban: possibilities and limitations. *Biochem Med* 2020;30:01070.
5. Vuga I, Šupraha Goreta S, Margetić S. Direktni oralni antikoagulacijski lijekovi. *Farm Gl* 2018;74:633-52.

Posterski radovi prikazani na međunarodnim znanstvenim skupovima

1. Margetić S, Ćelap I, Šupraha Goreta S. FVIII and D-dimer values at trough and peak concentrations of direct oral anticoagulants: important considerations for using these tests in assisting clinical decision for risk stratification scheme. <https://abstracts.isth.org/abstract/fviii-and-d-dimer-values-at-trough-and-peak-concentrations-of-direct-oral-anticoagulants-important-considerations-for-using-these-tests-in-assisting-clinical-decision-for-risk-stratification-scheme/>. Accessed July 27, 2022.
2. Ćelap I, Margetić S, Periša J, Razum M, Šupraha Goreta S, Čajević Glojnarić A. Exclusion of relevant concentrations of direct oral anticoagulants in blood by DOAC Dipstick – proposal of a diagnostic algorithm for improvement of clinical decision-making in emergencies. <https://abstracts.isth.org/abstract/exclusion-of-relevant-concentrations-of-direct-oral-anticoagulants-in-blood-by-doac-dipstick-proposal-of-a-diagnostic-algorithm-for-improvement-of-clinical-decision-making-in-emergencies/>. Accessed July 28, 2022.3.
3. Bronic A, Margetic S, Elabjer E, Blažević D, Cuti T, Bencic I, Vidovic D. Results of the thrombin time test obtained with two different commercial reagents in real life patients treated with dabigatran. <https://abstracts.isth.org/abstract/results-of-the-thrombin-time-test-obtained-with-two-different-commercial-reagents-in-real-life-patients-treated-with-dabigatran/>. Accessed July 28, 2022.
4. Margetić S, Ćelap I, Lovrenčić-Huzjan A, Mioc P, Delić-Brkljačić D, Šupraha-Goreta S, Harenberg J. Comparison of the sensitivity and specificity of rivaroxaban, apixaban and dabigatran concentrations measured in urine samples by the DOAC dipstick with the cut-off plasma concentration of 30 ng/mL. 66th Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research. Best poster award GTH2022 - nagrada za najbolji posterski rad na GTH2022 kongresu.
5. Margetić S; Lovrenčić-Huzjan A; Ćelap I; Šupraha Goreta S; Harenberg J. Impact of DOAC Dipstick test and relation to plasma and urine concentrations to exclude the presence of clinically relevant concentrations of DOACs in real-life patient setting – study protocol and case reports. Hämostaseologie 2021;41(S01):35
6. Margetić S, Ćelap I, Buben J, Razum M, Šupraha-Goreta S. Activated charcoal can be used as an effective in vitro removal agent of direct oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban and apixaban in plasma of patients with protein S activity testing. Res Pract Thromb Haemost 2021;5(Suppl 1):e12589:279.
7. Margetić S, Ćelap I, Razum M, Mihić R, Šupraha-Goreta S. Comparison of D-dimer values at peak and trough concentrations of direct oral anticoagulants: result of D-dimer testing is not affected by plasma drug concentration. Res Pract Thromb Haemost 2021;5(Suppl 1):e12589:256.

8. Celap I, Margetic S, Obuljen J, Lenicek Krleza J, Linarić I, Razum M, Mihic R. Comparison of Peak Plasma Concentrations of Apixaban in Adolescent and Adult Patients. *Res Pract Thromb Haemost* 2021;5(Suppl 1):e12589:271.
9. Margetić S, Ćelap I, Delić-Brkljačić D, Harenberg J, Lovrenčić-Huzjan A, Mioč P, Šupraha Goreta S. Comparison of Visual Interpretation of the DOAC Dipstick Test with a Reader System for Rapid and Accurate Detection of Direct Oral Anticoagulants in Neurology and Cardiology – Interim Data from a Prospective Consecutive Comparative Study. *Res Pract Thromb Haemost* 2021;5(Suppl 1):e12589:295.
10. Margetić S, Ćelap I, Lovrenčić-Huzjan A, Bosnar Puretić M, Roje Bedeković M, Razum M, Mihić R, Šupraha Goreta S. Presentation of the Patient with Low Peak Dabigatran Levels in Plasma Suggests the Importance of Quantitative Measurement of DOAC Drugs in Clinical Decision Making and Treatment. *Res Pract Thromb Haemost*. 2021;5(Suppl 1):e12589:285.
11. Ćelap I, Margetić S, Mihić R, Šupraha Goreta S, Huzjan-Lovrenčić A, Kobasić I, Trbušić M. Presentation of Three Patients Treated with Dabigatran that Strongly Confirm the Importance of Quantitative Measurement of Dabigatran Concentration in Selected Clinical Situations: Case Reports. *Res Pract Thromb Haemost* 2020;4(Suppl 1):132.
12. Margetić S, Ćelap I, Mihić R, Supraha Goreta S. Does Normal Diluted Russell Viper Venom Time Test Result Can Exclude Concentrations of Direct Oral Anticoagulants below 30 ng/mL? *Res Pract Thromb Haemost* 2020;4(Suppl 1):262.
13. Margetić S, Ćelap I, Šupraha-Goreta S, Buben J, Mihić R. Effect of Activated Charcoal in Removing Interference in Thrombophilia Assays: Resistance to Activated Protein C, Activity of Coagulation Factor VIII and Antithrombin Activity. *Res Pract Thromb Haemost* 2020;4(Suppl 1):264.
14. Šupraha-Goreta S, Margetić S, Ćelap I, Mihić R. Comparison of Two Quantitative Methods for Determination of Dabigatran Concentration: Diluted Thrombin Time Test and Innovance Dabigatran Test in Real Life Patients Treated with Dabigatran. *Res Pract Thromb Haemost* 2020;4(Suppl 1):268.
15. Ćelap I, Margetić S, Mihić R, Obuljen J, Linarić I, Leniček Krleža J. Is Low Molecular Weight Heparin-Calibrated Chromogenic Anti-Xa Assay Suitable for Assessing Anticoagulant Effect of Apixaban in Adolescents? *Res Pract Thromb Haemost* 2020;4 (Suppl 1):1185.
16. Margetić S, Ćelap I, Brčić M, Mihić R. Comparison of peak and trough concentrations of dabigatran, rivaroxaban, and apixaban with the published expected values in patients with non valvular atrial fibrillation. *Res Pract Thromb Haemost* 2019;3(Suppl 1):3-4.

17. Ćelap I, Margetić S, Šupraha Goreta S, Buben J. Activated charcoal is an effective in vitro removal agent of dabigatran and rivaroxaban in plasma of patients who need lupus anticoagulant testing. Res Pract Thromb Haemost 2019;3(Suppl1):161.
18. Margetić S, Ćelap I, Šupraha-Goreta S, Mihić R1, Brčić M. Inter-individual variability of peak and trough plasma concentrations of dabigatran, rivaroxaban and apixaban in patients with non-valvular atrial fibrillation. Book of Abstracts 2019; 64th Annual Meeting, Society of Thrombosis and Haemostasis Research / Langer F, Renne T (ur.), pp 100-101.
19. Margetić S, Ćelap I, Šupraha Goreta S, Buben J, Mihić Roman. Effect of direct oral anticoagulants on dilute Russell 's viper venom time screen and confirm assays for lupus anticoagulant testing. 20th DLTH International Meeting Book of Abstracts, Antalija, Turska, 2019;pp 29.
20. Peran N, Margetić S, Surjan L, Gverić Krečak V, Tešija-Kuna A. Prikaz slučaja: Mjerjenje antikoagulacijskog učinka dabigatrana kod pacijentice s akutnim bubrežnim zatajenjem. Bioch Med 2018;28(Suppl1):S198-S199
21. Margetić S, Ćelap I, Bronić A, Vuga I. Relationship between dabigatran concentrations in plasma and results of routine coagulation assays PT, APTT, TT and fibrinogen. Res Pract Thromb Haemost 2018;2(Suppl1):226.

Diplomski radovi

1. Jelena Buben. Utjecaj novih oralnih antikoagulacijskih lijekova na probirne pretrage hemostaze, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020. Mentor: Šupraha Goreta Sandra, Margetić Sandra
2. Ana-Katarina Kralj. Verifikacija metoda za određivanje koncentracije novih oralnih antikoagulansa:dabigatrana, rivaroksabana i apiksabana. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018. Mentor: Nada Vrkić, Sandra Margetić

Rektorova nagrada za najbolje studentske znanstvene radeove Sveučilišta u Zagrebu za akademsku godinu 2018./2019.

Jelena Buben. Ispitivanje i usporedba učinka komercijalne DOAC-stop tablete i in house optimirane metode s medicinskim aktivnim ugljenom na uklanjanje interferencije direktnih oralnih antikoagulanlnih lijekova u određivanju pretrage lupus antikoagulans. Mentor: Sandra Šupraha Goreta, Sandra Margetić

