

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**MOŽNOSTI DETERKCE NEPŘÍMÝCH
INHIBITORŮ TROMBINU**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Autor: Monika Zhánělová
Studijní program: Chemie B1407
Studijní obor: Bioorganická chemie
Typ studia: prezenční
Vedoucí práce: Mgr. Luděk Slavík Ph.D.**

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci, dne ____.

Monika Zhánělová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce, Mgr. Lud'ku Slavíkovi Ph.D., za jeho cenné rady a připomínky a za čas, který mi během této práce věnoval. Mé díky patří rovněž celému kolektivu Koagulační laboratoře Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, který mi vždy vytvořil příjemné pracovní prostředí.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Monika Zhánělová

Název práce: Možnosti detekce nepřímých inhibitorů trombinu

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Koagulační laboratoř, Hemato-onkologická klinika FNOL

Školitel: Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2014

Abstrakt

Hemostáza je jedním z nejdůležitějších dějů odehrávajících se v lidském těle. Zabezpečuje konstantní oběh krve. Jedná se o velmi složitý proces sestávající ze tří fází – primární hemostázy, kdy dochází k aktivaci koagulačního systému, sekundární hemostázy, při které dochází k vlastnímu krevnímu srážení a z následné fibrinolýzy, během níž dochází k rozpuštění vzniklé sraženiny, aby se zamezilo vzniku trombózy.

Antikoagulancia jsou léky, které inhibují koagulaci ve fázi sekundární hemostázy. Jsou užívány při poruchách spojených s nadměrným srážením krve a také po chirurgických výkonech, kdy je nutno předcházet uvolnění tvořené sraženiny do krevního oběhu a tak vzniku trombózy.

Jedním z těchto léků je Rivaroxaban (Xarelto), přímý inhibitor srážecího faktoru FXa, který patří do skupiny moderních antikoagulancií vyznačujících se mnoha výhodami, mimo jiné perorálním užíváním, malým rizikem lékových a potravinových interakcí, rychlým nástupem i odezněním účinku nebo dobrou předvídatelností léčby.

Klíčová slova: hemostáza, antikoagulancia, rivaroxaban, TGA

Počet stran: 42

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Monika Zhanelova

Title: Possibilities of detection of indirect thrombin inhibitors

Type of thesis: Bachelor

Department: Coagulation Laboratory, Department of Haemato-Oncology, Palacky University Medical School and University Hospital, Olomouc

Advisor: Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.

The year of presentation: 2014

Abstract

Hemostasis is one of the most important processes which take part in human body. It maintains constant blood circulation. It is very complex process, which consists of three stages – primary hemostasis, during which the coagulation system is activated, secondary hemostasis, during which the blood clotting takes part, and fibrinolysis, the process of dissolving the blood clot in order to prevent trombosis.

Anticoagulants are drugs, which inhibit coagulation at the stage of secondary hemostasis. They are used to treat disorders connected with increased blood coagulation or after surgeries to prevent release of blood clot to the circulatory system – the trombosis.

Rivaroxaban (Xarelto), direct inhibitor of coagulation factor FXa, is one of them. It belongs to the group of modern anticoagulants which show certain advantages in comparison to older drugs – oral administration, low risk of food and drug-drug interactions, rapid onset and offset of action and predictable effect.

Key words: hemostasis, anticoagulants, rivaroxaban, TGA

Number of pages: 42

Language: Czech

Obsah

Teoretická část

1. Hemostáza	12
1.1. Primární hemostáza	12
1.2. Sekundární hemostáza	13
1.3. Fibrinolýza	15
1.4. Poruchy hemostázy	16
2. Látky ovlivňující hemostázu	17
2.1. Snížení hemostázy	17
2.1.1. Antiagregační látky	17
2.1.2. Antikoagulancia	17
2.1.3. Fibrinolytika	18
2.2. Podpora hemostázy	19
2.2.1. Hemostatika působící na úrovni primární hemostázy	19
2.2.2. Hemostatika působící na úrovni sekundární hemostázy	19
2.2.3. Hemostatika působící na úrovni fibrinolýzy	19
3. Gatrany a xabany – nová antikoagulancia	20
3.1. Gatrany	20
3.1.1. Dabigatran	21
3.2. Xabany	22
3.2.1. Apixaban	22
3.2.2. Rivaroxaban	23
3.3. Srovnání dabigatranu, apixabanu, rivaroxabanu	24
4. Monitorování antikoagulační léčby	25
4.1. Protrombinový čas PT	25
4.2. Aktivovaný Parciální tromboplastinový čas aPTT	26
4.3. Trombinový čas TT	26
4.4. Trombin generační test TGA	27
4.5. Stanovení koncentrace antikoagulancií v plazmě	28

Praktická část

1. Cíle praktické části	30
2. Experimentální vybavení	30
2.1. Přístrojové vybavení	30
2.2. Materiálové vybavení	30
3. Metodika TGA	31
3.1. Opakovatelnost metody	31
3.2. Vliv zamrazení	32
4. Soubor pacientů léčených rivaroxabanem	34
4.1. Výsledky	34
4.2. Statistické vyhodnocení	36
5. Soubor pacientů s <i>in vitro</i> přídatkem rivaroxabanu	38
6. Závěr a diskuze	41

Seznam tabulek

- Tabulka č.I – Přehled koagulačních faktorů
- Tabulka č.II – Srovnání dabigatranu, apixabanu, rivaroxabanu
- Tabulka č.III – Srovnání vhodnosti PT, aPTT, TT pro monitorování dabigatranu, rivaroxabanu, apixabanu
- Tabulka č.IV – Výsledky měření Opakovatelnost metody
- Tabulka č.V – Výsledky měření Vliv zamrazení
- Tabulka č.VI – Výsledky měření Kalibrační řady
- Tabulka č.VII – Výsledky měření plazmy pacientů užívajících rivaroxaban
- Tabulka č.VIII – Základní statistické charakteristiky
- Tabulka č.IX – Výsledky měření plazmy s *in vitro* přídatkem rivaroxabanu

Seznam obrázků

- Obrázek č.I – Koagulační kaskáda
- Obrázek č.II – Místo účinku gatanů a xabanů v koagulační kaskádě
- Obrázek č.III – Chemická struktura dabigatranu
- Obrázek č.IV – Chemická struktura apixabanu
- Obrázek č.V – Chemická struktura rivaroxabanu
- Obrázek č.VI – Trombinogram
- Obrázek č.VII – Trombinogram u měření opakovatelnosti metody
- Obrázek č.VIII – Trombinogram u měření vlivu zamrazení
- Obrázek č.IX – Trombinogram pacienta léčeného rivaroxabanem
- Obrázek č.X – Trombinogram pacienta s *in vitro* přídatkem rivaroxabanu

Seznam grafů

- Graf I – $tLag = f(c)$
- Graf II – $Peak = f(c)$
- Graf III – $AUC = f(c)$

Seznam použitých zkratk

- ADP - adenosindifosfát
- APC – aktivní protein C
- aPTT – aktivovaný parciální tromboplastinový čas
- ASA – kyselina acetylsalicylová
- ATIII – antitrombin III
- AUC – area under curve
- COX₂ – cyklooxygenáza 2
- CYP – cytochrom P450
- dTT – dilutovaný trombinový čas
- EACA – kyselina epsilonaminokapronová
- FDP – fibrin degradační produkty
- FI – fibrinogen
- FII – protrombin
- FV – proakcelerin
- FVII – prokonvertin
- FVIII – antihemofilický faktor
- FIX – antihemofilický faktor B
- FX – Stuart-Prowerův faktor
- FXI – antihemofilický faktor C
- FXII – Hagemanův faktor
- FXIII – fibrin stabilizující faktor
- GPIb – glykoprotein Ib
- GPIIb/IIIa – glykoprotein IIb/IIIa
- HCII – heparinový kofaktor II
- HMWK – vysokomolekulární kininogen
- INR – mezinárodní normalizovaný poměr
- LMWH – nízkomolekulární heparin
- NOAC – nová
- PAI – inhibitor aktivátoru plazminogenu
- PAMBA – kyselina paraaminomethylbenzoová
- PGI₂ – prostaglandin I₂
- PKK - prekalikrein

- pNA – paranitroanilin
- PT – protrombinový čas
- TAFI – trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy
- TCT – trombinový srážecí čas
- TF – tkáňový faktor
- TFPI – inhibitor dráhy tkáňového faktoru
- TGA – trombin generační čas
- tLag – lag time
- TM – trombomodulin
- tPa – tkáňový aktivátor plazminogenu
- tPeak – time to peak
- TT – trombinový čas
- TXA₂ – tromboxan A₂
- S_R – relativní směrodatná odchylka
- UFH – nefrakcionovaný heparin
- uPa – urokináza
- VI – velocity index
- vWF – von Willdebrandův faktor

TEORETICKÁ ČÁST

1. Hemostáza

Hemostáza je vyvážená interakce krevních buněk, vaskulatury, plazmových proteinů a nízkomolekulárních látek. Dokonalá hemostáza znamená žádné krvácení a žádná trombóza. [1]

Hlavním cílem hemostázy je ochránit organismus před velkou ztrátou krve, zabezpečit plynulý krevní tok a opravovat poškozené krevní cévy a tkáně. Na tom se podílí krevní destičky (trombocyty), stěna cév, srážecí faktory, faktory pro fibrinolýzu a ostatní plazmatické proteiny, vápenaté ionty Ca^{2+} , organické nízkomolekulární látky (fosfolipidy, prostaglandiny), hormony a některé proteasy. (Kolde, 2004)

Hemostázu lze rozdělit do tří jednotlivých kroků

- Primární hemostáza (vazokonstrikce, adheze trombocytů, aktivace trombocytů)
- Sekundární hemostáza (aktivace koagulačních faktorů, formace fibrinu ~ hemokoagulace)
- Fibrinolýza (aktivace fibrinolytických faktorů, lýza sraženiny) (Kolde, 2004)

1.1. Primární hemostáza

Během primární hemostázy dochází ke třem hlavním dějům – vazokonstrikci, adhezi trombocytů a agregaci trombocytů. Výsledkem je tvorba nestabilní primární cévní zátky neboli agregátu krevních destiček, která je zpevněna fibrinem v následném procesu hemokoagulace. (Penka, Tesařová, 2011)

Vazokonstrikce je reflexní odpověď cév na ztrátu krve. Jedná se o rychlý proces, který je účinný převážně u menších a středních cév, v případě cév větších je k zástavě krvácení nutný nástup dalších kroků hemostázy. Je vyvolána autonomním nervstvem, svalovými buňkami a mediátory – serotoninem, epinefrinem, noradrenalinem a tromboxanem A_2 . (Kolde, 2004)

Adheze krevních destiček nastává ve chvíli, kdy destičky přijdou do kontaktu s nefyziologickými povrchy, hlavně s kolagenem z bazální membrány cévní stěny. Interakce kolagenu a destiček je primárně aktivována glykoproteiny na povrchu krevních destiček (GPIb), další interakce je dosaženo pomocí plazmatických proteinů (von Willebrandův faktor, fibrinogen), trombinu, tromboxanu A_2 , serotoninu, epinefrinu či arachidonové kyseliny. Dochází tedy k adhezi krevních destiček, ty se aktivují a následně mění svůj tvar na kulovitý s filopodii. (Kolde, 2004)

Posledním krokem primární hemostázy je agregace krevních destiček. Jedná se jednoduše o shlukování trombocytů v místě poranění. Začíná po jejich aktivaci. Mediátorem agregace je fibrinogen, který se váže na receptory GPIIb/IIIa na povrchu aktivovaných trombocytů, což spouští uvolnění kyseliny arachidonové z membrány trombocytů. Ta je štěpena na endoperoxidy a tromboxan A₂, který zvyšuje agregaci destiček. Jedná se o tzv. primární agregaci (reverzibilní). Sekundární agregace (ireverzibilní) je zprostředkována uvolňovací reakcí, která uvolňuje ADP a trombospondin (agregační substance). (Janicadis, 2003)

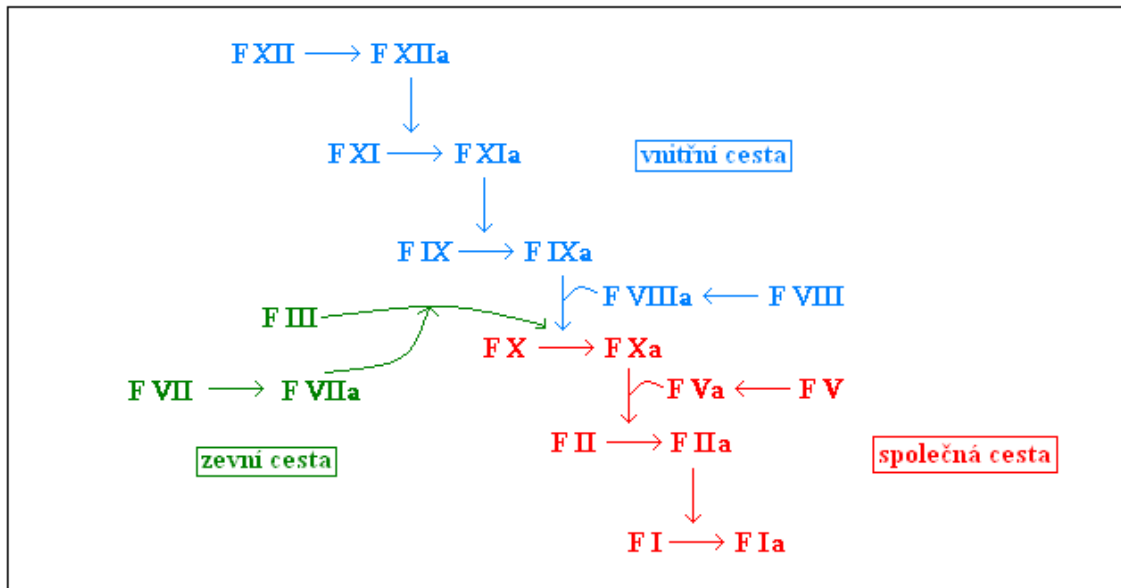
1.2. Sekundární hemostáza

Sekundární hemostáza, neboli vlastní hemokoagulace, je sled interakcí mezi proteiny, tzv. koagulačními faktory, vedoucí k tvorbě trombinu, potažmo fibrinu a fibrinové zátky. Tyto interakce se souhrnně nazývají koagulační kaskáda. Koagulační faktory jsou za normálních okolností přítomny v krevní plazmě jako neaktivní prekurzory, ty jsou v případě poranění cévy přeměněny na aktivní formu pomocí enzymatických reakcí, ve kterých jako enzymy vystupují jiné koagulační faktory.

Přehled jednotlivých koagulačních faktorů podává Tabulka I.

Zkratka	Název faktoru
FI	fibrinogen
FII	prothrombin
FV	proakcelerin
FVII	prokonvertin
FVIII	antihemofilický faktor AHF
FIX	antihemofilický faktor B/Christmasův faktor
FX	Stuart-Prowerův faktor
FXI	plazmatický předchůdce tromboplastinu/antihemofilický faktor C
FXII	Hagemanův faktor
FXIII	fibrin stabilizující faktor
TF	tkáňový faktor
PKK	prekalikrein
HMWK	vysokomolekulární kininogen

Koagulační kaskádu lze rozdělit na dvě cesty – vnitřní a zevní. Ty se spolu spojují ve společnou cestu na úrovni přeměny faktoru X na faktor Xa. (Kolde, 2004)



Stručné schéma koagulační kaskády znázorňuje Obrázek č.1.

Vnitřní cesta je aktivována kontaktem krve s nefyziologickým povrchem – kolagenem ze subendotelu v místě poranění. Její význam je však minoritní, pro iniciaci koagulační kaskády je využívána převážně cesta zevní. Vnitřní cesta začíná přeměnou faktoru FXII na jeho aktivovanou formu FXIIa, která je katalyzována kontaktem tohoto faktoru s nefyziologickým povrchem, komplexními proteiny kalikreinem a vysokomolekulárním kininogenem a Ca^{2+} ionty. Aktivovaný faktor FXIIa katalyzuje přeměnu faktoru FXI na jeho aktivovanou formu FXIa; ten a Ca^{2+} ionty katalyzují přeměnu faktoru FIX na jeho aktivovanou formu FIXa a ten společně s Ca^{2+} ionty a faktorem FVIIIa, který vznikl aktivací faktoru FVIII, katalyzuje přeměnu faktoru FX na aktivovaný faktor FXa, který již vstupuje do cesty společné. (Kolde, 2004)

Zevní aktivační cesta je pro iniciaci koagulační kaskády důležitější než cesta vnitřní. Dochází k aktivaci pomocí tkáňového faktoru. Ten je uvolňován z poraněné tkáně, přichází do kontaktu s faktorem FVIIa, který vznikl aktivací faktoru FVII za využití Ca^{2+} iontů jako kofaktoru, a společně aktivují přeměnu faktoru FX na jeho aktivovanou formu FXa, který dále katalyzuje přeměnu faktoru FII na FIIa ve společné cestě. (Kolde, 2004)

Společná cesta začíná přeměnou faktoru FII (prothrombin) na FIIa (thrombin), která je katalyzována faktory FXa a FVa (vznikl aktivací faktoru FV) a Ca^{2+} ionty. Vzniklý faktor FIIa katalyzuje přeměnu faktoru FI (rozpustný fibrinogen) na faktor FIa (nerozpustný fibrin).

Vzniklý fibrin je monomerní a polymerizuje na fibrinovou síť, která stabilizuje primární cévní zátku. (Kolde, 2004)

Některé koagulační faktory jsou tzv. vitamín K dependentní. Jedná se o faktory FII, FVII, FIX a FX. Vitamín K umožňuje těmto koagulačním faktorům vázat vápenaté ionty Ca^{2+} , které tyto faktory využívají jako kofaktor pro svou aktivaci.

Tak komplexní systém, jakým je koagulační kaskáda, je nutno regulovat. Současně s iniciací koagulace jsou aktivovány i tzv. přirozené inhibitory koagulace. Ty mají za úkol kontrolovat generaci trombinu a bránit srážení krve mimo místo poranění. Neregulovaná koagulace by mohla vést ke vzniku trombů, potažmo zpomalení toku krve cévou či k uvolnění trombu do oběhu. Hlavními přirozenými inhibitory koagulace jsou antitrombin III (AT III), inhibitor dráhy tkáňového faktoru (TFPI), heparinový kofaktor II (HC II) a systém proteinu C. (Gumulec, 2012)

Antitrombin je inhibitor trombinu, jejich navázáním vzniká komplex trombin-antitrombin, který postrádá jak koagulační schopnosti trombinu, tak antikoagulační schopnosti antitrombinu III. Inhibitor dráhy tkáňového faktoru TFPI váže faktor FXa a tím blokuje jeho katalytickou roli v koagulační kaskádě. Heparinový kofaktor II (HC II) je inhibitorem faktoru FIIa (trombinu). Systém proteinu C je aktivován vazbou trombinu na transmembránový glykoproteid trombomodulin (TM) za tvorby komplexu FIIa-TM. Tento komplex jednak inhibuje koagulační aktivitu trombinu a navíc katalyzuje přeměnu proteinu C na aktivovaný protein C, který má inhibiční schopnost pro faktory FVIIIa a FVa. (Šlechtová, 2007)

1.3. Fibrinolýza

Fibrinolýza je posledním krokem hemostázy.

Procesy, na kterých se fibrinolytický systém podílí jsou regulace fluidokoagulační rovnováhy; remodelace extracelulární matrix, hojení ran; modulace proliferace, diferenciaci a migrace buněk; modulace imunitní odpovědi (cytokiny, matrikiny); modulace angiogeneze. [2]

Hlavním krokem fibrinolýzy je přeměna fibrinu na fibrin degradační produkty (FDP), čehož je dosaženo pomocí plasminu, který vzniká proteolytickým štěpením plasminogenu. Plasminogen je plazmatický protein s afinitou k fibrinu, je proto inkorporován ve sraženině během její tvorby. Vlivem působení tkáňového aktivátoru plasminogenu (tPa) uvolněného poraněným endotelem a urokinázy (uPa), popřípadě

kalikreinu a faktorů FXIa a FXIIa, je plasminogen štěpen na plasmin. Ten již katalyzuje přeměnu fibrinu na jeho degradační produkty (FDP) a konečné produkty D-dimery. Plasmin není specifický, kromě fibrinu štěpí i fibrinogen a faktory FV a FVIII a má tedy antikoagulační účinky. (Šlechtová, 2007)

Také fibrinolýzu je nutno regulovat - zvýšená fibrinolýza může způsobit krvácivé stavy, snížená fibrinolýza může vést naopak ke stavům trombofilním. Regulaci tohoto procesu zprostředkovávají přirozené inhibitory fibrinolýzy. Patří sem inhibitor aktivátoru plazminogenu (PAI), α_2 -antiplazmin a trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI). První dva – PAI a α_2 -antiplazmin – zajišťují, aby fibrinolýza probíhala jen a pouze v místě poranění. Trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI) je obdobně jako systém proteinu S aktivován komplexem FIIa-TM. Štěpí fibrin a tím snižuje počet vazbných míst pro plasminogen a tPa. (Šlechtová, 2007)

1.4. Poruchy hemostázy

Při nerovnováze mezi prokoagulačními faktory a antitrombotiky dochází k poruchám hemostázy. Ty mohou být jak vrozené, tak získané. Dělíme je na hemoragické diatézy, charakterizované zvýšenou krvácivostí a trombofilní stavy vedoucí k trombózám.

Příklady hemoragických diatéz jsou purpura, trombopenie a různé koagulopatie jako je hemofilie A, B či von Willebrandova choroba.

Z trombofilních stavů lze zmínit např. arteriální či venózní trombózu, APC resistenci, nedostatek ATIII či lupus koagulans. (Vrzal, UPOL)

2. Látky ovlivňující hemostázu

Při poruchách hemostázy je nutno tento proces regulovat. Existuje řada léků, které hemostázu snižují a tak předcházejí vzniku trombóz, a také léků, které hemostázu podporují a tak zabraňují zvýšenému krvácení.

2.1. Snížení hemostázy

Snížení hemostázy lze dosáhnout ve všech třech úrovních tohoto procesu. Látky, které působí na úrovni primární hemostázy nazýváme antiagregační léky neboli antiagregancia. Na úrovni sekundární hemostázy působí antikoagulancia, někdy též nazývaná antitrombotika. Fibrinolytika či trombolytika jsou potom látky, které působí na úrovni fibrinolýzy. (Večeřa, UPOL)

2.1.1. Antiagregační látky

Tyto látky ovlivňují funkci krevních destiček, především jejich agregaci v procesu primární hemostázy a tím inhibují hemostázu již na jejím počátku.

Nejvýznamnějším a nejpoužívanějším lékem z této kategorie je kyselina acetylsalicylová (acylpyrin, aspirin, ASA). Ta dosahuje snížení hemostázy změnou poměru mezi tromboxanem A_2 (TXA_2) (látko podporující agregaci destiček) a prostaglandinem PGI_2 (látko snižující agregaci destiček) a to tak, že ireverzibilně blokuje enzym COX_1 , který katalyzuje přeměnu kyseliny arachidonové na TXA_2 .

Dalšími léky, využívanými jako antiagregancia, jsou klopidogrel a tiklopidin. Jedná se o antagonisty ADP-receptorů, které zprostředkovávají sekundární agregaci destiček. Klopidogrel a tiklopidin se na tyto receptory ireverzibilně váží a tím je blokuje.

Z této skupiny látek lze zmínit také abciximab, lék snižující agregaci destiček tím, že se váže na receptory GPIIb/IIIa na povrchu aktivovaných trombocytů a tím je blokuje pro fibrinogen nebo epoprostenol (prostacyklin, PGI_2) který je inhibitorem agregace trombocytů. (Večeřa, UPOL)

2.1.2. Antikoagulancia

Tyto látky ovlivňují hemostázu ve fázi koagulační kaskády – snižují srážlivost krve. Můžeme je dělit na přímá antikoagulancia, která inhibují koagulační faktory, a nepřímá antikoagulancia, antagonisty vitamínu K, která inhibují tvorbu vitamín K dependentních koagulačních faktorů v játrech.

Prvním příkladem přímých antikoagulancií jsou hepariny. Hepariny jsou sulfonové polysacharidy běžně se vyskytující v těle živočichů. Pro terapeutické účely se získávají ze střev vepřů či plic skutu. Vyskytují se v různých formách. Nefrakcionovaný heparin (UFH) se váže na antitrombin III a zvyšuje tím jeho inhibiční účinky na faktory FIIa, FXa, FIX, FXIa a FXIIa. Při jeho použití je ale vysoké riziko krvácení. Existuje však specifické antidotum – protamin – které dokáže toto krvácení zastavit. Snížení rizika krvácení lze dosáhnout využitím nízkomolekulárních heparinů (LMWH). Ty mají stejný účinek jako UFH, podporují však inhibici převážně faktoru FXa. Patří sem dalteparin, nadroparin, enoxaparin či tinzaparin. Sulodexid je potom příkladem středněmolekulárních heparinů, které tak jako nízkomolekulární hepariny inhibují koagulační faktor FXa.

Dalším příkladem přímých antikoagulancií je hirudin a jeho rekombinantní formy lepirudin a desirudin. Hirudin je přírodní peptid, který produkuje pijavice lékařská (*Hirudo medicinalis*) a který je inhibitorem trombinu.

Do skupiny přímých antikoagulancií lze zařadit i syntetické inhibitory faktorů FXa (xabany) a FIIa (gatran). Jedná se o nová antikoagulancia, která mají oproti dříve užívaným lékům řadu výhod. Pojednává o nich další kapitola.

Mezi nepřímá antikoagulancia patří dikumarol, přírodní látka získaná z červeného jetele (*Trifolium pretense*) a komonice lékařské (*Melilotus officinalis*) a její deriváty – kumariny. Nejvýznamnějším derivátem je warfarin. Jak již bylo uvedeno dříve, tyto látky inhibují produkci vitamín K dependentních koagulačních faktorů a tak inhibují celou koagulační kaskádu. (Večeřa, UPOL)

2.1.3. Fibrinolytika

Fibrinolytika, také známá jako trombolytika, jsou látky podporující fibrinolýzu, tedy rozpuštění sraženiny.

Patří sem neselektivní aktivátory plazminogenu jako jsou streptokináza, enzym izolovaný z bakterií rodu *Streptococcus* či urokináza, enzym přítomný v lidské plazmě, a také selektivní aktivátory plazminogenu jako je tkáňový aktivátor plazminogenu (tPa) a jeho rekombinantní formy altepláza a retepláza. (Večeřa, UPOL)

2.2. Podpora hemostázy

Při zvýšeném krvácení je nutno hemostázu posílit. Toho je dosaženo pomocí tzv. hemostatik. Tyto léky, stejně jako léky potlačující hemostázu, mohou působit na všech úrovních tohoto procesu.

2.2.1. Hemostatika působící na úrovni primární hemostázy

Pro podporu hemostázy na této úrovni se využívá dvou druhů léku – jedny působí na poraněnou cévu, druhé přímo na trombocyty.

Mezi ty první lze zařadit vasopresin, jeho analoga a alfamimetika. Tyto látky způsobují vasokonstrikci poraněné cévy, čímž sníží průtok krve daným místem a tak sníží ztrátu krve na minimum.

Z léků působících na krevní destičky je nejvýznamnější etamsylát. Tato látka zvyšuje adhezi krevních destiček a tak podporuje tvorbu primární cévní zátky. (Večeřa, UPOL)

2.2.2. Hemostatika působící na úrovni sekundární hemostázy

Koagulační kaskádu lze ovlivnit dvěma způsoby – místně a celkově.

Místně lze srážení krve podpořit dodáním matrice pro koagulaci, např. želatiny, želatinové houby či kolagenu.

Celkově lze srážení krve podpořit např. podáním plazmy obsahující koagulační faktory či přímo koncentrátů koagulačních faktorů, vitamínu K (podpora tvorby vitamín K dependentních faktorů) či protamin sulfátu (antagonista heparinu – váže jej do inaktivního komplexu). (Večeřa, UPOL)

2.2.3. Hemostatika působící na úrovni fibrinolýzy

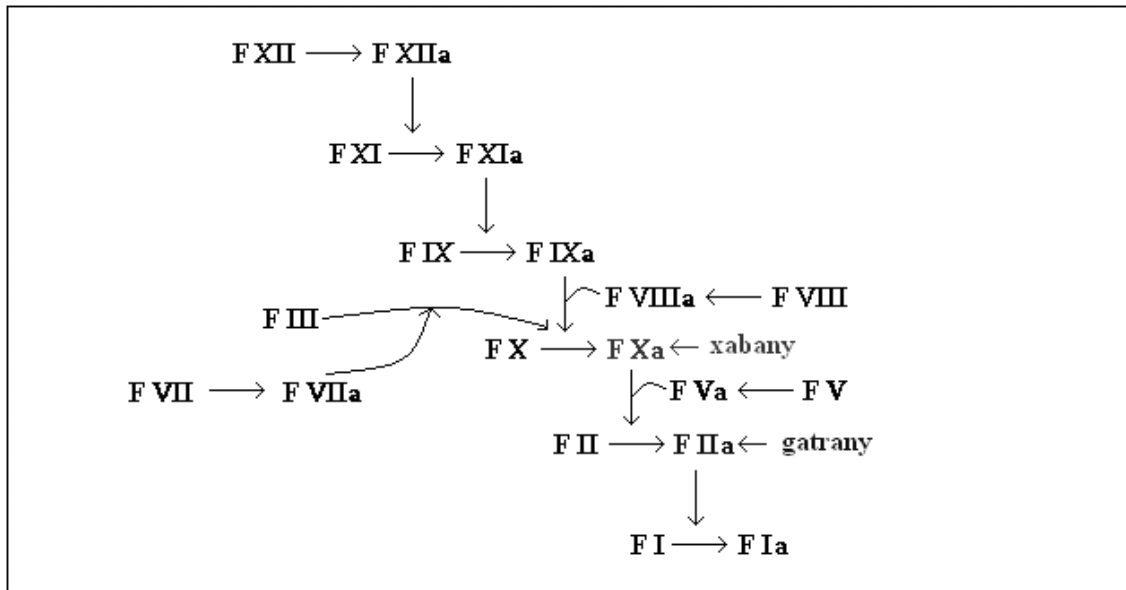
Aby došlo k podpoře hemostázy, fibrinolýzu je nutno potlačit. Na tomto principu působí tzv. antifibrinolytika. Jedná se o léky, které inhibují aktivátory plazminogenu či inhibují přímo plazmin.

Jako inhibitory aktivátorů plazminogenu působí kyselina epsilonaminokapronová (EACA), kyselina tranexamová či kyselina paraaminomethylbenzoová (PAMBA).

Do druhé skupiny léků inhibujících plazmin patří např. aprotinin. (Večeřa, UPOL)

3. Gatrany a xabany – nová antikoagulancia

Gatrany, přímé inhibitory faktoru FIIa, a xabany, přímé inhibitory faktoru FXa, patří do skupiny tzv. nových antikoagulancií (NOAC). Svým cíleným působením na koagulační faktory inhibují koagulační kaskádu a tím zastavují proces krevního srážení – sraženina se tak buď nevytvoří vůbec, nebo je pozastaven růst sraženiny již existující. Jejich využití je proto nejen v léčbě, ale také v prevenci tromboembolických a trombotických příhod.



Místo účinku gatránů a xabanů v koagulační kaskádě zobrazuje Obrázek č.II.

Oproti dříve užívaným antikoagulanciím mají mnoho výhod:

- Perorální podání (namísto parenterálního)
- Malé riziko lékových či potravinových interakcí
- Předvídatelný účinek, není nutnost monitorování
- Nevykazují hepatotoxicitu – lze je podávat i dlouhodobě
- Rychlý nástup i odeznění účinku

Naopak nevýhodami těchto léků jsou:

- Málo zkušeností s jejich užíváním
- Chybí specifická antidota
- Nevhodnost užívat je v graviditě a laktaci (Farmakologické informace, 2011)

3.1. Gatrany

Jedná se o přímé inhibitory trombinu (FIIa).

3.1.1. Dabigatran (PRADAXA)

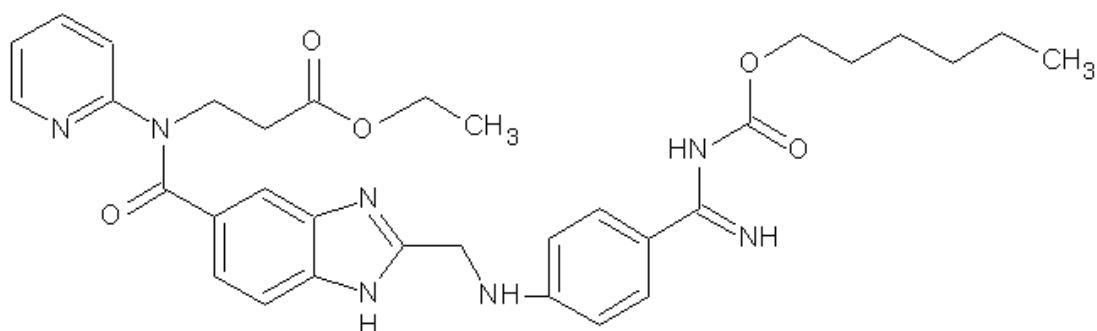
Nejvýznamnějším představitelem skupiny gatanů je dabigatran s obchodním názvem Pradaxa, vyráběný firmou Boehringer Ingelheim.

Jedná se o přímý, kompetitivní, reverzibilní inhibitor trombinu a to jak volného, tak i vázaného na fibrin. Inhibicí trombinu navíc ovlivňuje i trombinem indukovanou agregaci trombocytů, tedy proces primární hemostázy. Jeho elementárním úkolem je nicméně zástava koagulační kaskády na úrovni přeměny fibrinogenu na fibrin, tedy procesu, který je katalyzovaný právě trombinem. Dabigatran se naváže do jeho aktivního místa a tím ruší jeho katalytickou aktivitu.

Dabigatran se využívá především k prevenci trombotických a tromboembolických komplikací po náhradě kyčelního či kolenního kloubu. Podává se 220mg jednou denně, první dávka po 1-4 hodinách po operaci, po dobu 10 dní u operace kolene a 28-35 dní u operace kyčle. Kromě toho bylo schváleno také jeho využití k prevenci mrtvice u pacientů s fibrilací síní.

Jednou z jeho největších výhod je perorální podání. Kromě toho je to také předvídatelnost léčby, odpadá tedy potřeba monitorování pacienta. Jelikož není dabigatran metabolizován pomocí cytochromů, téměř se vylučuje riziko interakcí s jinými léky či potravinami. Nevýhodou je, že neexistuje specifické antidotum. Částečné obnovy koagulace lze však dosáhnout podáním rekombinačního faktoru FVIIa.

Podává se jako proléčivo dabigatran etexilát. Po perorálním užití je maxima účinku dosaženo po 1-3 hodinách. Biologická dostupnost léku je poměrně malá, asi jen 6%, což vyžaduje poměrně velkou podanou dávku. Vstřebává se ve střevech a žaludku (podmínkou je kyselé pH) kde je i započata jeho přeměna na aktivní látku dabigatran, která je dokončena ve střevech. Jeho metabolismus je nezávislý na cytochomech. Distribuce v organismu je zprostředkována pomocí plazmatických proteinů. Eliminační poločas dabigatranu je 12-14 hodin, což umožňuje jeho podání jednou denně. Až 80% léku odchází z těla močí nezměněno.



Chemickou strukturu dabigatranu znázorňuje Obrázek č.III. Jedná se o nažloutlý až žlutý prášek, rozpustný v metanolu, méně rozpustný v ethanolu a téměř nerozpustný v isopropanolu.

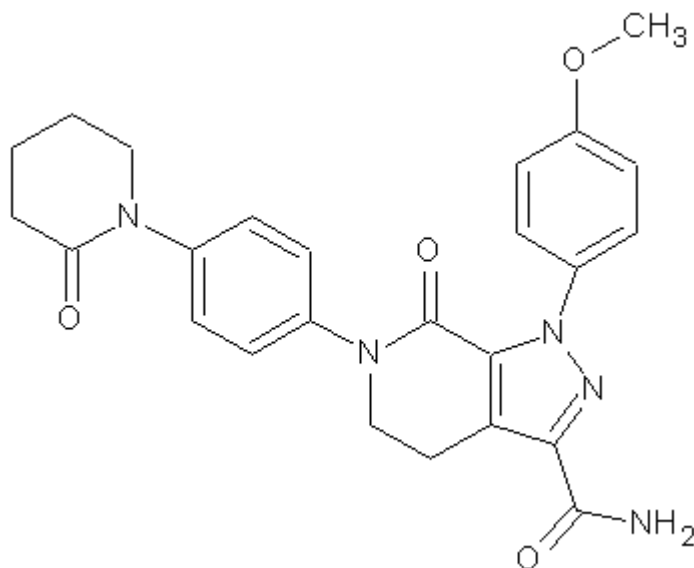
3.2. Xabany

Xabany jsou skupina antikoagulancií inhibujících faktor FXa a tím přeměnu prothrombinu na trombin. Nejvýznamnějšími zástupci jsou apixaban (obchodní jméno Eliquis, firma Pfizer) a rivaroxaban (obchodní jméno Xarelto, firma Bayer).

3.2.1. Apixaban

Apixaban je přímý, reverzibilní, vysoce specifický inhibitor faktoru FXa.

Chemická struktura molekuly apixabanu je zobrazena na Obrázku č.IV.



Je užíván k prevenci trombotických a trombembolických příhod po výměně kolenního či kyčelního kloubu. Podává se v dávce 5mg apixabanu 2x denně. Kromě toho se využívá také k prevenci mrtvice u pacientů s fibrilací síní.

Výhody i nevýhody jeho užívání jsou totožné jako u jiných nových antikoagulancií. Mezi pozitiva tohoto léku patří perorální užití, malé riziko interakcí s jinými léky či potravinami a předvídatelnost účinku, mezi negativa potom především neexistence specifického antidota.

Po perorálním požití se vstřebává poměrně rychle, po 3-4 hodinách od požití je dosaženo maximálního účinku. Biologická dostupnost je asi 50%. V organismu se vyskytuje z 87% vázán na plazmatické proteiny. Jeho metabolismus se uskutečňuje v játrech pomocí cytochromů, převážně pomocí CYP3A4/5, ale podílí se na něm i CYP1A2/ 2C8/2C9/2C19/2J2. Hlavními reakcemi, kterým podléhá jsou O-demethylace a hydroxylace 3-oxopiperidinylové části. Eliminační poločas apixabanu je 12 hodin, eliminace probíhá více cestami – stolicí, močí a žlučí. (EMA)

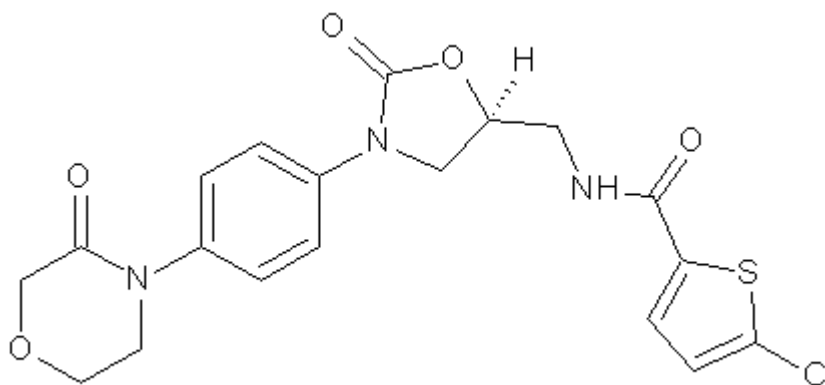
3.2.2. Rivaroxaban

Rivaroxaban je další z řady xabanů, inhibitorů faktoru FXa. Jedná se přímý, kompetitivní, selektivní inhibitor přeměny prothrombinu na trombin, čímž blokuje jak vnitřní, tak zevní cestu koagulační kaskády.

Jeho hlavní indikací je prevence trombotických a trombembolických příhod po výměně kyčelního a kolenního kloubu, jiné využití zatím nebylo schváleno. Užívá se 10mg rivaroxabanu jednou denně, po 6-10 hodinách po výkonu, 2 týdny po operaci kolene a 5 týdnů po operaci kyčle.

Hlavní nevýhodou tohoto léku byla neexistence antidota, částečné obnovy koagulace lze ale dosáhnout podáním rekombinantního faktoru FVIIa. Výhody, v čele s perorálním podáním, předvídatelností léčby a malým rizikem lékových a potravinových interakcí, proto převyšují.

Absorpce rivaroxabanu je poměrně rychlá, maxima účinku je dosaženo po 2-4 hodinách po požití. Biologická dostupnost je z nových antikoagulancií nejvyšší a to 80-100%. 92-95% se váže na plazmové proteiny, hlavně na sérový albumin. Jedna třetina léku je vyloučena ledvinami nezměněna, zbývající dvě třetiny se metabolicky degradují pomocí cytochromů (CYP3A4, CYP2J2) i CYP-independentními mechanismy. Hlavními reakcemi jsou oxidativní degradace morfolinonové části a hydrolýza amidových vazeb. Poločas eliminace je 5-9 hodin u mladších pacientů, 11-13 hodin u pacientů starších. Jedna třetina je následně vyloučena ledvinami, zbývající třetina stolicí. (EMA)



Tento obrázek (Obrázek č.V) zobrazuje chemickou strukturu rivaroxabanu. Je to bílý až nažloutlý prášek, málo rozpustný v organických rozpouštědlech, nerozpustný ve vodě a vodném prostředí o pH 1-9.

3.3. Srovnání dabigatranu, apixabanu, rivaroxabanu

Následující tabulka (Tabulka č.II) nabízí shrnutí a porovnání nejdůležitějších aspektů dabigatranu, apixabanu a rivaroxabanu. (EMU, SUKL)

	Dabigatran	Apixaban	Rivaroxaban
Mechanismus účinku	inhibitor FIIa	inhibitor FXa	inhibitor FXa
Dávkování	220mg 1x denně	5mg 2x denně	10 mg 1x denně
Způsob podání	perorální	perorální	perorální
Nástup účinku	1-3 hodiny	3-4 hodiny	2-4 hodiny
Biodostupnost	6%	50%	80-100%
Eliminace	močí	močí, stolicí, žlučí	močí, stolicí
Eliminační poločas	12-14 hodin	12 hodin	11-13 hodin

4. Monitorování antikoagulační léčby

Monitorování pacientů užívajících antikoagulační léčbu je nezbytné pro optimalizaci dávky tak, aby byla léčba na jednu stranu dostatečně účinná, aby nedocházelo k trombembolickým příhodám, a na druhou stranu dostatečně bezpečná, aby nedocházelo ke zvýšenému krvácení.

Jak již bylo uvedeno dříve, u nových antikoagulačních léčiv není monitorování potřeba, nicméně u antikoagulačních léčiv starších (kumarinové deriváty, heparin) je monitorování nezbytné. Základními testy jsou protrombinový čas PT, aktivovaný parciální trombotoplastinový čas aPTT a trombinový čas TT.

Všechny tyto testy využívají nesrážlivou dekalifikovanou plazmu. Ta se získá tak, že po odběru krve je přidán roztok citrátu sodného v poměru 1(citrát):9(krev), který naváže vápenaté ionty a tak zabrání srážení krve. Ta je následně centrifugována až dojde k oddělení frakce krvinek a plazmy. Tuto plazmu již lze dále testovat. (Veselý, UPOL)

4.1. Protrombinový čas PT

Tento test, někdy též zvaný Quickův test dle Dr. Armanda Quicka, který jej v roce 1935 jako první využil, testuje zevní a společnou cestu koagulační kaskády, konkrétně faktory FII, FV, FVII, FX a fibrinogen.

Měří se čas, za který se vytvoří sraženina po přidání tkáňového faktoru a vápenatých iontů (souhrnně trombotoplastinové reagentie) k citrátové plazmě. Vzniklá sraženina se následně detekuje buď opticky (pomocí rozptylu světla) nebo mechanicky (s využitím pohybu kuličky v magnetickém poli).

Optimální výsledek je čas v rozmezí 12-15 sekund. Ten lze přepočítat na protrombinový poměr R, který je poměrem mezi časem daného pacienta a časem standardní plazmy. Hodnota tohoto poměru je ale závislá na způsobu měření a kvalitě použitého tkáňového faktoru. Byla proto zavedena další hodnota – mezinárodní normalizovaný poměr INR, která umožňuje standardizaci výsledků. Ten se vypočítá jako $INR = R^{|S|}$, kde R je protrombinový poměr a S je index citlivosti použitého tkáňového faktoru ve srovnání se standardním tkáňovým faktorem. Optimální hodnoty INR jsou 0,8-1,2.

Tento test je využíván k monitorování antikoagulační léčby antagonisty vitamínu K – kumariny, převážně warfarinem. Tato antikoagulační léčba protrombinový čas prodlužuje, léčebné rozmezí u INR je 2,0 až 4,0. (Veselý, UPOL)

4.2. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas aPTT

Tento test postihuje vnitřní a společnou cestu koagulační kaskády, konkrétně faktory FXII, FXI, FIX, prekalkrein a vysokomolekulární kininogen.

K citrátové plazmě jsou přidány vápenaté ionty, aktivátor srážení (kaolin, mikronizovaná silika, kyselina ellagová, polyfenol, sulfatidy) a fosfolipidy (syntetické nebo přírodní ze zvířecí či rostlinné tkáně, např. kefalin – tzv. parciální tromboplastin). Měří se čas potřebný k vytvoření sraženiny, ta je následně detekována jako u PT opticky nebo mechanicky.

Normální jsou hodnoty mezi 25 a 45 sekundami.

Tohoto testu je využíváno k monitorování antikoagulační léčby heparinem a hirudinem – hodnoty aktivovaného parciálního tromboplastinového času u pacientů užívajících tato antikoagulantia jsou dvojnásobné až trojnásobné. Zvýšený aPTT vykazují také pacienti s vrozenými či získanými poruchami faktorů FVIII, FIX, FXI, vWF. (Veselý, UPOL)

4.3. Trombinový čas TT

Tento test, někdy též nazývaný trombinový srážecí čas (TCT), se zabývá přeměnou fibrinogenu na fibrin za katalýzy trombinem, tedy společnou cestou koagulační kaskády.

K citrátové plazmě je přidán nadbytek trombinu (hovězí či lidský), který katalyzuje přeměnu fibrinogenu na fibrin. Měří se čas tvorby fibrinové sraženiny. Sraženina je detekována buď opticky nebo mechanicky.

Optimální hodnoty trombinového času jsou mezi 11 a 19 sekundami.

Je využíván pro monitorování léčby heparinem a hirudinem – jeho hodnota je při ní dvojnásobná až čtyřnásobná. Zvýšené hodnoty TT vykazují také pacienti s vysokou koncentrací fibrin degradačních produktů, s nemocemi jater či trpící diseminovanou intravaskulární koagulací. (Veselý, UPOL)

Pro stanovení koncentrace léku v plazmě je využívána modifikace tohoto testu – dilutovaný trombinový čas dTT. Citrátová plazma testovaného pacienta je naředěna citrátovou plazmou pacienta zdravého, přidá se CaCl_2 a trombin, čímž se nastartuje srážecí proces a je opět měřena doba tvorby sraženiny. Tento čas je přímo úměrný koncentraci inhibitoru v plazmě. Koncentrace je odečtena z kalibrační křivky vytvořené pomocí kalibračních roztoků léku. (Practical Haemostasis)

Tyto testy lze využít také k monitorování nových antikoagulancií – gatránů a xabanů.

- Dabigatran zvyšuje hodnoty všech tří testů – PT, aPTT i TT.
- Rivaroxaban a apixaban zvyšují pouze hodnoty PT a aPTT, na TT nemají žádný vliv.

Následující tabulka (Tabulka č.III) srovnává vhodnost jednotlivých testů pro monitorování dabigatranu, rivaroxabanu a apixabanu. (Anderson, CU)

	PT	aPTT	TT
dabigatran	necitlivá	citlivá	příliš citlivá pro užití
rivaroxaban	citlivá za vyšších c	méně citlivá než PT	žádný efekt
apixaban	citlivá za vyšších c	méně citlivá než PT	žádný efekt

Z ní vyplývá, že zatímco pro dabigatran je nejvhodnější aktivovaný parciální tromboplastinový čas, pro rivaroxaban a apixaban je nejvhodnější protrombinový čas.

4.4. Trombin generační test TGA

Nevýhodou výše uvedených testů nicméně je, že nepostihují celou koagulační kaskádu – jejich konečným bodem je vytvoření sraženiny, k tomu ale dochází ve chvíli, kdy je vytvořeno asi jen 5% celkového množství trombinu. Test, který poskytuje celkový obraz koagulační kaskády, je trombin generační test TGA.

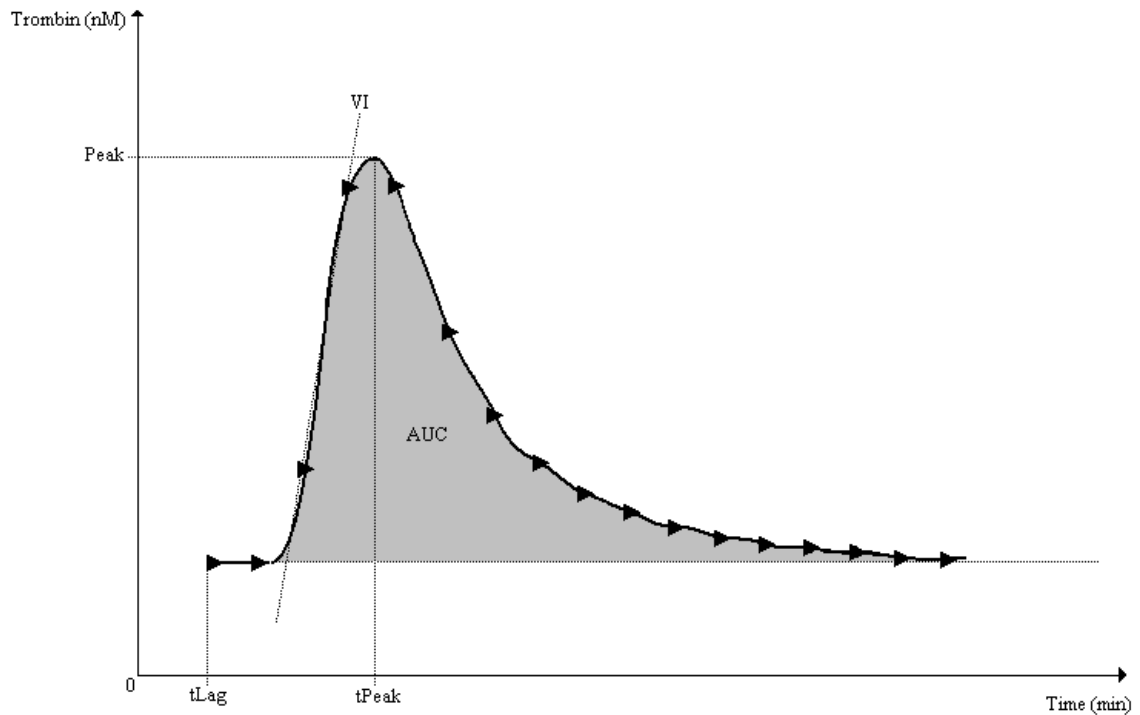
Lze jej využít nejen k monitorování antikoagulační léčby, ale také k detekci trombofilních a hemofilních stavů.

K citrátové plazmě je přidán chlorid vápenatý CaCl_2 , fosfolipidy a aktivátor generace trombinu – tkáňový faktor. Tvořící se trombin štěpí chromogenní/fluorogenní substrát na chromofor/fluorofor a jeho signál je měřen spektrometrem/fluorometrem. Ze změny absorbance/fluorescence lze vypočítat koncentraci trombinu v nM v čase. (Penka, 2009)

Výsledkem tohoto testu je trombinogram – graf závislosti koncentrace trombinu v plazmě pacienta (v nM) na čase (v min). Z něj lze vyčíst pět důležitých hodnot:

- tLag (min) – doba, než dojde k vytvoření detekovatelné koncentrace trombinu
- tPeak (min) – doba, než je dosaženo maxima koncentrace trombinu
- Peak (nM) – maximální dosažená koncentrace trombinu
- VI (nM/min) – rychlost nárůstu generace trombinu
- AUC (nM) – celkové množství vytvořeného trombinu

Trombinogram a nejdůležitější veličiny TGA testu znázorňuje následující obrázek (Obrázek č.VI):



4.5. Stanovení koncentrace koagulancií v krevní plazmě

Ke stanovení koncentrace antikoagulancií v plazmě se velice často využívají chromogenní metody. Ty mohou být buď přímé, kdy analyzovaná složka sama působí na specifický syntetický substrát, nebo nepřímé, kdy analyzovaná složka reaguje s enzymem za tvorby neaktivního komplexu a měří se aktivita zbytkového enzymu.

Měření je založeno na uvolňování paranitroanilinu (pAN) syntetickým substrátem a na měření absorbance při 405 nm. Hodnota absorbance je přímo úměrná koncentraci pAN v plazmě.

PRAKTICKÁ ČÁST

1. Cíle praktické části

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat metody přímého a nepřímého stanovení léku rivaroxaban a zjistit jejich výhody a nevýhody; korelovat stanovení hladiny rivaroxabanu přímým stanovením anti Xa aktivity a nepřímým stanovením inhibičního potenciálu pro generaci trombinu (TGA) a porovnat obě stanovení na souboru pacientů léčených rivaroxabanem a současně na vzorcích s in vitro přídatkem rivaroxabanu, pro zjištění individuální variability působení léku.

2. Experimentální vybavení

2.1. Přístrojové vybavení

- Koagulační analyzátor Ceveron Alpha, Technoclone, Rakousko
- Analyzátor ACL-TOP
- Automatické pipety Eppendorf Research, Eppendorf GmbH Hamburg, Německo

2.2. Materiálové vybavení

- Krevní plasma chudá na trombocyty
- Destilovaná voda
- Vyšetřovací kit Technotrombin TGA, Technoclone, Rakousko
 - Reaction Buf Technotrombin TGA (reakční pufr)
 - Low RC Technotrombin TGA (tkáňový faktor s negativně nabitými fosfolipidy)
 - Sub Technotrombin TGA (fluorogenní substrát)
- Ceveron promývací roztok
- Roztok CaCl₂
- Technoview Rivaroxaban Calibrator Set
- Reagencie na stanovení anti Xa aktivity
 - Normal Pool Plasma
 - Rivaroxaban Control Plasma

3. Metodika TGA

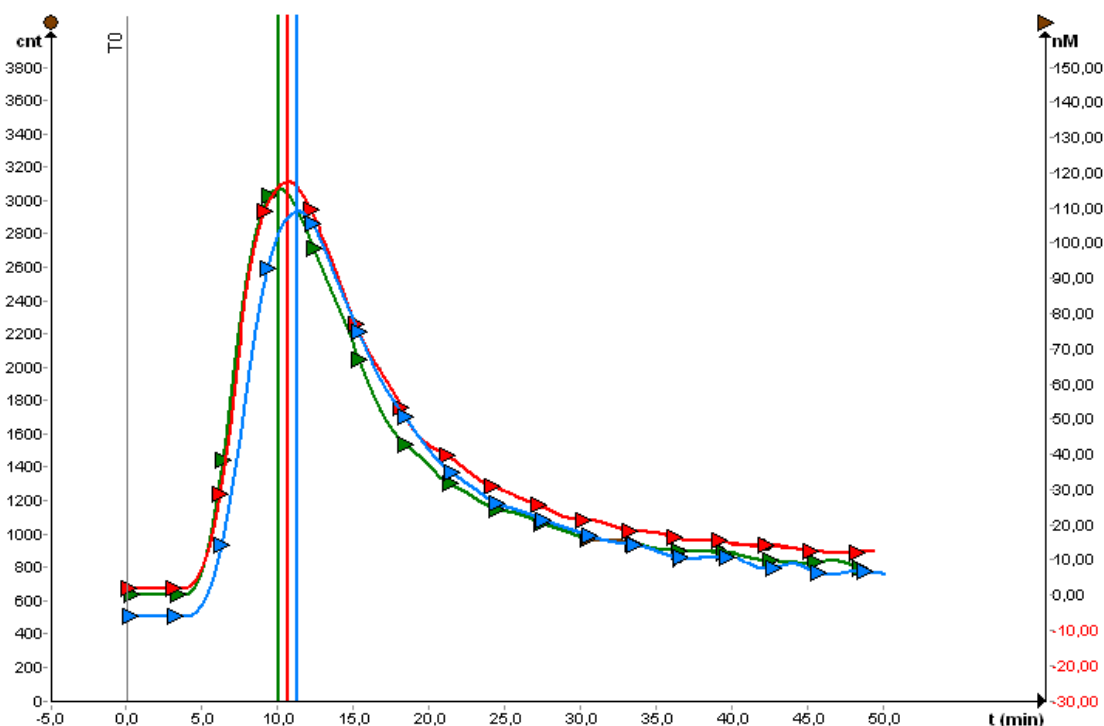
3.1. Opakovatelnost metody

Byla měřena plazma tří zdravých pacientů (vzorky 1-3) a dvou pacientů s nasazenou antikoagulační léčbou (vzorky 4-5), u kterých se předpokládala nízká hladina generovaného trombinu. Každé měření bylo provedeno 3x a z naměřených hodnot byla vypočtena relativní směrodatná odchylka (Tabulka IV).

	tLag [min]	tPeak [min]	Peak [nM]	AUC [nM]
Vzorek 1	5,7	11,2	96,1	1445,7
	5,4	11,1	102,4	1530,9
	5,3	10,5	106,8	1512,0
S_R	3,78%	3,47%	5,28%	2,99%
Vzorek 2	3,2	8,6	88,9	1452,8
	3,1	8,7	91,4	1475,5
	3,0	8,8	93,9	1490,9
S_R	3,22%	1,15%	2,73%	1,30%
Vzorek 3	3,3	8,1	146,5	1867,8
	3,7	9,5	122,9	1788,8
	3,2	7,9	160,3	1959,7
S_R	7,78%	10,26%	13,21%	4,57%
Vzorek 4	9,5	15,8	20,3	335,1
	9,5	17,1	21,5	382,8
	8,1	24,0	13,1	291,1
S_R	8,95%	23,23%	24,83%	13,64%
Vzorek 5	14,7	30,0	7,5	167,9
	15,7	25,2	9,5	216,9
	14,7	29,8	7,5	164,3
S_R	3,84%	9,58%	14,13%	16,05%

Z výsledků vyplývá, že u pacientů s antikoagulační léčbou, u nichž je generace trombinu inhibována, jsou rozdíly mezi jednotlivými měřeními větší než u pacientů zdravých.

Obecně byly největší rozdíly mezi jednotlivými měřeními u hodnoty Peak, tedy nejvyšší dosažené koncentrace trombinu. Naopak nejmenší rozdíly jsou u hodnot tLag, doby potřebné k vytvoření první detekovatelné koncentrace trombinu.



Na tomto obrázku (Obrázek č.VII) jsou srovnány trombinogramy jednotlivých měření u vzorku 1.

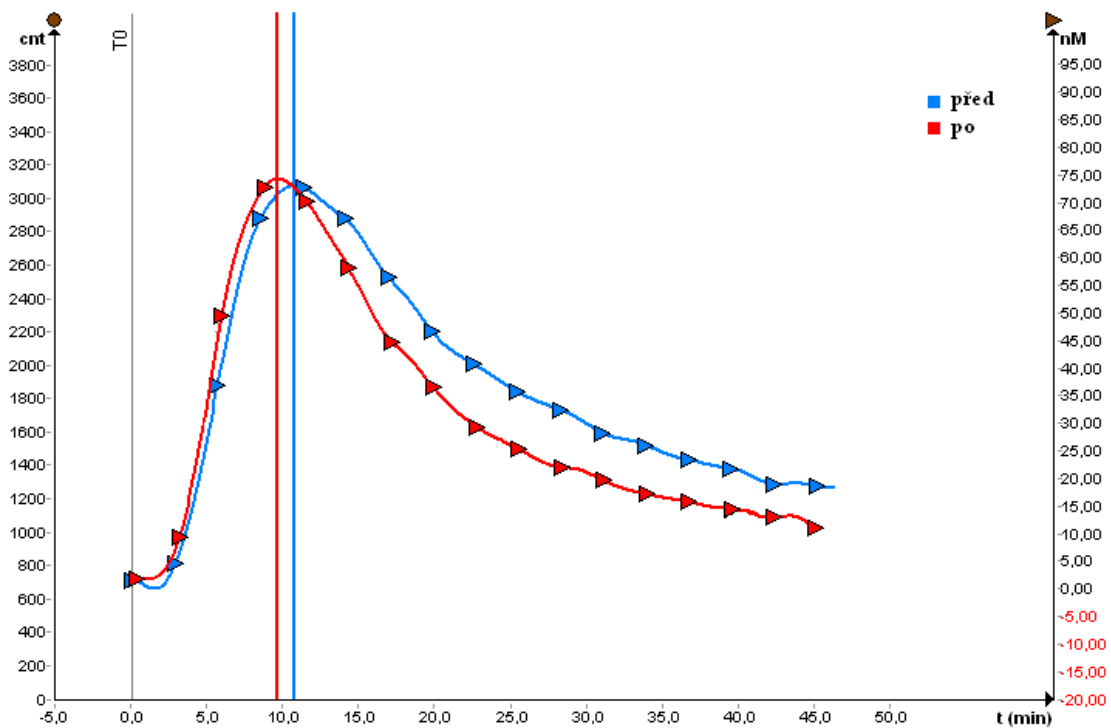
3.2. Vliv zamrazení

V rámci této bakalářské práce byla často k měření využívána zamražená plazma. Bylo proto nutné určit, zda má zamrazení vliv na hodnoty TGA. Nejdříve bylo provedeno měření čerstvé plazmy, poté byla tato plazma zamrazena, následně rozmrazena a měření bylo opakováno. Výsledky měření a relativní směrodatnou odchylku udává následující tabulka (Tabulka V).

	tLag [min]	tPeak [min]	Peak [nM]	AUC [nM]
Vzorek 1	2,8	11,0	74,3	1677,6
	2,9	9,5	94,4	1793,7
S_R	2,48%	10,35%	16,85%	4,90%
Vzorek 2	3,5	9,1	93,5	1356,8
	3,3	8,2	102,2	1402,7
S_R	4,16%	7,36%	6,29%	2,35%
Vzorek 3	2,2	8,3	172,7	2141,4
	2,2	9,9	153,4	2411,9
S_R	0%	12,43%	8,37%	8,40%
Vzorek 4	2,7	9,1	151,8	2088,5
	2,2	10,5	149,3	2364,0
S_R	14,43%	10,10%	1,17%	8,45%
Vzorek 5	4,9	8,0	261,1	1744,5
	4,9	9,1	228,7	2221,7

S_R	0%	9,10%	9,35%	17,02%
-------	----	-------	-------	--------

Z tohoto měření vyplývá, že žádná z veličin TGA není zamrazením ovlivněna, relativní směrodatné odchylky jsou přibližně stejné jako u opakovaného měření téhož vzorku.



Na tomto obrázku (Obrázek č.VIII) jsou srovnány trombinogramy jednotlivých měření u vzorku 1.

4. Soubor pacientů léčených rivaroxabanem

Tento soubor byl tvořen pacienty obou pohlaví (12 žen a 2 muži) různého věku (nejstarší narozen 1934, nejmladší narozen 1991) s nasazenou antikoagulační léčbou rivaroxabanem. Tento soubor byl doplněn 4 standardními roztoky rivaroxabanu o známé koncentraci, které byly nicméně pro přesnost přeměřeny. Koncentrace léku v plazmě byla stanovena pomocí anti Xa aktivity a následně byl proveden trombin-generační test. Hledala se závislost tLag, Peak, AUC na koncentraci rivaroxabanu. Tato závislost byla porovnána s kalibračními křivkami připravenými měření kalibračních roztoků připravených metodou postupného měření standardu rivaroxabanu o koncentraci 145,6 ng/ml.

4.1. Výsledky

Následující tabulka shrnuje výsledky měření kalibrační řady (Tabulka VI).

Měření 1			
c [ng/ml]	tLag [min]	Peak [nM]	AUC [nM]
9,1	4,0	48,4	1010,5
18,2	4,3	39,5	993,2
36,4	4,9	21,4	643,6
72,8	5,9	22,0	651,0
145,6	7,6	18,0	519,2
Měření 2			
c [ng/ml]	tLag [min]	Peak [nM]	AUC [nM]
9,1	4,1	34,6	1082,6
18,2	4,8	26,8	863,5
36,4	5,1	25,6	808,3
72,8	6,3	22,6	693,7
145,6	7,7	20,5	588,3

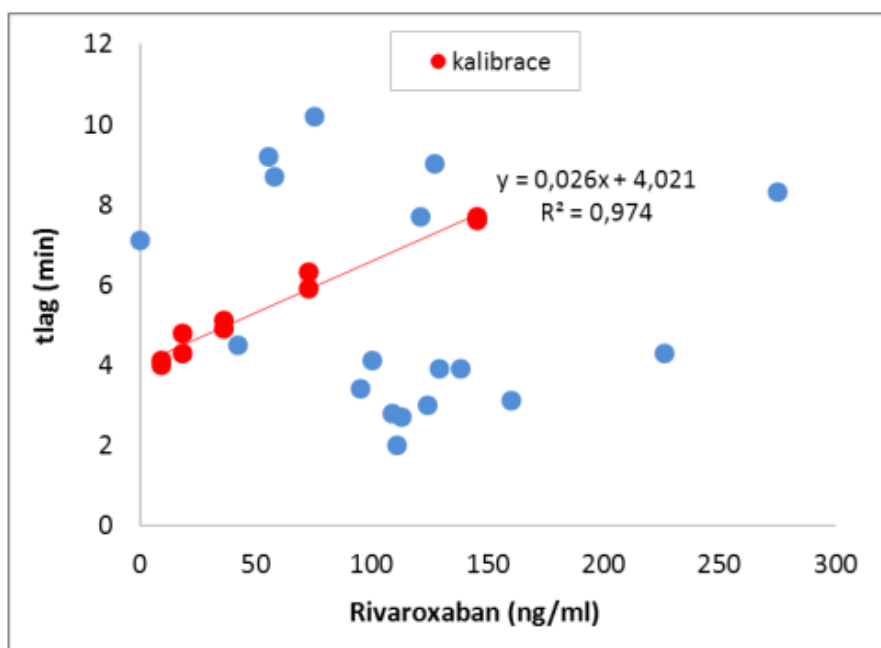
Následující tabulka shrnuje výsledky měření patientské plazmy (Tabulka VII).

	c [ng/ml]	tLag [min]	Peak [nM]	AUC [nM]
1	160,3	3,1	53,9	1337,1
2	95,3	3,4	156,9	1798,6
3	109,0	2,8	79,1	1471,6
4	138,5	3,9	35,6	998,2
5	124,1	3,0	154,4	2025,4
6	110,6	2,0	54,9	1412,9
7	128,9	3,9	104,5	2048,1
8	112,7	2,7	101,6	1538,0
9	274,7	8,3	24,9	682,6
10	226,2	4,3	83,0	1093,1
11	42,5	4,5	124,1	1883,8

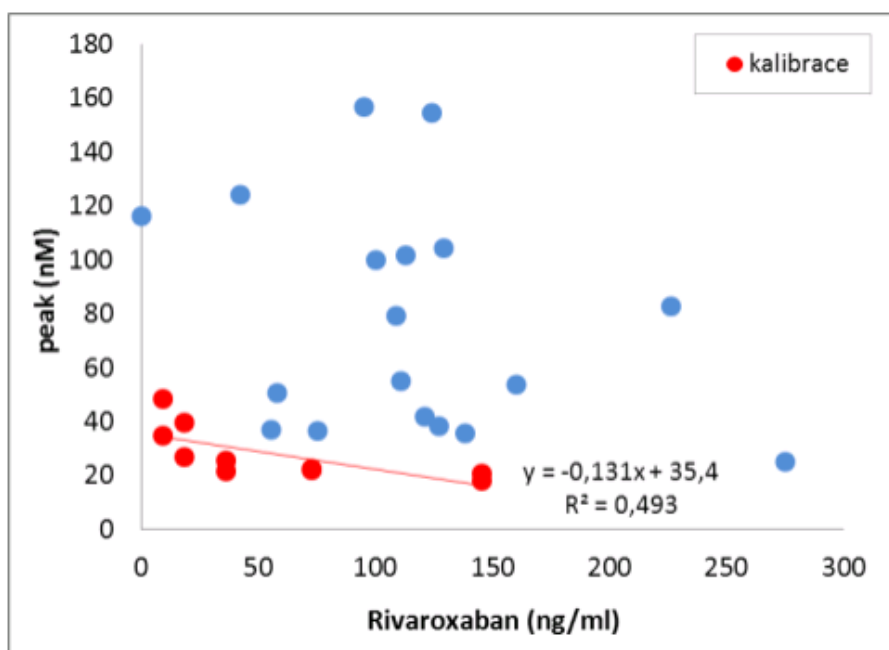
12	100,0	4,1	100,1	1851,0
13	55,5	9,2	37,1	1030,0
14	120,9	7,7	42,0	1231,3
15	0	7,1	116,1	1815,1
16	58,0	8,7	50,7	1218,2
17	75,3	10,2	36,6	978,2
18	126,9	9,0	38,2	1046,3

Následující grafy zobrazují závislost tLag, Peak, AUC na koncentraci rivaroxabanu v plazmě. Pro srovnání jsou uvedeny i kalibrační křivky.

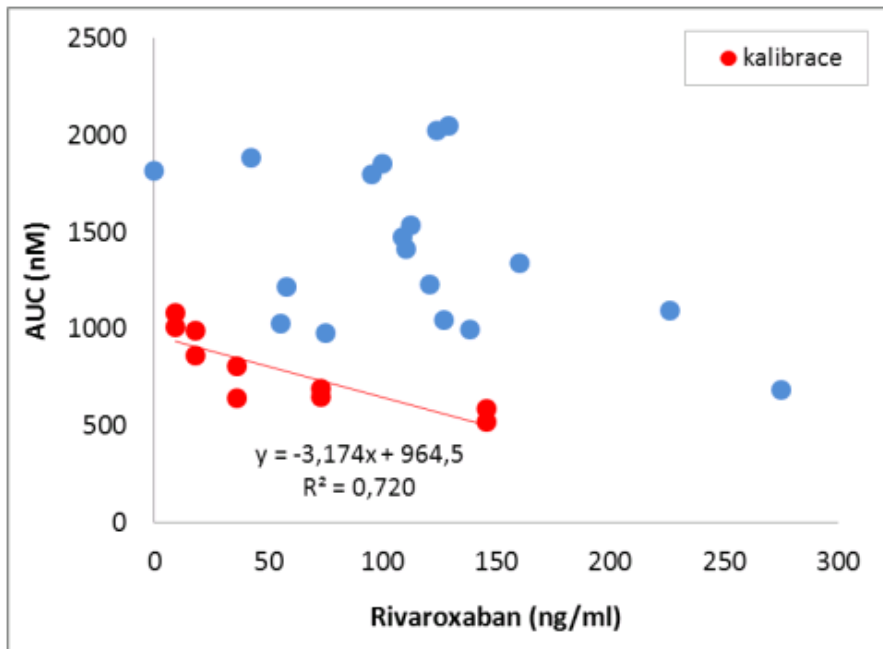
Graf I: tLag = f(c)



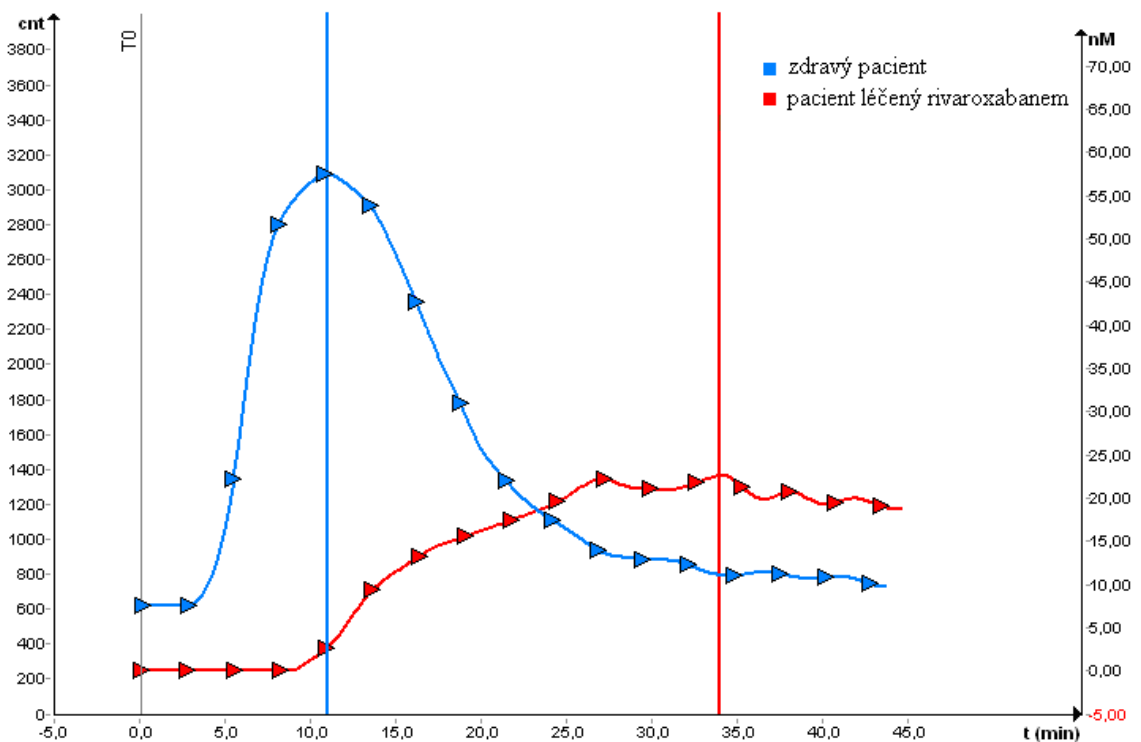
Graf II: Peak = f(c)



Graf III: $AUC = f(c)$



Na tomto obrázku (Obrázek č.IX) jsou pro srovnání uvedeny trombinogramy pacienta zdravého bez antikoagulační léčby a pacienta užívajícího rivaroxaban.



4.2. Statistické vyhodnocení

Následující tabulka shrnuje základní statistické charakteristiky (Tabulka VII).

	c [ng/ml]	tLag [min]	Peak [nM]	AUC [nM]
Průměr	114,4	5,4	77,4	1414,4
Medián	111,7	4,2	67,0	1375,0
Sm. odchylka	63,5	2,7	42,1	411,3
Minimum	0	2,0	24,9	682,6
Maximum	274,7	10,2	156,9	2048,1

Spearmanova korelační analýza zkoumá závislost dvou proměnných, hodnotí, jak dobře lze vztah dvou proměnných popsat monotónní funkcí. (en.wikipedia.org)

Tato metoda prokázala u kalibračních řad velmi silnou negativní závislost mezi koncentrací rivaroxabanu a hodnotami parametru Peak ($r = -0,911$, $p < 0,001$) a mezi koncentrací rivaroxabanu a AUC ($r = -0,935$, $p < 0,001$). Mezi koncentrací rivaroxabanu a hodnotami parametru tLag byla prokázána velmi silná pozitivní závislost ($r = 0,985$, $p < 0,001$).

U experimentálních hodnot ale nebyla žádná signifikantní závislost mezi koncentrací rivaroxabanu a hodnotami parametrů tLag, Peak, AUC.

5. Soubor pacientů s *in vitro* přídávkem rivaroxabanu

Tento soubor byl tvořen 25 pacienty, 24 z nich bylo bez antikoagulační léčby, jeden (pacient č.22) byl léčen dabigatranem. K plazmě těchto pacientů bylo přidáváno vypočtené množství rivaroxabanu tak, aby jeho výsledná koncentrace odpovídala doporučené denní dávce léku 15 mg, tj. 2,7 µg/ml krve (200 µl plazmy bylo smícháno s 46 µl kalibrátoru rivaroxabanu o koncentraci 433,3 ng/ml). První měření bylo provedeno před přídávkem léku, druhé měření po přídávku léku a byly sledovány změny jednotlivých hodnot TGA. Výsledky měření shrnuje následující tabulka (Tabulka IX). Jako první jsou uvedeny iniciální hodnoty (označeno „I“), jako druhé hodnoty po aplikaci rivaroxabanu (označeno „P“).

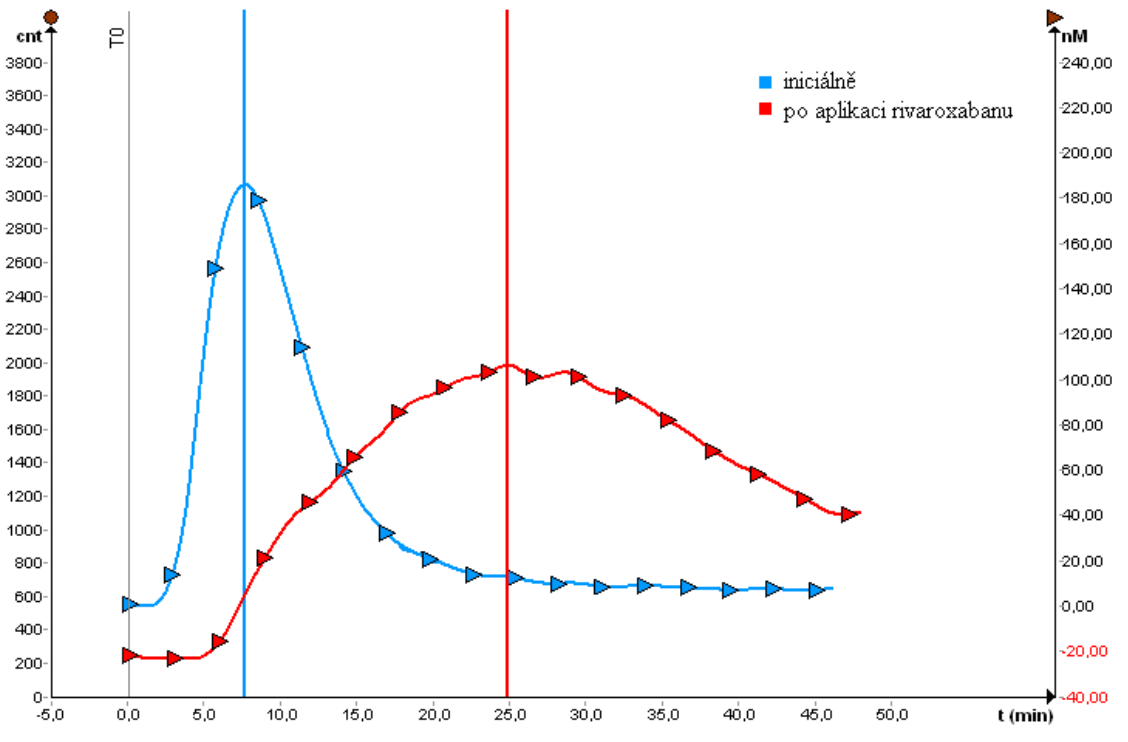
		tLag [min]	tPeak [min]	Peak [nM]	AUC [nM]
1	I	2,5	9,3	137,9	1779,1
	P	5,2	10,4	162,5	1801,3
2	I	3,0	7,6	183,5	1806,2
	P	5,6	10,4	172,6	1840,1
3	I	2,7	6,2	248,3	1688,8
	P	4,5	8,6	230,8	1811,5
4	I	2,6	8,2	219,0	2335,4
	P	5,9	9,7	274,8	2295,6
5	I	5,6	11,0	157,2	1615,8
	P	9,8	14,6	193,5	1844,4
6	I	3,4	7,3	228,6	1871,4
	P	4,0	17,4	64,8	1460,7
7	I	2,6	9,2	216,5	2596,2
	P	3,4	19,1	65,6	1804,3
8	I	2,1	7,4	195,2	2066,9
	P	2,5	18,0	65,9	1698,3
9	I	1,8	5,9	201,7	1961,1
	P	2,2	17,0	55,6	1398,3
10	I	2,2	11,2	122,8	1880,7
	P	3,8	24,5	42,1	1262,5
11	I	2,5	7,5	152,4	1640,3
	P	4,0	23,0	33,9	1130,6
12	I	2,1	6,8	153,4	1437,6
	P	2,5	16,2	50,3	1202,9
13	I	2,0	10,9	90,1	1564,8
	P	3,4	23,1	40,3	1115,8
14	I	2,2	7,4	123,7	1578,0
	P	3,4	26,9	33,7	1038,1
15	I	2,7	6,3	213,5	1679,5
	P	3,5	18,8	55,0	1417,1
16	I	3,9	8,6	87,5	1288,9
	P	4,5	19,2	47,7	1283,7

17	I	3,2	11,4	48,1	1105,9
	P	3,8	21,7	32,3	989,2
18	I	2,3	11,0	101,4	1863,4
	P	3,1	20,1	42,7	1267,7
19	I	2,4	8,8	90,9	1371,3
	P	2,7	21,5	37,4	1120,2
20	I	2,2	6,7	166,2	1849,9
	P	2,3	16,1	66,9	1583,7
21	I	4,4	8,6	150,1	1629,5
	P	5,0	18,3	50,2	1212,4
22	I	7,6	13,1	23,7	330,2
	P	3,9	11,3	52,7	808,2
23	I	4,8	7,4	268,8	1608,3
	P	7,8	13,3	101,0	1477,2
24	I	2,2	5,8	223,2	1687,5
	P	2,8	10,6	97,1	1554,8
25	I	2,5	7,6	122,3	1564,3
	P	2,8	17,6	43,6	1197,6

Z výsledků vyplývá následující:

- U většiny pacientů došlo po podání denní dávky rivaroxabanu k nárůstu hodnoty tLag, průměrně o 44,32 % původní hodnoty, tj. o 1,27 min. Rivaroxaban tak způsobuje prodloužení doby potřebné k vytvoření detekovatelné koncentrace trombinu.
- U většiny pacientů došlo po podání denní dávky rivaroxabanu k nárůstu hodnoty tPeak, průměrně o 114,21 % původní hodnoty tj. o 9,075 min. rivaroxaban tak způsobuje prodloužení doby potřebné k vytvoření maximální koncentrace trombinu.
- U většiny pacientů došlo po podání denní dávky rivaroxabanu k poklesu hodnoty Peak, průměrně o 57,68 % původní hodnoty, tj. o 93,271 nM. Rivaroxaban tak snižuje maximální dosaženou koncentraci trombinu.
- U většiny pacientů došlo po podání denní dávky rivaroxabanu k poklesu hodnoty AUC, průměrně o 20,01 % původní hodnoty, tj. 353,51 nM. Rivaroxaban tak způsobuje snížení celkového množství vytvořeného trombinu.

Následující obrázek (Obrázek č.X) srovnává trombinogramy pacienta před přidáním léku a po něm.



6. Závěr a diskuze

Cílem bylo porovnat metody stanovení antikoagulancia rivaroxabanu.

Přesná koncentrace rivaroxabanu v našem souboru pacientů byla zjištěna stanovením anti Xa aktivity a výsledná hladina trombinu byla stanovena pomocí TGA. V souboru 14 pacientů s vysokým rizikem trombotických komplikací, byly následně korelovány 3 zásadní parametry TGA (tLag, Peak a AUC) v závislosti na zjištěné koncentraci léčiva v plazmě. Statisticky byla zhodnocena závislost tLag, Peak či AUC na koncentraci rivaroxabanu, která však nebyla statisticky významná, což bylo zapříčiněno značnou heterogenitou léčených pacientů a také malým počtem vzorků. U většího souboru pacientů by se pravděpodobně závislost prokázat podařilo. Pacienti s trombotickými komplikacemi byli vybráni záměrně, jelikož výrazně profitují z této léčby. Pokud by se studie prováděla na zdravých pacientech, lze předpokládat, že by výsledky lépe korelovaly s kalibračními křivkami.

Druhá vyšetřovaná skupina byla tvořena pacienty, kterým byl přidán do plazmy rivaroxaban. Tímto způsobem bylo vyšetřeno 25 pacientů a zhodnoceny opět 3 zásadní parametry TGA. U výsledků bylo zpozorováno prodlužování času do začátku nástupu generace trombinu (tLag) a do dosažení maximální koncentrace trombinu (tPeak), snižování celkového množství vygenerovaného trombinu (AUC) a také snižování jeho maximální dosažené koncentrace (Peak).

Bylo prokázáno, že jak metoda TGA, tak i stanovení anti Xa aktivity nám poskytují různé pohledy na monitoraci léku resp. inhibovaného enzymu a vzhledem k rozdílnosti pacientů je třeba výsledky interpretovat individuálně. Kombinace těchto metodik umožní komplexní pohled na účinnost léku u jednotlivých pacientů, což může být využito k monitoraci situací selhání léku např. při krvácivých nebo trombotických stavech.

Seznam citací

- [1] – Dr. Hans-Jurgen Kolde, str. 1, Haemostasis, 2004, Pentapharm Ltd., Basil, Switzerland
- [2] – M.Penka, E. Tesařová a kolektiv, str. 55, Hematologie a transfuzní lékařství I, 2011, Grada Publishing a.s.

Seznam použité literatury

- D.C.Anderson, Effects of New Oral Anticoagulant on Measures of Anticoagulation, School of Pharmacy, Cedarville University
- http://en.wikipedia.org/wiki/Spearman%27s_rank_correlation_coefficient (14.4.2014)
- European Medicines Agency, www.ema.europa.eu
- Farmakologické informace, Farmakologická prevence trombembolické nemoci, 2.část, 2011, č.7-8
- H. J. Kolde, Haemostasis, 2004, Pentapharm Ltd., Basel, Switzerland
- J.Gumulec, Krvácivé komplikace a předávkování antikoagulační léčby, Klinická farmakologie a farmacie, 2012, 26(2)
- J.Šlechtová, Hemostáza – jak ji možná neznáme, Klinická biochemie a metabolismus, 2007, 15(36)
- J.Veselý, Poruchy hemostázy a testy hemostázy, LF UPOL
- M. Penka, A.Bulíková a kol., Neonkologická hematologie, Grada Publishing, 2009
- M. Penka, E. Tesařová a kolektiv, Hematologie a transfuzní lékařství I, 2011, Grada Publishing a.s.
- P. Janicadis, Hemostáza, základní vyšetření hemostázy, DIC, TEN, 2003
- P.Riley, Thrombin Generation Assay Aids Development: Calibrated Automated Thrombogram System for Global Hemostasis Measurements, Genetic Engineering & Biotechnology News, 32(9), 2012
- R.Večeřa, materiály k předmětu OCH/FAR – Základy farmakologie, UPOL
- R.Vrzal, materiály k předmětu KBB/ZHEM – Základy hematologie, UPOL
- Státní ústav pro kontrolu léčiv, www.sukl.cz
- www.practical-haemostasis.com
- www.wikiskripta.eu/index.php/Heparin (14.4.2014)