

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

STANOVENÍ HLADINY XABANŮ FUNKČNÍ METODOU A HPLC
DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Bc.Monika Zhánělová

Studijní obor: Analytická chemie

Vedoucí práce: Mgr.Luděk Slavík Ph.D.

Olomouc 2016

SOUHRN

Tato diplomová práce s názvem „Stanovení hladiny xabanů funkční metodou a HPLC“ se zabývá problematikou kvantitativního stanovení nových orálních antikoagulancií (NOAC), konkrétně rivaroxabanu a apixabanu, která znamenala velký průlom v antikoagulační léčbě, jelikož řeší řadu problémů spojených s užíváním antikoagulancií klasických (hepariny, antagonisté vitamínu K).

Teoretická část této práce pojednává o hemostáze, jejích jednotlivých fázích a regulaci. Následují kapitoly zabývající se antikoagulancii, inhibitory koagulační kaskády, a to jak klasickými, tak NOAC (dabigatran, apixaban, rivaroxaban). Závěrečné kapitoly se zaobírají metodami monitorování antikoagulační léčby a HPLC stanovením.

Cílem experimentální části je korelace tří metod stanovení rivaroxabanu a apixabanu v plazmě – chromogenního stanovení anti-Xa aktivity, trombin generačního testu a HPLC-MS/MS a porovnání výhod a nevýhod jednotlivých stanovení. Chromogenní stanovení anti-Xa aktivity a trombin generační test byly provedeny v Koagulační laboratoři Hemato-onkologické kliniky FNOL v Olomouci, HPLC-MS na Oddělení klinické biochemie FNOL.

SUMMARY

This diploma thesis “Determination of xabans by functional method and HPLC” deals with quantitative determination of new oral anticoagulants (NOAC), particularly rivaroxaban and apixaban, which meant a great break-through in the anticoagulation therapy since they overcome the problems associated with classic anticoagulants (heparins, vitamin K antagonists).

The theoretical part discusses hemostasis, its phases and regulation, furthermore anticoagulants, coagulation cascade inhibitors, both classic and NOAC (dabigatran, rivaroxaban, apixaban) and also methods of anticoagulation therapy monitoring including HPLC.

The experimental part aims to correlate three methods of determination of rivaroxaban and apixaban in human plasma – chromogenic anti-Xa activity assay, thrombin generation assay and HPLC-MS and to confront their advantages and disadvantages. Chromogenic anti-Xa activity assay and thrombin generation assay was performed in Coagulation laboratory of Clinics of hematooncology, FNOL and HPLC-MS at the Department of clinical biochemistry, FNOL.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Vlastnoruční podpis

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 RNDr. Jiřímu Lukešovi a celému kolektivu Koagulační laboratoře Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, který mi vždy vytvořil příjemné pracovní prostředí.

OBSAH

	Stránka
1. Úvod	8
2. Teoretická část	9
2.1 Hemostáza	9
2.1.1 Primární hemostáza	9
2.1.2 Koagulační kaskáda	10
2.1.3 Fibrinolýza	12
2.2 Antikoagulancia	14
2.2.1 Antagonisté vitamínu K	15
2.2.2 Hepariny	15
2.2.3 Srovnání výhod a nevýhod klasických antikoagulancií	16
2.3 NOAC – New Oral Anticoagulants	18
2.3.1 Rivaroxaban	21
2.3.2 Apixaban	23
2.3.3 Dabigatran	24
2.3.4 Srovnání NOAC	26
2.4 Monitorace antikoagulační léčby	27
2.4.1 Testování hemostázy	27
2.4.2 Monitorace NOAC	30
2.4.3 HPLC-MS	32
3. Experimentální část	35
3.1 Cíle experimentální části	35
3.2 Přístroje	35
3.3 Chemikálie	35
3.4 Pracovní postup	36
3.5 Metodika	37
4. Výsledky a diskuze	38
4.1 TGA	38
4.1.1 Opakovatelnost měření	38
4.1.2 Reprodukovatelnost měření	40
4.1.3 Kalibrace	41

4.2 Korelace metod stanovení xabanů	42
4.2.1 Rivaroxaban	42
4.2.2 Apixaban	46
4.3 Vliv interferujících látek na jednotlivá stanovení	50
5. Závěr	55
6. Literatura	58
7. Seznam použitých zkratk a symbolů	59
8. Přílohy	

1. Úvod

Užívání klasických antikoagulancií typu hepariny a antagonisté vitamínu K (warfarin) je spojeno s řadou komplikací. Mezi ty nejpodstatnější lze řadit nepředvídatelnost účinku, nutnost monitorace léčby, vysoké riziko krvácení či intravenózní podání.

Za účelem překonání těchto nedostatků byla vyvinuta nová orální antikoagulancia (NOAC) s předvídatelným účinkem, výjimečnou nutností monitorace léčby, sníženým rizikem krvácení a perorálním užitím.

Monitorace NOAC je nezbytná v případě potřeby akutní operace, krvácení či selhání léčby a je doporučována u pacientů se sníženou funkcí ledvin a jater. Jelikož pro NOAC nebyly vyvinuty specifické testy, využívá se k jejich stanovení testů určených pro klasická antikoagulancia. Ty ale nejsou pro monitoraci NOAC vždy vhodné. Referenční metodou pro určení vhodnosti daného testu je HPLC-MS.

2. Teoretická část

2.1 Hemostáza¹

Hemostáza je komplexní proces, který zabezpečuje plynulý tok krve cévami, brání větší ztrátě krve a je prvním krokem v hojení poškozených cév. Jedná se o proces řízený proteiny, z nichž nejvýznamnější roli mají kolagen, von Willebrandův faktor, tkáňový faktor, trombin, fibrinogen, fibrin a plasmin. U správně fungující hemostázy je rovnováha mezi prokoagulanty a antikoagulanty. V takovém případě nedochází k život ohrožujícím situacím typu krvácení či trombóza.

V případě poranění cévy je první odpovědí těla lokální vazokonstrikce v místě poranění, která je následována aktivací krevních destiček vedoucí k jejich adhezi a k tvorbě primární krevní zátky. Tyto procesy souhrnně označujeme jako primární hemostázu. Na ni navazuje hemostáza sekundární, také označovaná jako hemokoagulace či koagulační kaskáda. Jedná se o sérii enzymatických reakcí vedoucích k tvorbě nerozpustného fibrinu, který zpevňuje primární zátku a tvoří krevní koláč. Posledním krokem hemostázy je fibrinolýza, během které dochází k rozpuštění sraženiny plasminem.

2.1.1 Primární hemostáza¹

Za normálních okolností, kdy nedošlo k žádnému poranění, brání buňky endotelu přítomné ve stěně cév tvorbě trombu a to pěti základními mechanismy. Dochází k sekreci prostacyklinu PGI_2 , který brání aktivaci a agregaci destiček, k sekreci NO, který také brání aktivaci a agregaci destiček a navíc působí jako vazodilatans, k expresi heparin sulfátu, který aktivuje antitrombin, k expresi trombomodulinu, který inhibuje trombin, a k expresi inhibitoru tkáňového faktoru, který inhibuje komplex TF/VIIa/Xa. Tato prevence spontánního vzniku trombózy zabezpečuje laminární tok krve cévou.

Ve chvíli, kdy dojde k poranění cévy, je první odpovědí organismu krátkodobý vazospasmus, který má význam u zastavení krvácení malých cév. V případě, že k zastavení krvácení nedošlo, následují další kroky primární hemostázy. Nejdříve dochází k adhezi krevních destiček na subendotelový kolagen, který je při poranění exponován krví, a to buď přímo přes receptory GP VI a GP Ia/IIa nebo přes von Willebrandův faktor za pomoci receptorového komplexu GP Ib-V-IX. Navázáním dojde k aktivaci krevních destiček. Ty se normálně vyskytují v neaktivní formě, aktivovat se mohou, jak již bylo zmíněno, vazbou na

kolagen, nebo také za pomoci ADP (produkován aktivními destičkami), tromboxanem A (produkován aktivovanými destičkami) nebo trombinem (tvořen v koagulační kaskádě). Aktivované destičky uvolňují α -granula obsahující fibrinogen, vWF a FV, denzní granula obsahující ADP a umožňují difúzi tromboxanu A. Jejich aktivace je spojena také se změnou tvaru, pravidelný diskoidní tvar se mění na nepravidelný s filopodii. Cílem této změny je zvětšit povrch destiček pro agregaci, která je dalším krokem primární hemostázy. Během agregace se destičky na sebe váží s využitím receptoru GP IIb/III přes vWF nebo fibrinogen a tvoří primární krevní zátku.

2.1.2 Koagulační kaskáda¹

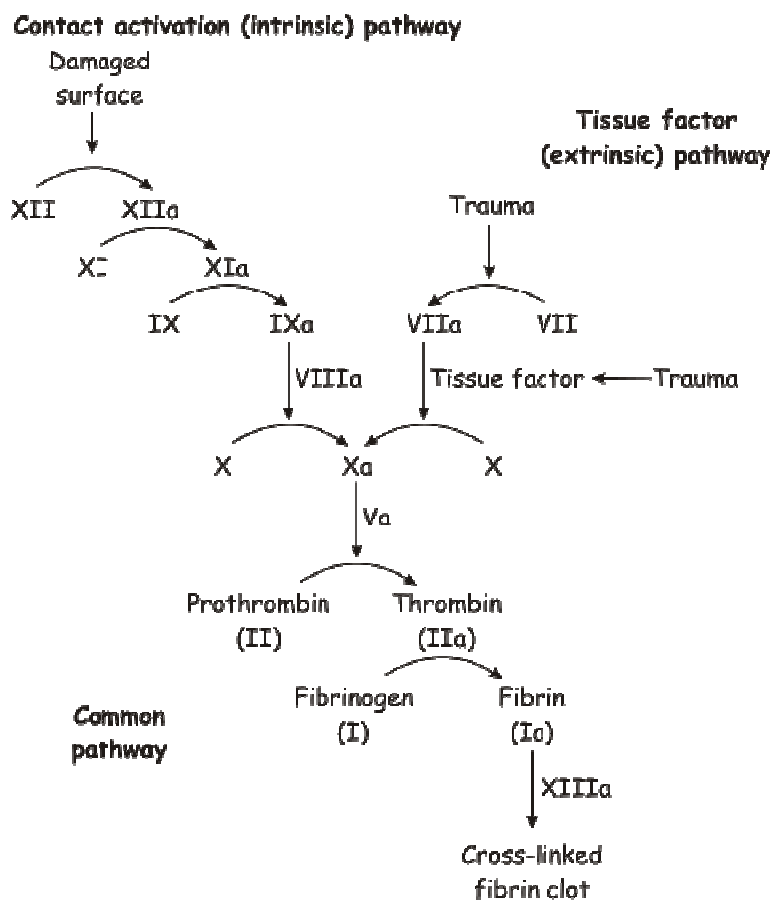
Jako koagulační kaskáda je označována série enzymatických konverzí neaktivních proenzymů (zymogenů) na aktivní enzymy.

Tradiční model koagulační kaskády znázorňuje Obr. 1. Dle něj lze koagulační kaskádu rozdělit na dvě paralelní cesty hemokoagulace – vnitřní a zevní, které se spojují do cesty společné. Zevní cesta má význam v iniciaci krevního srážení. Tkáňový faktor uvolněný v místě poranění společně s aktivovaným srážecím faktorem VIIa katalyzují aktivaci srážecího faktoru X na aktivovaný faktor Xa, který vstupuje do společné cesty hemokoagulace. Vnitřní cesta má význam především v rozvoji krevního srážení. Je započata aktivací koagulačního faktoru XII kontaktem s negativně nabitým povrchem. Aktivovaný faktor XIIa katalyzuje konverzi neaktivního faktoru XI na aktivní faktor XIa, ten katalyzuje aktivaci koagulačního faktoru IX na FIXa a ten společně s aktivovaným faktorem VIIIa katalyzuje konverzi FX na jeho aktivní formu FXa, která vstupuje do společné cesty hemokoagulace. V ní je za pomoci aktivovaných faktorů Xa a Va převeden protrombin na trombin katalyzující přeměnu rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin zpevňující za pomoci FXIIIa primární zátku. Ke všem konverzím v rámci koagulační kaskády je nutná přítomnost Ca^{2+} iontů.

Moderní pohled na hemokoagulaci rozděluje koagulační kaskádu do tří základních fází. Ve fázi iniciační je tkáňový faktor uvolněn z místa poranění, váže FVII a aktivuje ho, společně tvoří komplex FVIIa/TF (komplex vnější tenázy, extrinsic tenase) aktivující FX a FXa váže FVa (komplex protrombináza), který aktivuje malé množství protrombinu. Ve fázi amplifikační dochází k aktivaci řady koagulačních faktorů - trombin aktivuje FV, FVIII a FXI a komplex VIIa/TF aktivuje FIX. Aktivované faktory IXa a VIIIa vytvoří komplex FIXa/VIII

(komplex vnitřní tenázy, intrinsic tenase), který aktivuje FX a aktivovaný faktor Xa umožňuje konverzi protrombinu (FII) na trombin (FIIa). Ve finální fázi je za katalýzy trombinem převeden fibrinogen na fibrin, ten polymerizuje a společně s trombinem aktivovaným faktorem XIIIa zpevňuje a stabilizuje primární zátku za vzniku krevního koláče.

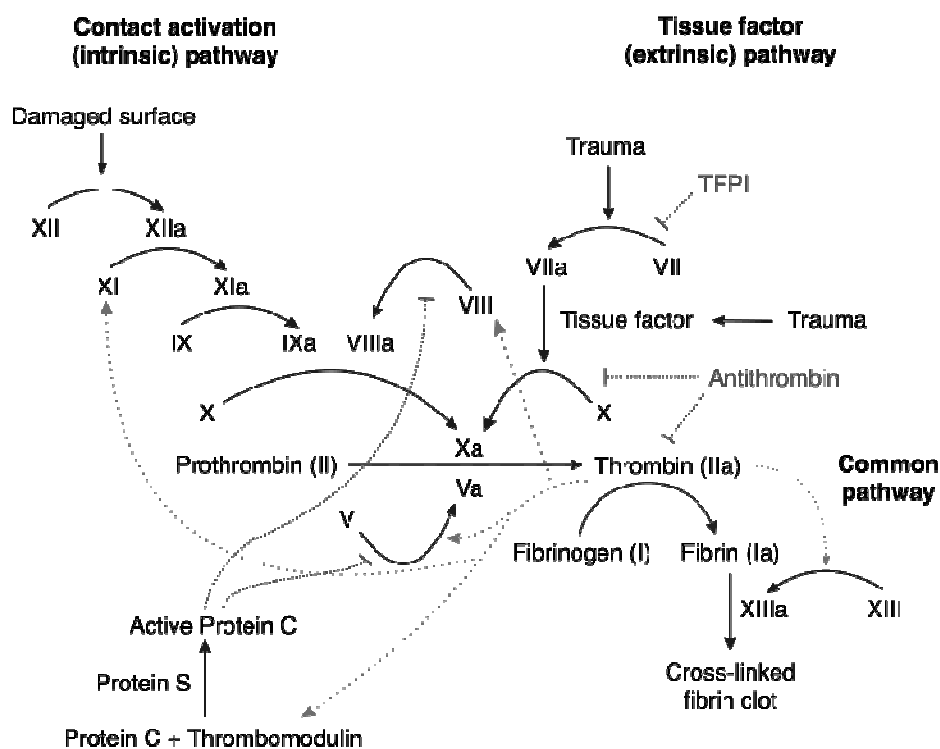
Některé koagulační faktory (FII, FVII, FIX, FI) jsou označovány jako vitamín K dependentní. Vitamín K působí jako koenzym v jejich post-translační modifikaci, kdy dochází ke γ -karboxylaci, která umožňuje navázání Ca^{2+} iontů vedoucí k jejich aktivaci.



Obrázek 1 – Koagulační kaskáda²

Další růst krevní sraženiny, tak aby nedocházelo k jejímu uvolňování do krevního řečiště a byl zachován plynulý krevní tok, je zastaven antitrombotickými mechanismy, jak je znázorněno na Obr. 2. Antitrombin III je inhibitor serinových proteas s největší afinitou k trombinu a FXa, který ale inhibuje i další koagulační faktory (FVIIa, FVIXa, FXIa) a jeho účinek je umocňován heparinem. Protein C je plazmatický glykoprotein, k jehož aktivaci

dochází přes trombomodulin, a který společně s proteinem S působícím jako kofaktor inaktivuje koagulační faktory Va a VIIIa. TFPI neboli inhibitor tkáňového faktoru je inhibitor serinových proteas, který reverzibilně inhibuje srážecí faktor Xa a komplex VIIa/TF a tím zastavuje zevní cestu koagulace.



Obrázek 2 - Antitrombotické mechanismy³

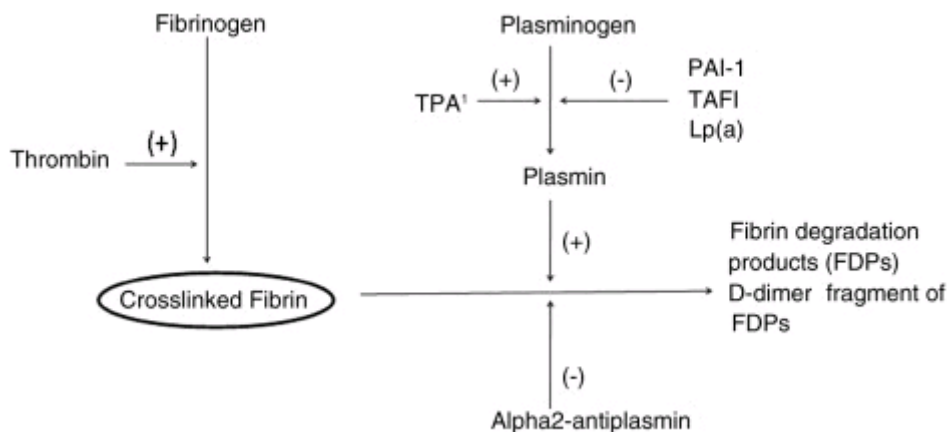
2.1.3 Fibrinolýza¹

Fibrinolýza je proces odstranění sraženiny z těla za účelem zachování plynulosti cirkulace. V prvním kroku dochází k aktivaci plazminogenu (proenzym) a jeho konverzi na plazmin, proteázový enzym. Tato konverze je katalyzována tkáňovým aktivátorem plazminogenu (t-Pa, uvolňován buňkami endotelu) a aktivátorem plazminogenu urokinásového typu (u-Pa, uvolňován tělními buňkami). Ve kroku druhém plazmin štěpí fibrin na fibrin degradační produkty a finální produkt odbourání D-dimer.

I tento krok hemostázy je nutno regulovat, snížená fibrinolýza by mohla vést ke vzniku trombóz, zvýšená fibrinolýza ke krvácení. Primární regulaci zprostředkovává antiplazmin (α -2AP), inhibitor plazminu, tedy inhibitor konverze fibrinu na fibrin degradační produkty. Dále se na ní podílí inhibitor aktivátorů plazminogenu (PAI-1), který inhibuje t-Pa

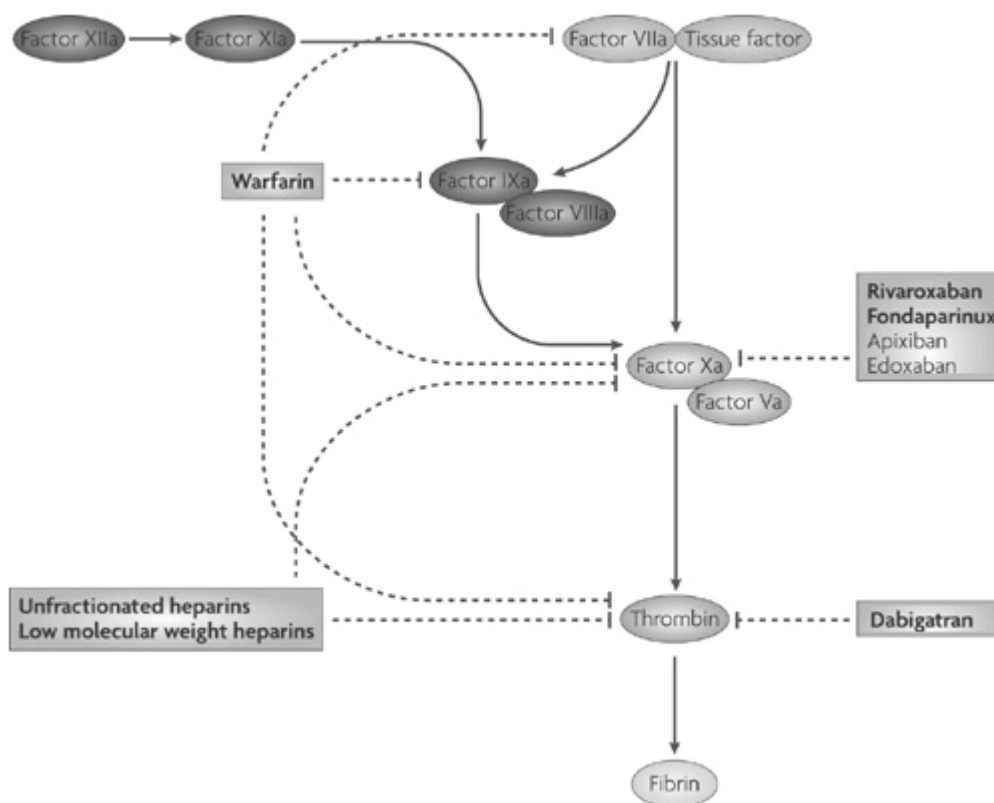
a u-Pa a tím brání konverzi plazminogenu na plazmin. Obdobně působí i TAFI, trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy známý také jako plazmatická karboxypeptidáza B a Lp(a), lipoprotein A. Procesy účastníci se fibrinolýzy a její regulace znázorňuje Obr. 3.

Obrázek 3 – Fibrinolýza⁴



2.2 Antikoagulancia¹

Jako antikoagulancia jsou označovány léky proti srážení krve tedy inhibitory hemokoagulace. Lze je rozdělit do čtyř hlavních skupin dle mechanismu jejich akce, jak znázorňuje Obr. 4. První skupinou jsou antagonisté vitamínu K, jejichž nejvýznamnějším zástupcem je warfarin. Druhou skupinu tvoří induktory antitrombinu, kam řadíme hepariny. Tyto dvě skupiny patří mezi tzv. klasická antikoagulancia, která mají v antikoagulační terapii bohatou historii. Další dvě skupiny – přímé inhibitory trombinu (dabigatran) a přímé inhibitory FXa (rivaroxaban, apixaban) řadíme mezi tzv. NOAC (nová orální antikoagulancia), která se objevila na trhu v poslední dekádě a jejich role v antikoagulační terapii ještě není přesně definována.



Obrázek 4 - Mechanismus účinku antikoagulancií⁵

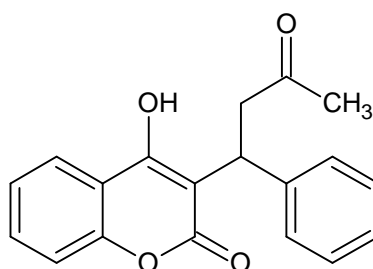
Společnými indikacemi pro všechna antikoagulancia jsou

- prevence VTE (venózní trombembolická nemoc)
- prevence cévní mozkové příhody
- léčba DVT (hluboká žilní trombóza) a PE (plicní embolie)

- prevence DVT a PE
- léčba ACS (akutní koronární syndrom)
- léčba genetických či získaných trombofilických poruch.

2.2.1 Antagonisté vitamínu K¹

Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny antikoagulancií je warfarin. Patří mezi kumariny, přirozeně se vyskytující toxiny. Jeho strukturu zobrazuje Obr. 5. Byl vyvinut ve 40. letech 20.století jako jed na krysy, už v 50.letech se ale začal využívat jako antikoagulancium a dnes je nejběžněji užívaným antikoagulanciem vůbec.



Obrázek 5 - Struktura warfarin.

Warfarin inhibuje vitamín K epoxid reduktázu, nedochází tak ke γ -karboxylaci vitamín K dependentních faktorů, ty nejsou schopny navázat Ca^{2+} ionty a nemohou se proto aktivovat. Tyto faktory jsou tak nefunkční a je zastavena zevní cesta hemokoagulace.

Mezi výhody warfarinu patří perorální užití, které je vhodné zvláště při dlouhodobé antikoagulační léčbě, zkušenosti s jeho užíváním a také možnost využití klasických testů (INR) pro jeho monitoraci. Naopak mezi nevýhody patří úzké terapeutické okno, nepředvídatelný účinek, nutná monitorace léčby, přizpůsobování dávky, interakce se stravou a jinými léky (např. se všemi antibiotiky, která narušují střevní mikroflóru, ve které dochází k produkci vitamínu K₂), pomalý nástup a odeznění účinku, vysoké riziko krvácení a výskyt warfarinem indukované nekrózy kůže, která je sice vzácná, ale život ohrožující.

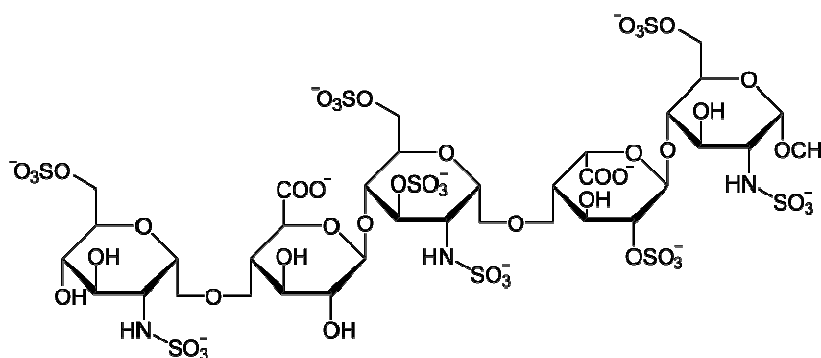
2.2.2 Hepariny¹

Hepariny jsou v přírodě se vyskytující lineární polysacharidy s opakující se, různě sulfatovanou disacharidovou sekvencí. Pro všechny hepariny je typická specifická pentasacharidová sekvence schopná vazby na antitrombin a také negativní náboj pro usnadnění této vazby.

Hepariny se váží na antitrombin, způsobují jeho konformační změnu a tím urychlují inaktivaci trombinu a FXa, čímž inhibují společnou cestu koagulace. Při této inhibici vzniká ternární komplex heparin-trombin-antitrombin.

Hepariny můžeme rozdělit na tři základní skupiny:

- nefrakcionovaný heparin (UFH) – průměrná délka 45 sacharidových jednotek (15 000 Da)
- nízkomolekulární heparin (LMWH) – průměrná délka 15 sacharidových jednotek (5 000 Da), vzniká frakcionací či depolymerizací heparinu
- fondaparinux – syntetická sloučenina sestávající z pro heparin typické pentasacharidové sekvence (viz Obr. 6)



Obrázek 6 - Struktura fondaparinuxu⁶

Mezi výhody UFH patří rychlý nástup i odeznění účinku, snadná monitorace s využitím APTT, existence vhodného antidota protaminu a možnost užívání i pro pacienty s omezenou funkcí ledvin. Naopak mezi nevýhody patří intravenózní podání, nutnost časté monitorace, variabilita v účinnosti léčby mezi pacienty či výskyt HIT (heparinem indukovaná trombocytopenie – masivní, život ohrožující trombóza).

Výhodami LMWH jsou dlouhotrvající akce a menší nutnost monitorace léčby. Nevýhodami potom jsou intravenózní podání, nevhodnost pro pacienty s omezenou funkcí ledvin, specifická metoda stanovení (anti-Xa aktivita), výskyt HIT, nespolehlivý efekt antidota a variabilita v účinnosti léčby mezi pacienty. (3)

2.2.3 Srovnání výhod a nevýhod klasických antikoagulancií

Následující tabulka shrnuje výhody a nevýhody spojené s antikoagulační léčbou jednotlivými zástupci klasických antikoagulancií. Zvláště přítomnost velkého množství

komplikací a rizik vedla ke snaze vytvořit antikoagulantia nová, která by již tyto nevýhody nevykazovala.

Tabulka I: Výhody a nevýhody klasických antikoagulantů⁷

	VÝHODY	NEVÝHODY
WARFARIN	<ul style="list-style-type: none"> - orální podání - standard pro profylaxi VTE - zkušenosti - využití INR pro monitoraci 	<ul style="list-style-type: none"> - nepředvídatelný účinek - nutnost monitorace léčby - uzpůsobování dávky - nízký terapeutický index - řada interakcí - riziko krvácení - variabilita mezi pacienty
UFH	<ul style="list-style-type: none"> - rychlý nástup i odeznění účinku - antidotum - snadná monitorace (APTT) 	<ul style="list-style-type: none"> - nepředvídatelný účinek - nutnost monitorace léčby - nízký terapeutický index - řada interakcí - riziko krvácení - variabilita mezi pacienty - HIT - nitrožilní podání - neinhibuje trombin vázaný ve sraženině
LMWH	<ul style="list-style-type: none"> - menší nutnost monitorace - dlouhotrvající akce (dávka 1-2x denně) 	<ul style="list-style-type: none"> - riziko krvácení - HIT - nitrožilní podání - neinhibuje trombin vázaný ve sraženině - speciální metoda stanovení

2.3 NOAC – New Oral Anticoagulants

V předešlé kapitole byla zmíněna řada komplikací spojených s užíváním heparinů a VKA. Jak by tedy mělo vypadat ideální antikoagulancium? Mělo by umožňovat jak orální, tak parenterální užití, široké terapeutické okno, vhodný poločas rozpadu, rychlý nástup i odeznění účinku, minimum interakcí s jinými léčivými a stravou. Mělo by se jednat o látky, které vykazují specifické vazebné interakce v plazmě a inhibují jak volné, tak vázané koagulační faktory. V takovém případě by mohla být pacientům podávána fixní dávka bez nutnosti rutinní monitorace.

S cílem splnění těchto požadavků byla vyvinuta nová řada antikoagulancií označovaných jako NOAC (New Oral Anticoagulants). Jedná se o přímé inhibitory koagulačních faktorů a to jak volných, tak vázaných, které se přímo vážou do aktivního katalytického místa faktoru a tím inhibují jeho funkci.⁷

Předchůdcem NOAC byl hirudin produkovaný slinnými žlázami pijavice (*Hirudinea*). Jeho širšímu využití bránil fakt, že se váže na trombin ireverzibilně a tím zvyšuje riziko krvácení.

Na něj navázala produkce malých molekul reverzibilně se vážících na koagulační faktory s možností orálního podání. Tyto látky lze rozdělit do dvou základních skupin na gatran, přímé inhibitory faktoru IIa (trombinu), a xabany, přímé inhibitory faktoru Xa. Prvním antikoagulanciem z této řady se stal melagatran (proléčivo ximelagatran), přímý inhibitor trombinu. Jeho účinnost byla obdobná jako u LMWH stejně jako riziko krvácení. Výhodou byla menší potřeba monitorace. Jeho uvedení na trh zastavilo až prokázání hepatotoxicity. V současné době užívaným NOAC – přímému inhibitoru trombinu dabigatranu a přímým inhibitorům FXa rivaroxabanu a apixabanu – se budou věnovat další kapitoly. Do budoucna se počítá s uvedením na trh dalšího antikoagulancia patřícího do skupiny xabanů – edoxabanu.

Mezi hlavní výhody NOAC patří rychlý nástup a odeznění účinku. NOAC téměř okamžitě inhibují aktivní místo koagulačního faktoru a není je tedy třeba užívat s velkým předstihem. Obdobně je to s odezněním účinku, před operací stačí vysadit léčbu 1-2 dny předem u rivaroxabanu a apixabanu a 4 dny předem u dabigatranu. Tento fakt znamenal významné vylepšení antikoagulační léčby, např. u warfarinu, který působí na koagulační kaskádu nepřímo inhibicí vitamín K epoxidreduktasy a vitamín K reduktasy, což vede k tvorbě dysfunkčních koagulačních faktorů, je nástup i odeznění účinku velice pomalé (řádově dny).

Další výhodou je pohodlnější aplikace. NOAC nabízí perorální podání místo parenterálního, což je pro pacienty zvláště s dlouhodobou antikoagulační léčbou velkým ulehčením. Perorální užití může být ale i limitací, např. u pacientů, u nichž se vyskytl pooperační ileus (neprůchodnost střev), je perorální užívání léčiv zcela nevhodné.

Jedním z požadavků na ideální koagulancium bylo také minimum interakcí s jinými léčivy a stravou. I v tomto jsou NOAC velkým přínosem. Interakcí s jinými léčivy je obecně velmi málo. Jedná se především o látky ovlivňující efluxní transportér P-glykoprotein (P-gp) nebo cytochrom CYP 3A4, které hrají roli ve farmakokinetice NOAC. Takovéto látky nejsou hojně užívané, efekt NOAC je tak poměrně předvídatelný a není nutná rutinní monitorace léčby. Dalším typem látek interagujících s NOAC jsou ostatní antikoagulancia, ty mají vliv na farmakodynamiku léku. Blíže se těmto interakcím budou věnovat následující kapitoly pojednávající o jednotlivých zástupcích NOAC. Co se stravy týká, NOAC nevykazují žádné interakce.

Mezi výhody NOAC se řadí taktéž fixní dávka. Tato antikoagulancia umožňují předepisování jednotné dávky většině pacientů (výjimku tvoří pacienti nad 75 let se sníženou funkcí ledvin, u nichž je doporučeno dávku snížit). Pro porovnání, v dávkování warfarinu jsou až 40ti násobné rozdíly v dávkách (0,5-20mg/den) u pacientů zdravých a ještě větší rozdíly u pacientů s rezistencí k warfarinu.

Užívání NOAC znamená také snížení rizika intrakraniálního krvácení oproti warfarinu, u něhož bylo toto riziko příliš vysoké a v 50% případů končilo úmrtím pacienta.

Mezi nevýhody spojené s užíváním NOAC se mimo jiné řadí chybějící antidota. To je také důvod, proč nebyl nástup NOAC tak rychlý, jak se s ohledem na vylepšení antikoagulační léčby čekalo. Uvažujeme-li ale výrazné snížení rizika krvácení oproti antikoagulanciím starým (intrakraniálního i gastrointestinálního, potvrzeno US FDA) společně s krátkým biologickým poločasem eliminace, nejedná se o až tak závažný limitující faktor. Specifická antidota pro NOAC jsou navíc ve vývoji. Vhodným antidotem pro dabigatran se ukázal humanizovaný Fab fragment monoklonálních protilátek, pro rivaroxaban a apixaban rekombinantní protein PRT4445.

Dalším problémem je stanovení hladiny NOAC v plazmě. Rutinní analýza není u NOAC vyžadována, nicméně v závažných situacích, jako je krvácení nebo akutní operace, je třeba znát jejich aktuální antikoagulační účinek. Pro stanovení hladiny heparinů a VKA se využívá základních koagulačních testů (APTT, INR), ty jsou ovšem pro NOAC nevyhovující.

Analýza NOAC je spojena s využitím specifických selektivních testů, o nichž pojednává kapitola Monitorace antikoagulační léčby. Problémem s tím spojeným je nezkušenost lékařů s interpretací výsledků těchto testů. Tento nedostatek částečně řeší poměrně nízká incidence situací, u nichž je stanovení NOAC vyžadováno. Např. u rivaroxabanu se krvácení vyskytuje jen u 1-4% pacientů, potřeba akutní operace u 1%.

Vzhledem k tomu, že se rutinní monitorace při antikoagulační léčbě NOAC neprovádí, je otázkou, zda nebude docházet k diferenciaci účinnosti léčby v závislosti na zodpovědnosti daného pacienta. Řada pacientů léčených warfarinem, který je monitorován každé 2-3 týdny, je totiž pod terapeutickou hladinou, jelikož buď léky neberou, trpí průjmy, nebo volí nesprávné složení stravy s ohledem na antikoagulační léčbu (potravinou bohaté na obsah vitamínu K, např. zelené části rostlin). V tomto případě bude velkou roli hrát informovanost pacientů.

Nevýhoda spojená s renální eliminací léčiv je společná pro všechna antikoagulantia. Z NOAC je tento problém nejzávažnější u dabigatranu (80% renální eliminace, u rivaroxabanu 33%, u apixabanu 25%). V případě renálního selhání dochází k akumulaci léčiva v těle, což vede ke zvýšení rizika krvácení. U pacientů s dlouhodobou antikoagulační léčbou je proto doporučováno každý rok kontrolovat funkci ledvin.

Sporným bodem je cena antikoagulační léčby. NOAC jako takové jsou dražší než antikoagulantia starší. Vezme-li se ale v úvahu cena pravidelné monitorace a uzpůsobování dávky lékařem, vychází z tohoto hlediska lépe NOAC.

Ač jsou NOAC spojeny kromě řady výhod i s řadou nevýhod, nejsou tyto komplikace natolik vážné, případně mají řešení nebo jsou společné pro všechna antikoagulantia, a proto lze konstatovat, že NOAC přinesly vylepšení antikoagulační léčby oproti starším antikoagulantium. V následující tabulce jsou shrnuty výhody a nevýhody antikoagulační léčby NOAC oproti heparinům a warfarinu.⁸

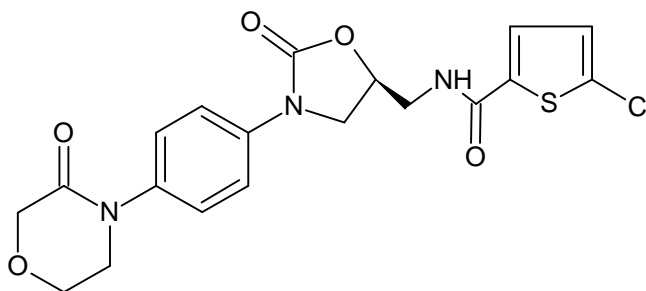
Tabulka II – Výhody a nevýhody NOAC⁸

VÝHODY	NEVÝHODY
Rychlý nástup i odeznění účinku	Nevhodnost klasických metod stanovení
Krátký biologický poločas eliminace	Bez specifických antidot
Malé variace v dávkování	Renální vylučování
Málo interakcí s jinými léčivy	Bez kontroly správného průběhu léčby
Bez interakcí s jídlem	Snížená dávka pro některé indikace
Snížení rizika intrakraniálního krvácení	

2.3.1 Rivaroxaban⁹

Rivaroxaban, obchodním názvem Xarelto (Bayer, Leverkusen, Německo), je přímý, specifický inhibitor faktoru Xa a to jak volného, tak vázaného ve sraženině či protrombinásovém komplexu. Faktor Xa hraje jednu z hlavních rolí v hemokoagulaci, po aktivaci převádí protrombin na trombin, což vede k tvorbě fibrinové sraženiny a k aktivaci destiček trombinem. Jedná se o kompetitivní inhibici, rivaroxaban má 10 000x větší selektivitu pro FXa než jinou serinovou proteasu, ke své aktivitě přitom nevyžaduje kofaktor.

Chemický název rivaroxabanu je 5-chloro-N-([(5S)-2-oxo-3-[oxomorpholin-4-yl]fenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methyl)thiofen-2-karboxamid ($M_R = 435,88$), jeho strukturu zobrazuje Obr. 7. Dle BSC (Biopharmaceutical Classification System) patří rivaroxaban do třídy II, jedná se tedy o látku s nízkou rozpustností (5-7 mg/l při pH 1-9 ve vodném prostředí) a vysokou permeabilitou. Log P koeficient je roven 1,5, což značí střední lipofilitu, rivaroxaban má tedy nízkou až střední afinitu k periferním tkáním.



Obrázek 7 – Struktura rivaroxabanu

Rivaroxaban je užíván k prevenci VTE (venózní trombembolická nemoc) po výměně kolenního a kyčelního kloubu, k prevenci cévní mozkové příhody a systémové embolie u pacientů s AF (atriální fibrilace), k léčbě DVT (hluboká žilní trombóza) a PE (plicní embolie), k prevenci rekurentní DVT a PE a k prevenci atherotrombotické příhody u pacientů s ACS (akutní koronární syndrom).

Absorpce rivaroxabanu po orálním užití je rychlá (maximální koncentrace v plazmě je dosaženo po 2-4 hodinách), téměř úplná (orální biodostupnost 80-100% pro 10mg tabletu, 66% pro 20mg tabletu) a není ovlivněna jídlem. Rivaroxaban je distribuován z 92-95% plazmovými proteiny (nejčastěji sérovým albuminem), na které je reverzibilně vázán, s distribučním objemem 50l (0,62 l/kg). Eliminace je dvojitá, renální eliminace nezměněného léčiva (36%) za pomoci P-gp a BCRP transportérů a eliminace renální a jaterní metabolizovaného léčiva. Na metabolické degradaci se podílí cytochrom P450 (CYP 3A4, 3A5, 2J2) zprostředkovávající oxidativní biotransformaci a CYP-nezávislé mechanismy,

nejčastěji hydrolýza. Poločas eliminace je 5-9 hodin u mladších pacientů, 11-13 hodin u starších.

Pohlaví, etnicita a tělesná hmotnost nemají vliv na farmakokinetické parametry rivaroxabanu. U pacientů starších 75 let lze pozorovat zvýšenou koncentraci léčiva v plazmě, zvláště pokud je věk spojen se sníženou funkcí ledvin či jater. V takovém případě je vhodné dávku snížit. Poškození funkce ledvin je hodnoceno hodnotou clearance endogenního kreatinu (popisuje glomerulární filtraci), v případě mírného poškození platí $CL_{CR} = 50-80$ ml/min, u středního poškození $CL_{CR} = 30-49$ ml/min a u vážného poškození $CL_{CR} = 29-15$ ml/min. Rivaroxaban není vhodný pro pacienty s $CL_{CR} < 15$ ml/min, u kterých se lék hromadí v těle a způsobuje vysoké riziko krvácení, při $CL_{CR} > 15$ ml/min není třeba dávku upravovat. Poškození funkce jater je hodnoceno stupněm Child-Pugh, kdy stupeň A značí mírné poškození, stupeň B střední poškození a stupeň C vážné poškození. U pacientů s Child-Pugh stupněm B a C dochází k hromadění rivaroxabanu v těle a ke zvyšování rizika krvácení, rivaroxaban tak není u těchto pacientů doporučován.

Rivaroxaban prodlužuje PT (protrombinový čas) a APTT (aktivovaný parciální trombinový čas), což jsou parametry pro hodnocení hemokoagulace (viz kapitola Monitorace antikoagulační léčby). Ač je závislost PT, APTT na koncentraci rivaroxabanu v plazmě lineární, lze pozorovat variace v závislosti na použitých reagentech, věku, poškození ledvin a jater a tyto parametry proto nejsou optimální pro stanovení koncentrace rivaroxabanu v plazmě. Vhodnějším parametrem je aktivita faktoru Xa. Závislost aktivity faktoru Xa na koncentraci rivaroxabanu v plazmě vykazuje exponenciální závislost a ve spojení s vhodnými kalibrátory rivaroxabanu je vhodnou, komerčně dostupnou metodou stanovení širokého rozmezí koncentrací léku v plazmě.

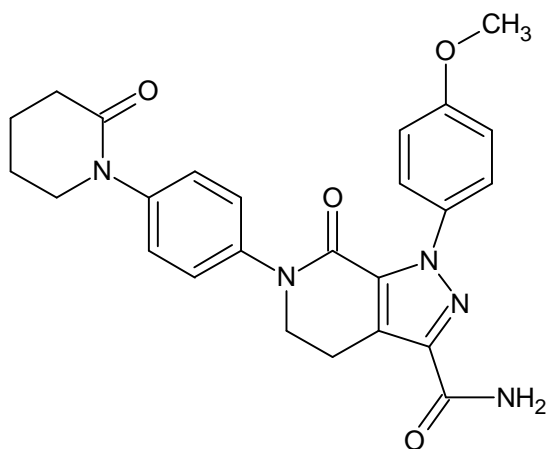
Interakcí rivaroxabanu s jinými léčivy je obecně málo. Zvýšenou koncentraci rivaroxabanu v plazmě lze pozorovat, pokud je užíván společně s inhibitory P-gp a CYP 3A4, v takovémto případě je zvýšené riziko krvácení. Obezřetně je proto třeba předepisovat např. azolové antimykotikum flukonazol nebo antiinfektika erythromycin a clarithromycin. Zcela nevhodná je kombinace rivaroxabanu se silnými inhibitory P-gp a CYP 3A4 jako je azolové antimykotikum ketokonazol či inhibitor HIV proteasy ritonavir. Sníženou koncentraci rivaroxabanu v plazmě lze pozorovat u pacientů současně užívajících induktory P-gp či CYP 3A4, např. antiinfektikum rifampicin. Tyto látky ovlivňují farmakodynamiku léku a jejich současné užívání s rivaroxabanem je nevhodné. Další skupinu interferujících látek tvoří látky

ovlivňující hemostázu. Kombinace rivaroxabanu s jinými antikoagulancii způsobuje větší než aditivní nárůst farmakodynamických vlastností a s tím spojený nárůst rizika krvácení. Protidestičkové léky (např. clopidogrel) a protizánětlivé léky (např. naproxen, aspirin) neovlivňují farmakokinetiku rivaroxabanu, způsobují ale zvýšení rizika krvácivosti a prodloužení doby krvácení.

2.3.2 Apixaban¹⁰

Apixaban, obchodním názvem Eliquis (Bristol-Myers Squibb, NY, USA), je orální, přímý, selektivní inhibitor faktoru Xa a to jak volného, tak vázaného ve sraženině či protrombinásovém komplexu. Jedná se o kompetitivní, vysoce selektivní inhibici, které téměř neovlivňuje jiné serinové proteasy.

Chemický název apixabanu je 1-(4-methoxyfenyl)-7-oxo-6-[4-(2-oxopiperidin-1-yl)fenyl]-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridin-3-karboxamid ($M_R = 459,0$), jeho strukturu znázorňuje Obr. 8. Dle BSC (Biopharmaceutical Classification System) patří apixaban do třídy III, jedná se tedy o látku s vysokou rozpustností (0,04 mg/ml při pH 1,2-6,8 ve vodném prostředí) a nízkou permeabilitou.



Obrázek 8 – Struktura apixabanu

Indikací apixabanu jsou prevence VTE (venózní trombembolická nemoc) po výměně kolenního a kyčelního kloubu, prevence cévní mozkové příhody a systémové embolie u pacientů s AF (atriální fibrilace), léčba DVT (hluboká žilní trombóza) a PE (plicní embolie) a prevence rekurentní DVT a PE.

Absorpce apixabanu po orálním užití je rychlá, maximální koncentrace v plazme je dosaženo po 4 hodinách a není ovlivněna jídlem. Orální biodostupnost je 50% a klesá s rostoucí dávkou (při dávce > 25mg se začíná projevovat omezená rozpustnost apixabanu).

Apixaban je z 87% distribuován za pomoci plazmatických proteinů s distribučním objemem 20l. Eliminace je dvojitá, renální a jaterní. 75% léku odchází z těla nezměněno za pomoci P-gp a BCRP transportérů, zbytek je metabolicky přeměněn za pomoci CYP 3A4, CYP 3A5, CYP 2J2 zprostředkovávajících oxidativní biotransformaci. Biologický poločas eliminace apixabanu je 12 hodin.

Věk, pohlaví, tělesná hmotnost a etnicita nemají klinicky relevantní vliv na farmakokinetické parametry apixabanu, ač mírně zvýšené plazmatické koncentrace bylo možno pozorovat u pacientů starších, u žen a u pacientů s tělesnou hmotností pod 50 kg. V případě pacientů s poškozením funkce ledvin je možno pozorovat zvýšenou koncentraci apixabanu u všech stupňů poškození, nicméně tento nárůst není natolik vážný, aby bylo nutno upravovat dávku. Poškození jater nemá na farmakokinetické parametry apixabanu vliv.

Přítomnost apixabanu v plazmě způsobuje prodloužení parametrů popisujících hemokoagulaci jako jsou PT (protrombinový čas) a APTT (aktivovaný parciální trombinový čas). Závislost APTT a PT na koncentraci apixabanu v plazmě je lineární. Tato metoda stanovení koncentrace apixabanu v plazmě je sice citlivá, nicméně vysoká variabilita mezi komerčně dostupnými kity neumožňuje její využití. Lepším parametrem je stejně jako u rivaroxabanu aktivita faktoru Xa. Měření závislosti aktivity faktoru Xa na koncentraci apixabanu v plazmě s využitím vhodných kalibrátorů se ukazuje jako nejlepší metoda stanovení.

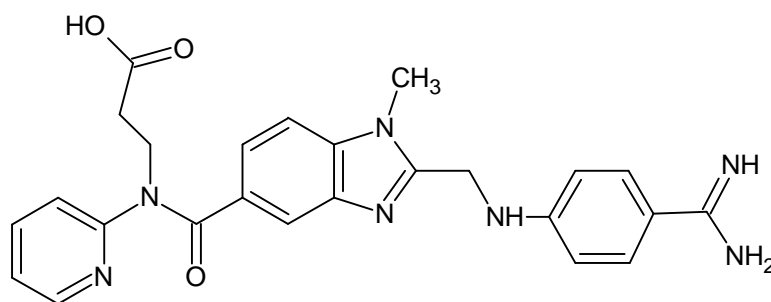
Interakce s jinými léčivými jsou obdobné jako u rivaroxabanu. Zvýšenou koncentraci apixabanu v plazmě lze pozorovat u pacientů současně užívajících inhibitory P-gp či CYP 3A4 jako jsou azolová antimykotika ketokonazol, itrokonazol, vorikonazol, posakonazol či inhibitor HIV proteasy ritonavir. Tyto léky způsobují nárůst koncentrace apixabanu v plazmě a s tím spojené zvýšení rizika krvácivosti a jejich současné užití není doporučováno. Naopak sníženou koncentraci apixabanu v plazmě vykazují pacienti užívající induktory P-gp či CYP 3A4 jako je antiinfektikum rifampicin, u těchto pacientů je nutno předepisovat apixaban velmi obezřetně. Jiná antikoagulancia, protidestičkové či protizánětlivé léky způsobují stejně jako u rivaroxabanu zvýšení rizika krvácivosti.

2.3.3 Dabigatran¹¹

Dabigatran, obchodním názvem Pradaxa (Boehringer, Ingelheim, Německo), je přímý, reverzibilní inhibitor trombinu a to jak volného, tak vázaného ve sraženině. Trombin je jeden

z nejvýznamnějších koagulačních faktorů, který jednak zprostředkovává přeměnu fibrinogenu na fibrin a také aktivuje agregaci krevních destiček v místě poranění. Inhibice je kompetitivní s vysokou selektivitou k trombinu.

Chemický název dabigatranu je 3-[[2-[(4-karbamimidoylanilino)methyl]-1-methylbenzimidazol-5-karbonyl]-pyridin-2-ylamino]propanová kyselina ($M_R = 471.51$), jeho strukturu zobrazuje Obrázek 9. Dle BSC (Biopharmaceutical Classification System) patří dabigatran do třídy II, jedná se tedy o látku s malou rozpustností a vysokou permeabilitou. Jelikož je dabigatran vysoce hydrofilní a není tedy orálně biodostupný, podává se ve formě proléčiva dabigatran etexilátu.



Obrázek 9 – Struktura dabigatranu

Dabigatran je užíván k profylaxi cévní mozkové příhody a systémové embolie u pacientů s AF (atriální fibrilace), k léčbě DVT (hluboká žilní trombóza) a PE (plicní embolie) a k prevenci rekurentní DVT a PE.

Po orálním podání následuje rychlá, téměř úplná hydrolýza proléčiva dabigatran etexilátu za pomoci jaterní esterasy na aktivní formu dabigatran. Maximální koncentrace v plazmě je dosaženo 3 hodiny po podání. Biodostupnost je nízká, jen asi 6,5% nezávisle na stravě. Je proto nutno podávat poměrně velkou dávku. Distribuce je rychlá, z 35% je dabigatran vázán na plazmatické proteiny. Distribuční objem je 60-70l, tedy větší, než jaký je celkový objem vody v těle, lze proto předpokládat střední distribuci v tkáních. Biologický poločas eliminace apixabanu je 12-14 hodin, eliminace je renální, 80% léčiva odchází z těla nezměněno za pomoci transportéru P-gp, zbytek je glukuronidizován v játrech.

Věk, pohlaví, tělesná hmotnost a etnicita nemají klinicky významný vliv na farmakokinetické parametry apixabanu, ač mírně zvýšená koncentrace léku v plazmě je pozorována u pacientů starších a u žen. U pacientů s poruchou funkce ledvin se vyskytuje nárůst koncentrace apixabanu v plazmě, kontraindikován je u pacientů s vážným poškozením ($CL_{CR} = 29-15$ ml/min). Poruchy jater nemají na farmakokinetické parametry apixabanu vliv.

Vzhledem k tomu, že dabigatran není metabolizován cytochromem P450, má jen málo interakcí s jinými léčivými. Jelikož je substrátem pro P-gp, zvýšenou koncentraci dabigatranu v plazmě budou vykazovat pacienti užívající současně inhibitory P-gp (např. antiarytmikum amidaron, azolové antimykotikum ketokonazol, antihypertenzikum verapamil), tento vliv však není klinicky relevantní a proto se nemusí upravovat dávka dabigatranu. Naopak nevhodná je kombinace dabigatranu s induktory P-gp (např. antiinfektikum rifampicin) způsobujícími snížení koncentrace dabigatranu v plazmě. Jiné substráty P-gp (např. kardiotonikum dioxin, atorvastatin) způsobují jen malé změny v koncentraci apixabanu. Jiná antikoagulantia zvyšují riziko krvácivosti a změny farmakodynamických vlastností dabigatranu.

S užíváním dabigatranu jsou spojeny vedlejší účinky. U řady pacientů se vyskytuje ve spojení s antikoagulační léčbou dabigatranem dyspepsie (trávicí obtíže). Také bylo prokázáno zvýšené riziko infarktu myokardu a gastrointestinálního krvácení. To rozdělujeme do tří stupňů; v případě krvácení slabého je odloženo podání další dávky nebo přerušeno léčení, v případě krvácení středně silného následuje symptomatická léčba, chirurgický zákrok, zaškrcení, transfuze, hemodialýza nebo podání aktivního uhlí. V případě krvácení silného se provede filtrace krve přes aktivní uhlí nebo se pacientovi podá rFVIIa (rekombinantní aktivovaný faktor VII) či PCC (protrombinový komplex).

2.3.4 Srovnání NOAC

Role a místo v antikoagulační terapii jednotlivých antikoagulantů bude nutno do budoucna definovat; lze předpokládat diferenciaci na základě farmakokinetiky, klinického popisu a ceny.¹⁰ Tab. III srovnává základní vlastnosti jednotlivých NOAC a udává pro porovnání také informace o warfarinu jakožto zástupci antikoagulantů starších.

Tabulka III - Srovnání NOAC a warfarinu⁸

	D ABIGATRAN	R IVAROXABAN	A PIXABAN	W ARFARIN
BIODOSTUPNOST	6%	100%	50%	N/A
ČAS DO C_{MAX}	3 hod	2 hod	3-4 hod	5 dní
POLOČAS ELIMINACE	12-17 hod	5-9 hod	8-15 hod	36-48 hod
VAZBA NA PROTEINY V PLAZMĚ	35 %	92-95 %	87 %	99 %
DISTRIBUČNÍ OBJEM	60-70 l	50 l	nízký	8 l
RENÁLNÍ VYLUČOVÁNÍ	80 %	33 %	25 %	0 %
INTERAKCE	P-gp	P-gp CYP 3A4	P-gp CYP 3A4	CYP 2C9 CYP 1A2
EFEKT STRAVY	není	není	není	vadí vit K

2.4 Monitorace antikoagulační léčby

2.4.1 Testování hemostázy¹

Monitorace antikoagulační léčby je jen jednou z mnoha indikací testování hemostázy. Mezi další indikace patří krvácení, trombóza, odhalení koagulačních poruch před operací či jinou invazivní metodou nebo prognostika pacientů s poškozením jater.

Mezi běžné testy používané ve většině nemocnic patří počet destiček, PT, INR, APTT, fibrinogen a D-dimer. Ve speciálních situacích se využívá testů specifických jako jsou TT, ACT, anti-Xa aktivita, ECT, antifosfolipidové protilátky, HIT testy či TGA.

2.4.1.1 Počet destiček¹

Jedná se o nejběžněji užívaný test hemostázy, který je součástí kompletního krevního obrazu a poskytuje kvantitativní údaj o trombocytech. Počet destiček se stanovuje z celé krve uchovávané ve speciálních antikoagulačních vialkách s EDTA za pomoci autoanalyzátorů.

Stav, kdy má pacient méně krevních destiček, než je běžné, označujeme jako trombocytopenii. Ta může být způsobena jejich sníženou produkcí (onemocnění kostní dřeně, nevyvážená strava), zvýšenou destrukcí (léky, alkohol, autoimunní onemocnění) nebo hypersplenismem (zvětšená slezina). Stav, kdy má pacient naopak více krevních destiček, než je běžné, označujeme jako trombocytózu. Ta může být následkem infekce, operace, spenektomie, ztráty krve, zhoubného nádoru či myeloproliferačního onemocnění.

2.4.1.2 PT – protrombinový čas¹

Protrombinový čas, také označovaný jako Quickův test, je nejstarším stále užívaným koagulačním testem. Zohledňuje funkci zevní a společné cesty hemokoagulace (FII, FV, FVII, FX, FI) a lze ho využít k monitoraci léčby warfarinem.

K odebrané krvi se v prvním kroku přidává citrát, který váže Ca^{2+} ionty a tím brání samovolnému srážení krve. Krev je poté centrifugována a testuje se oddělená plazma. K ní se přidávají Ca^{2+} ionty a tromboplastin (tkáňový faktor a fosfolipidy) a měří se čas potřebný ke tvorbě sraženiny.

U zdravého pacienta se hodnoty PT pohybují v rozmezí 11-14 s, nicméně tato hodnota je závislá na použitých reagentech, inkubačních a skladovacích podmínkách a metodě koncového stanovení. Za účelem standardizace a mezilaboratorního porovnávání byla

zavedena hodnota INR (international normalized ratio, mezinárodní normovaný poměr), která je matematickým zpracováním PT. Lze ji vypočítat jako poměr pacientova PT a kontrolního PT umocněný na hodnotu ISI (international sensitivity index, index citlivosti) specifickou pro každou reagensii. INR zdravého pacienta se pohybuje v rozmezí 0,8-1,2. Hodnota nižší než 0,8 se nevyskytuje téměř nikdy, hodnota vyšší než 1,2 značí antikoagulační léčbu, sníženou syntézu koagulačních faktorů (nemoc jater, deficit vitamínu K) nebo zvýšenou spotřebu koagulačních faktorů (seps, diseminovaná intravaskulární koagulace).

$$\text{INR} = \left[\frac{\text{PT Patient}}{\text{PT Reference Plasma}} \right]^{\text{ISI}}$$

Obrázek 10 - Výpočet INR¹²

2.4.1.3 APTT – aktivovaný parciální tromboplastinový čas

V případě tohoto testu je průběh stejný jako u PT, ale je přidáván jen parciální tromboplastin (pouze fosfolipidy) společně s aktivačním činidlem (dříve kaolin, dnes silika, kyselina ellagová). Tento test zohledňuje funkci vnitřní a společné cesty hemokoagulace (FVIII, FIX, FXI, FXII, FI, FII, FV a FX) a může být využit k testování koagulační léčby heparinem.

U zdravých pacientů se APTT pohybuje v rozmezí 25-40 s, opět v závislosti na použitých reagensích a testovacím systému. Nic jako INR u APTT dostupné není, každá laboratoř si proto stanovuje vlastní „normální hodnoty“ v závislosti na podmínkách. Při hodnotách nad 40 s lze uvažovat antikoagulační léčbu, von Willebrandovu nemoc, hemofilii, antifosfolipidové protilátky, sepsi či DIC.¹

Obdobou APTT je ACT, aktivovaný koagulační test. Rozdílem je, že se provádí z plné krve a nepřidávají se fosfolipidy, jen aktivační činidlo. Také je výrazně delší, normální hodnoty se pohybují v rozmezí 120-180 s, u antikoagulační léčby v rozmezí 300-600 s. Využívá se především k monitoraci léčby nefrakcionovaným heparinem.¹³

2.4.1.4 Fibrinogen¹

Tento test není tolik častý, jedná se o stanovení hladiny fibrinogenu. Ten je produkován v játrech a normální hodnota se pohybuje v rozmezí 200-400 mg/dl. Zvýšenou hodnotu vykazují pacienti s reakcí akutní fáze (zánět, poškození tkání) či těhotné ženy, sníženou hodnotu potom pacienti trpící selháním jater či DIC.

2.4.1.5 D-dimer¹

D-dimer je finální degradační produkt fibrinu, jeho přítomnost značí nedávnou intravaskulární koagulaci. Běžné hodnoty se pohybují pod 0,5 mg/dl, hodnoty vyšší mohou značit žilní trombembolismus, arteriální sraženinu, sepsi, DIC, maligní nádor, nedávnou operaci, selhání jater či těhotenství.

2.4.1.6 TT – trombinový čas

Trombinový čas se stanovuje z dekalcifikované plazmy po přidání nadbytku trombinu (hovězí/lidský). Zohledňuje společnou cestu hemokoagulace. Normální hodnoty se pohybují v rozmezí 11-19 s, zvýšené hodnoty mohou být způsobeny antikoagulační léčbou heparinem, zvýšeným množstvím fibrin degradačních produktů, nemocí jater či DIS.¹

Dilutovaný trombinový čas dTT je modifikací klasického TT, jediným rozdílem je, že se plazma pacienta ředí plazmou zdravou. Využívá se ke stanovení přímých inhibitorů trombinu s využitím metody kalibrační křivky.¹⁴

Další modifikací TT je ECT, ekarinový test. Namísto trombinu je přidáván ekarin, metaloproteinasa izolovaná z jedu *Echis carinatus*, specifický aktivátor protrombinu. Nevýhodou tohoto testu je, že není standardizován.¹⁵

2.4.1.7 Anti-Xa aktivita¹⁴

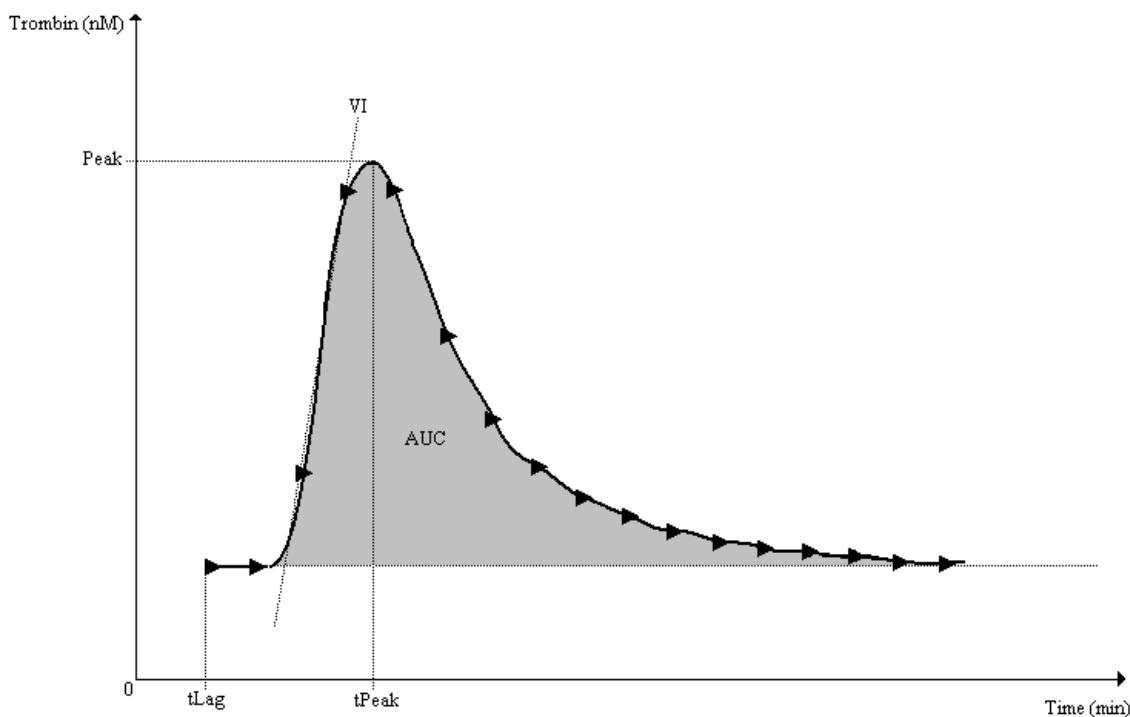
Tento test je využíván k monitoraci léčby LMWH a přímými inhibitory FXa. Je využíván pro jejich stanovení za použití metody kalibrační křivky.

K dekalcifikované plazmě je přidáváno konstantní množství FXa a specifický chromogenní substrát. V přítomnosti antikoagulancia dochází k inhibici FXa, zbylý FXa hydrolyzuje chromogenní substrát za uvolnění p-nitroanilinu, který je spektrofotometricky stanovován při 405 nm. Platí nepřímá úměra, čím více antikoagulancia v plazmě je, tím méně pNA je uvolněno.

2.4.1.8 TGA – trombin generační test

Trombin generační test nabízí rozdílnost od testů koagulačních komplexní posouzení hemokoagulace. Měří se aktivita trombinu v závislosti na čase, grafický záznam této závislosti se nazývá trombinogram. Z něj lze vyčíst pět základních veličin (viz Obr. 11). Hlavní nevýhodou tohoto testu je, že pro tyto veličiny neexistují standardní referenční

hodnoty. Obecně lze říct, že zvýšená generace trombinu může znamenat riziko trombózy, zatímco snížená generace trombinu riziko krvácení.⁶



Obrázek 11 – Trombinogram¹⁴

- tLag [min] – čas v potřebný ke generaci detekovatelného množství trombinu
- tPeak [min] - čas v potřebný ke generaci maximální koncentrace trombinu
- Peak [nM] – maximální dosažená koncentrace trombinu
- VI [nM/min] – rychlost nárůstu generace trombinu
- AUC [nM] – celkové vytvořené množství trombinu

Využívá se plazma chudá na destičky, ke které jsou přidány indukční srážecí činidlo, Ca^{2+} ionty a fosfolipidy, což vede ke tvorbě malého množství trombinu. Ten indukuje aktivaci FV, FVIII, FXI a krevních destiček vedoucí k rychlému nárůstu množství trombinu. Zároveň se aktivují antikoagulační mechanismy. Generovaný trombin štěpí chromogenní nebo fluorogenní substrát za uvolnění chromoforu či fluoroforu, který je následně fotometricky stanoven.⁶

2.4.2 Monitorace NOAC

Rutinní monitorace antikoagulační léčby NOAC není nutná vzhledem k jejich předvídatelným farmakokinetickým a farmakodynamickým vlastnostem. Nicméně v určitých situacích je dobré znát aktuální hladinu antikoagulancia či jeho aktuální antikoagulační efekt.

Tyto situace zahrnují akutní operaci, předávkování, krvácení, trombózu, sníženou činnost ledvin a jater, přechod na jiné antikoagulancium, potřebu zhodnocení účinku léčby či studium vlivu jiných léků na antikoagulační léčbu. Obecně lze říct, že monitorace antikoagulační léčby by měla vést k vylepšení účinnosti a bezpečnosti léčby a ke zoptimalizování léčby pro daného pacienta.¹⁷

Klasické testy jsou většinou pro nová antikoagulancia příliš citlivé nebo naopak příliš necitlivé. Vyžadují proto metodologické přizpůsobení.¹⁵ Tab. IV shrnuje vliv jednotlivých NOAC na základní koagulační testy.

Kromě těchto běžných testů lze pro monitoraci NOAC využít i dříve zmíněný TGA – trombin generační test. Ze všech parametrů je nejvýhodnější využít Peak, ten vykazuje nejvyšší citlivost a nejnižší variabilitu. Výhodou tohoto testu je, že poskytuje více informací než klasické koagulační testy, nevýhodou je časová náročnost, obtížná standardizace a malá dostupnost.¹⁷

Tabulka IV - Vliv NOAC na koagulační testy^{17, 15}

Dabigatran	
PT	- prodloužen - malá citlivost, vysoká variabilita, slabá korelace s koncentrací dabigatranu v plazmě - INR se téměř nemění
APTT	- prodloužen - malá citlivost, vysoká variabilita, slabá korelace s koncentrací dabigatranu v plazmě - využitelný pro nízké koncentrace
anti-Xa aktivita	- žádný efekt
TT	- příliš citlivý (u vysokých koncentrací přesáhne TT dobu měření) - využití dTT (standardizovaný, komerčně dostupný kit Hemoclot, Hyphen, Biomed, Francie) – silná korelace s koncentrací dabigatranu v plazmě, není příliš rozšířený
ECT	- lineární, citlivá, přesná metoda i pro vysoké koncentrace nad 600 ng/ml - není standardizována
Rivaroxaban	
PT	- lineární prodloužení - dobrá korelace s koncentrací rivaroxabanu v plazmě - citlivost dobrá jen u vysokých koncentrací, vysoká variabilita - vhodná metoda tam, kde není anti-Xa aktivita k dispozici, dobrou citlivost vykazují reagenzie STA Neoplastin Plus, Stago, Ashieres, Francie
APTT	- lineární prodloužení - nízká citlivost, vysoká variabilita
anti-Xa aktivita	- vysoká reprodukovatelnost, silná korelace s koncentrací rivaroxabanu v plazmě - komerčně dostupné, standardizované kity, specifické kalibrátory - široké rozmezí koncentrací - ne tolik rozšířené
TT	- žádný vliv

ECT	- žádný vliv
Apixaban	
PT	- prodloužení
APTT	- nízká citlivost, vysoká variabilita - nespolehlivé
anti-Xa aktivita	- vysoká reprodukovatelnost, silná korelace s koncentrací apixabanu v plazmě - komerčně dostupné, standardizované kity, specifické kalibrátory (nevhodnější STA, Rotachrom, Stago, Ashiers, Francie) - široké rozmezí koncentrací - ne tolik rozšířené
TT	- žádný vliv
ECT	- žádný vliv

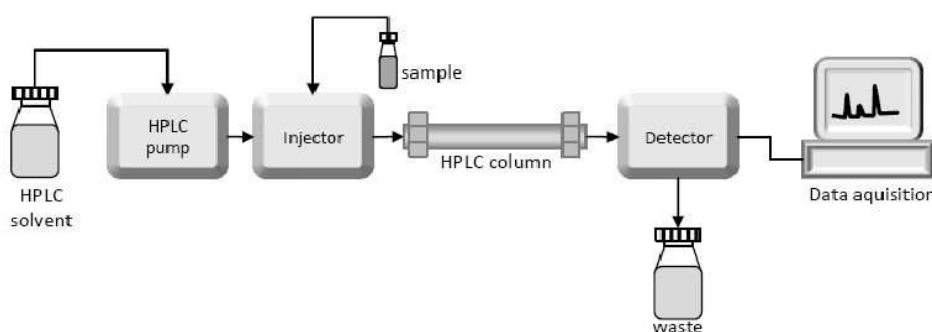
2.4.3 HPLC-MS

Chromatografie je separační technika založená na dělení směsi složek mezi dvě různé nemísitelné fáze - fází nepohyblivou, stacionární a fází pohyblivou, mobilní, mezi nimiž dochází k neustálému ustalování rovnováhy dělených látek. Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme chromatografii plošnou a kolonovou, podle skupenství mobilní fáze chromatografii plynovou a kapalinovou.

Kapalinová chromatografie se provádí jak v uspořádání plošném (PC - papírová chromatografie, TLC - tenkovrstevná chromatografie), tak v uspořádání kolonovém.

Následující text se bude věnovat HPLC - vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

Obr. 12 zobrazuje základní schéma kapalinového chromatografu.



Obrázek 12: Kapalinový chromatograf¹⁸

Mezi základní části patří zásobník mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, dávkovač vzorku, kolona, termostat, detektor a zařízení pro vyhodnocení signálu.

Zásobník mobilní fáze obsahuje filtr pro zachycení pevných částic, kromě nich je z mobilní fáze nutno odstranit také plyny, které by mohly rušit stanovení. Provádí se tak pomocí probublávání heliem nebo ve vakuových degaserech. Následuje vysokotlaké čerpadlo, které zajišťuje stabilní průtok mobilní fáze. Může být pneumatické, pístové či membránové.

Pokud je čerpadlo pulzního typu, je nutno zařadit také tlumiče tlakových pulzů. Dávkování vzorku může být jak manuální (vysokotlaké dávkovací ventily), tak automatické (autosamplery). Kolony pro HPLC se vyrábí z nerezové oceli, tvrzeného skla či PEEK a pro analytické účely mívají vnitřní průměr 2,1-5 mm, délku 10-300 mm a velikost náplně 1-10 μ m. Stacionární fáze může být tvořena tuhou látkou nebo filmem kapaliny zakotveným či chemicky vázaným na nosiči. Z chemického hlediska lze stacionární fáze dělit na anorganické oxidy (SiO₂, ZrO₂, Al₂O₃, TiO₂), chemicky vázané fáze na bázi silikagelu (reverzní fáze C18, C8, fenyl, normální fáze CN, NH₂, diol, HILIC fáze, iontoměniče, chirální fáze), polymerní fáze (PS-DVB, PVA, PMMA), hybridní fáze či fáze na bázi grafitového uhlíku. Kolony bývají často termostatovány a to za pomoci kapalinových nebo teplovzdušných termostatů. Existuje řada detektorů pro HPLC, mezi nejvýznamnější patří detektory spektrofotometrické, fluorescenční, elektrochemické, detektory na bázi aerosolu (ELSD, CAD, NQAD), refraktometrické, vodivostní, chemiluminiscenční či reakční.

Univerzálním a vysoce specifickým detekčním systémem pro HPLC je hmotnostní spektrometrie. Základním principem této metody je ionizace vzorku (převedení neutrálních molekul na ionty) v iontovém zdroji, rozdělení iontů dle poměru m/z a jejich urychlení v hmotnostním analyzátoru a následná detekce v detektoru.

Existuje řada ionizačních technik, pro spojení HPLC-MS se využívá technik měkkých poskytujících proponované či deprotonované molekuly a malé množství fragmentů. Jedná se především o ESI (ionizace elektrosprejem), APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku), APPI (fotoionizace za atmosférického tlaku) a při off-line spojení MALDI (matrix assisted laser desorption ionization). Nevýhodou tohoto způsobu ionizace je, že neexistují knihovny spekter, tak jak je tomu pro techniky tvrdé (EI - elektronová ionizace, CI - chemická ionizace), které jsou využívány pro spojení GC-MS, a také malé množství fragmentů a tedy malé množství informace o struktuře látky. Toto lze nicméně řešit využitím tandemové hmotnostní spektrometrie MSⁿ.

Z hmotnostních analyzátorů lze pro spojení HPLC-MS využít prakticky kterýkoliv - sektorové přístroje, kvadrupol, průletový analyzátor, iontovou cyklotronovou resonanci či orbitrap.¹⁹

Kapalinová chromatografie poskytuje jak kvalitativní (retenční čas či objem), tak kvantitativní (plocha či výška píku) informaci o látce. Stanovení kvantitativní má relativní

charakter, využívá se při něm standardů (metoda vnějšího standardu, přídavku standardu, vnitřního standardu či vnitřní normalizace).²⁰

3. Experimentální část

3.1 Cíle experimentální části

Cílem experimentální části této diplomové práce bylo porovnání tří metod stanovení rivaroxabanu a apixabanu v plazmě (TGA, anti-Xa aktivita, HPLC-MS/MS) a to z hlediska analytického (robustnost, interference), technického, finančního, časového a také z hlediska dostupnosti a současně korelace výsledků měření získaných těmito třemi metodami.

3.2 Přístroje

Pro přípravu vzorku byla použita centrifuga Eppendorf Centrifuge 5702, automatické pipety Eppendorf Research a inkubátor pro teplotu vzorku na 37,5°C.

Pro chromogenní stanovení anti-Xa aktivity byl použit koagulační analyzátor ACL TOP CTS 700 (Instrumentation Laboratory Inc., USA); pro TGA koagulační analyzátor Ceveron Alpha (Technoclone GmbH, Rakousko) a pro HPLC-MS stanovení UHPLC kapalinový chromatograf Dionex Ultima 3000 RS (Thermo Scientific Inc, USA) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem TQ 6500 (AB Sciex, Massachusetts, USA).

3.3 Chemikálie

- voda na injekce, Ardeapharma a.s.
- fyziologický roztok, Ardeapharma a.s.
- citrát sodný (0,129 mol/l)
- reagentie pro TGA – kit Technotrombin TGA, Technoclone
 - SUB Technotrombin TGA (1 mmol/L Z-Gly-Arg-AMC, fluorogenní substrát)
 - BUF Technotrombin TGA (HNa-TBS buffer)
 - Technotrombin TGA, Tissue factor/Low phospholipid mixture
 - CaCl₂ (25 mmol/l)
 - Ceveron promývací roztok
- reagentie pro ACL HemosIL Heparin Kit, Instrumentation Laboratory
 - Chromogenic substrate (N- α -Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA.2HCl)
 - Factor Xa reagent (lyofilizovaný hovězí faktor Xa)
 - Antitrombin (lyofilizovaný lidský antitrombin)
 - Buffer (koncentrovaný Tris-pufr)

- chemikálie pro UHPLC-MS stanovení
 - deuterovaný rivaroxaban RIV-D4 (Toronto Research Chemicals Inc, Toronto, Canada)
 - methanol (LC-MS kvalita, Sigma, USA)
 - NH₄COOH (Sigma, USA)
 - AcCN (Sigma, USA)
- kalibrátory
 - Technoview Apixaban CAL set, Technoview Apixaban LOW control, Technoview Apixaban HIGH control, Technoview Rivaroxaban MEDIUM Control, Technoclone
- Fraxiparine, 9000 IU/ml, Aspen
- protamin hydrochlorid, 5000 IU/5ml, MEDA-ampullen

3.4 Pracovní postup

Příprava vzorku plazmy pro anti-Xa a TGA stanovení

Odběr žilní krve byl proveden do citrátu sodného o koncentraci 0,129M v poměru 9:1 a krev byla následně 10 minut centrifugována rychlostí 3000 otáček za minutu. Takto připravená citrátová plazma byla poté analyzována nebo zamrazena. Rozmrazení před analýzou probíhalo v inkubátoru při teplotě 37,5°C.

Příprava reagií pro anti-Xa a TGA stanovení

Reagencie byly rozpuštěny v injekční vodě dle návodu a 15 minut temperovány na pokojovou teplotu.

Příprava kalibrátorů apixabanu a rivaroxabanu

Kalibrátory byly rozpuštěny v injekční vodě dle návodu a 15 minut temperovány na pokojovou teplotu.

Příprava fraxiparinu o koncentraci 0,1-0,8 IU/ml

Vypočtené množství Fraxiparinu bylo naředěno fyziologickým roztokem na požadovanou koncentraci.

Příprava protamin hydrochloridu o koncentraci 0,1-0,8 IU/ml

Vypočtené množství protaminu bylo naředěno fyziologickým roztokem na požadovanou koncentraci.

Příprava vzorku pro HPLC-MS

K 50 μ l plasmy bylo přidáno 200 μ l methanolu pro vysrážení plazmatických proteinů. Vzorek byl poté 20 sekund protřepáván na vortexu a následně zamrazen při -65°C na 1 hodinu. Následovalo 5 minut centrifugace rychlostí 10 000RPM. Ke 150 μ l supernatantu bylo přidáno 20 μ l vnitřního standardu RIV-D4 a takto připravený vzorek byl do doby analýzy zamrazen při -20°C.

3.5 Metodika

Princip stanovení antikoagulantů metodami TGA a stanovení anti-Xa aktivity je popsán v teoretické části, kapitola 2.4.1.

HPLC podmínky měření shrnuje Tabulka V.

Přístroj	Ionex Ultima 3000RS (Thermo Scientific Inc., USA)				
Kolona	Polarit 3 C18-A 3 μ m (50 x 2,0 mm, Agilent Technologies)				
Mobilní fáze	A: 95% NH ₄ COOH (25mM) + 5% AcCN B: 5% NH ₄ COOH (25mM) + 95% AcCN	Gradient	Čas	%A	%B
			0	85	15
			0,5	85	15
			1	0	100
			1,9	0	100
			2,71	85	15
Teplota kolony [°C]	40°C	Průtok [ml.min⁻¹]	0,4		
Objem nástríku [μl]	5	Tlak [bar]	60-110		
Doba analýzy [min]	2,71	Podmínky ekvibrace	0,5 min, 15%B, 0,4ml.min ⁻¹		

Podmínky iontového zdroje shrnuje Tabulka VI.

Iontový zdroj	Turbo Spray Ion Drive		
CUR	35,0 psi	GS2	40,0 psi
CAD	0 psi	TEM	400,0 °C
IS	5500,0 V	Typ skenu	MRM
GS1	4,0 psi	Polarita	pozitivní mód

Podmínky sběru spektrometrických dat shrnuje Tabulka VII.

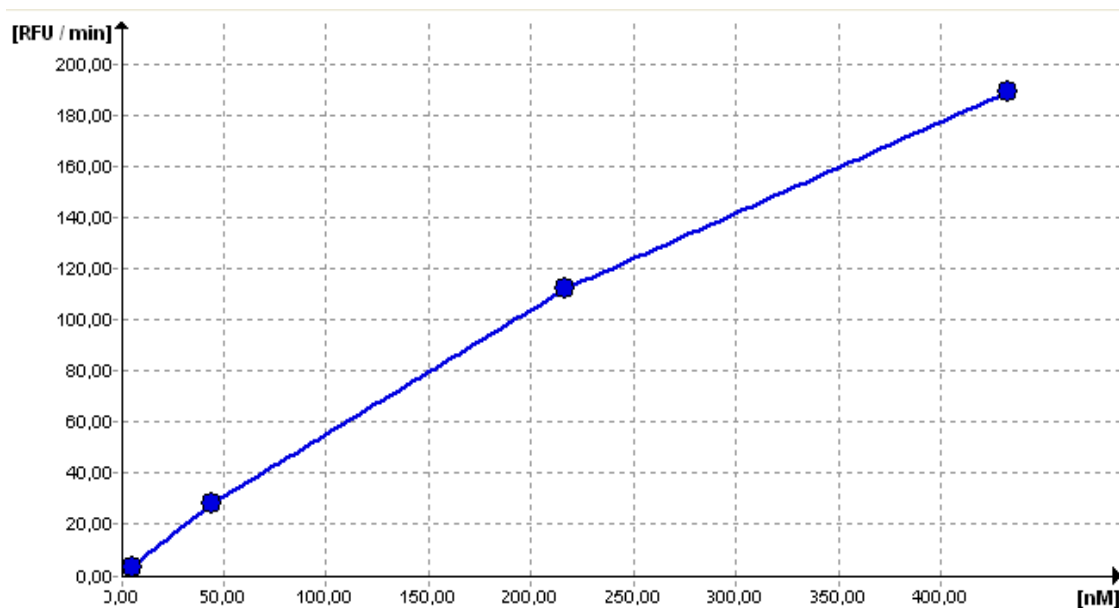
MRM přechody [m/z]	Dwell time [min]	Analyt	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
460,063→199,100	20	Apixaban I	196	10	53	8
460,063→185,100	20	Apixaban II	196	10	55	12
441,054→144,900	20	Rivaroxaban D4 I	166	10	35	10
441,054→146,000	20	Rivaroxaban D4 II	166	10	35	10
437,196→144,900	20	Rivaroxaban I	51	10	41	16
437,196→146,000	20	Rivaroxaban II	51	10	41	12

4. Výsledky a diskuze

4.1 TGA

Metodika TGA byla nakalibrována v rozsahu 0 – 432 nM/min. s pomocí standardu trombinu o koncentraci 432 nM a jeho ředění (2x, 10x a 100x).

Dále byla stanovena opakovatelnost se standardem rivaroxabanu o koncentraci 144,3 ng/ml a apixabanu o koncentraci 307,2 ng/ml a reprodukovatelnost se standardy rivaroxabanu o koncentracích 288,6 a 72,15 ng/ml a apixabanu o koncentracích 307,2 a 130,4 ng/ml.



Obrázek 13: Kalibrační křivka TGA metody - standard trombinu

4.1.1 Opakovatelnost měření

V rámci tohoto experimentu bylo provedeno měření plazmy pacienta bez antikoagulační léčby, kalibrátoru rivaroxabanu o koncentraci 144,3 ng/ml a kalibrátoru apixabanu o koncentraci 307,2 ng/ml v řadě 10x za sebou.

TGA u zdravého pacienta bez antikoagulační léčby				
	tLag (min)	tPeak (min)	Peak (nM)	AUC (nM)
1	3,8	7,8	198	1856,2
2	4	7,9	198,9	1874,7
3	4,1	8,2	195,3	1850,7
4	4,2	8,4	196,9	1828,1
5	3,9	8,1	198,6	1853
6	4	8,1	207,2	1879,6
7	4,2	8,1	206,8	1885,5
8	4,1	8,1	204,4	1877,3
9	3,9	8,1	208,8	1883,6
10	4	8	202,4	1875,9
Průměr	4,0	8,1	201,7	1866,5
Směrodatná odchylka CV	0,1 (3,2%)	0,1 (2,0%)	4,8 (2,4 %)	18,6 (1,0%)
Rivaroxaban, 144,3 ng/ml				
	tLag (min)	tPeak (min)	Peak (nM)	AUC (nM)
1	4,6	17,1	31,4	656,9
2	4,6	16,3	30,1	628,3
3	4,8	17,5	29,3	624,2
4	4	16,8	34,5	697,9
5	4,6	17,6	30,5	641
6	3,1	11,2	64,6	932,3
7	5,2	16,7	28,7	614,1
8	4,8	16,6	30	639,5
9	5,2	20	22,7	521,2
10	4,4	18,6	27,5	596,7
Průměr	4,7	17,5	29,4	624,4
Směrodatná odchylka CV	0,4 (8,3%)	1,2 (6,7%)	3,2 (10,8%)	48,1 (7,7%)
Apixaban, 307,2 ng/ml				
	tLag (min)	tPeak (min)	Peak (nM)	AUC (nM)
1	4,3	19	15,9	435,9
2	2,9	18	16,3	439,9
3	4,3	19,5	16,2	438,5
4	4,2	19,4	16,6	441,1
5	4,2	20,1	17,2	447,9
6	4,3	18,5	16,5	444,1
7	4,3	18	17,4	445,8
8	4,8	18,8	18,6	453,5
9	4,4	18,7	18,5	467,4
10	4,2	19	20,8	524,2
Průměr	4,2	18,9	17,4	453,8
Směrodatná odchylka CV	0,5 (11,7%)	0,7 (3,5%)	1,5 (8,7%)	24,3 (5,4%)

Výsledky měření ukazují, že opakovatelnost metody je dobrá jak u plazmy pacienta bez antikoagulační léčby, tak u plazmy obsahující rivaroxaban, příp. apixaban. Je patrné, že větší odchylky v jednotlivých měřeních se vyskytují u vzorků s antikoagulační léčbou, při níž

je inhibována generace trombinu a jeho koncentrace je tak nižší než u plazmy bez antikoagulační léčby. Jako nejvhodnější parametr TGA z hlediska opakovatelnosti metody se ukazuje tPeak pro obě léčiva, který vykazuje nejmenší variabilitu.

4.1.2 Reprodukovatelnost měření

Bylo provedeno sedm měření kalibrátoru rivaroxabanu o koncentraci 72,15 ng/ml a kalibrátoru apixabanu o koncentraci 130,4 ng/ml vždy jednou týdně. Mezitím byla plazma zamražena při -20°C.

Rivaroxaban, 288,6 ng/ml				
	tLag (min)	tPeak (min)	Peak (nM)	AUC (nM)
1	4,1	21,1	23	696,4
2	3,4	11,8	15,5	346,2
3	7,9	45,5	7,1	189,2
4	8	29,2	8,3	202,8
5	5,8	12,1	50	1138,1
6	6	12,6	41,1	1039,5
7	9,4	21,6	23,1	648,6
Průměr	6,4	22	24,0	608,7
Směrodatná odchylka	2,2 (34,3%)	12,2 (55,6%)	16,2 (67,5%)	384,0 (63,1%)
Apixaban, 130,4 ng/ml				
	tLag (min)	tPeak (min)	Peak (nM)	AUC (nM)
1	4,4	10,2	94,6	1615,9
2	2,8	6,4	80,6	871,4
3	3,1	6,4	140,8	1293,5
4	3,1	6,3	146,7	1301,3
5	3,7	6,9	334,6	2552,9
6	3,5	6,6	310,3	2485,8
7	3,7	6,8	311,1	2435,2
Průměr	3,5	7,1	202,7	1793,7
Směrodatná odchylka	0,5 (15,3%)	1,4 (19,6%)	111,3 (54,9%)	688,2 (38,4%)

V případě reprodukovatelnosti měření lze pozorovat větší odchylky, než jak tomu bylo v případě opakovatelnosti. Důvodem těchto rozdílů mohou být jednak různé reagentie pro jednotlivá měření a také vliv zamrazení vzorku. Ten byl řešen v mé bakalářské práci „Možnosti detekce nepřímých inhibitorů trombinu“, v níž bylo prokázáno, že už jedno zamrazení vzorku má na výsledky TGA vliv. Ideální proto je, pokud je vzorek měřen ihned po odebrání, případně po jednom zamrazení. Mírně větší odchylky lze opět pozorovat u vyšších koncentrací antikoagulantia, tedy u nižší koncentrace trombinu. Jako nejlepší parametr

z hlediska reprodukovatelnosti metody se i v tomto případě ukazuje tLag vykazující nejmenší variabilitu.

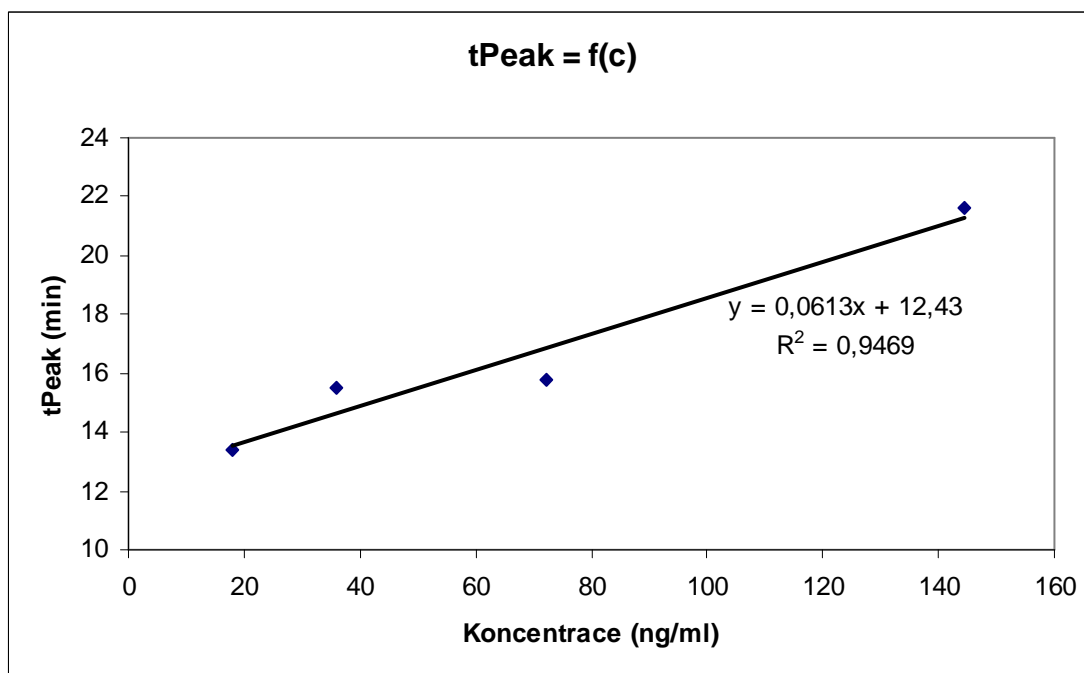
4.1.3 Kalibrace

Pro toto měření bylo využito komerčních kalibračních roztoků rivaroxabanu (koncentrace 18,0-36,1-72,2-144,3-288,6 ng/ml) a apixabanu (koncentrace 38,4-76,8-153,6-307,2 ng/ml) a byla sledována závislost jednotlivých parametrů TGA na koncentraci antikoagulancia v plazmě.

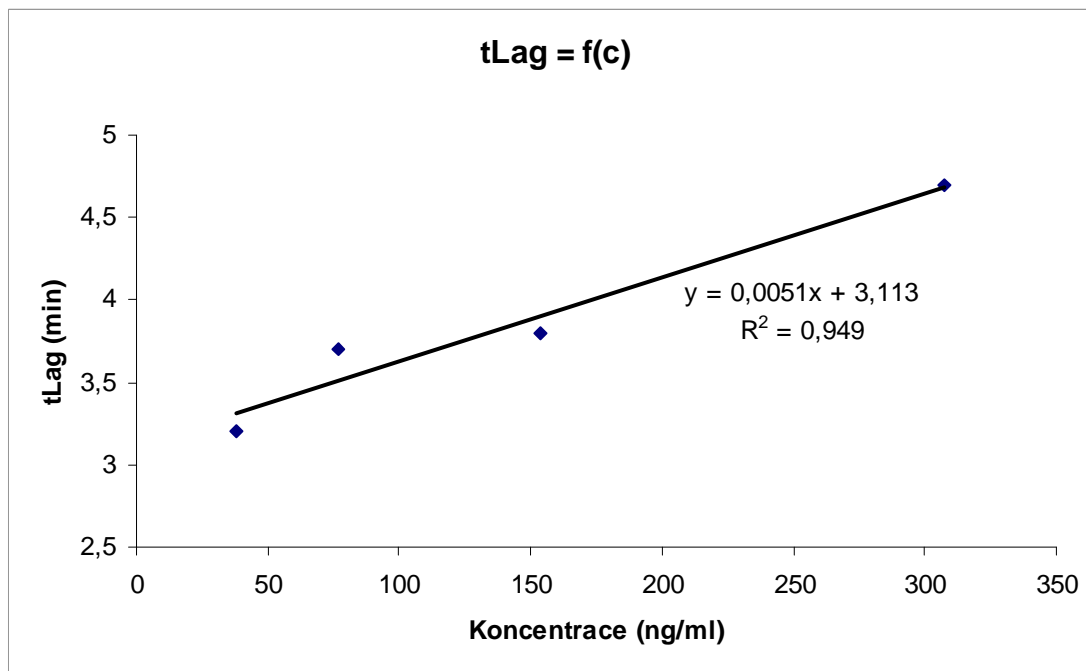
Následující tabulka shrnuje koeficienty determinace R^2 pro jednotlivé parametry TGA pro obě antikoagulancia.

	Koeficient determinace	
	Rivaroxaban	Apixaban
tLag	0,8179	0,9490
tPeak	0,9469	0,7602
Peak	0,7930	0,7312
AUC	0,9271	0,8439

Jako nejvhodnější parametr TGA z hlediska korelace s koncentrací rivaroxabanu v plazmě se ukazuje tPeak s nejvyšším koeficientem determinace. Následující graf znázorňuje závislost tPeak na koncentraci rivaroxabanu.



Jako nejvhodnější parametr TGA z hlediska korelace s koncentrací apixabanu v plazmě se ukazuje tLag s nejvyšším koeficientem determinace. Následující graf znázorňuje závislost tLag na koncentraci apixabanu.



4.2 Korelace metod stanovení xabanů

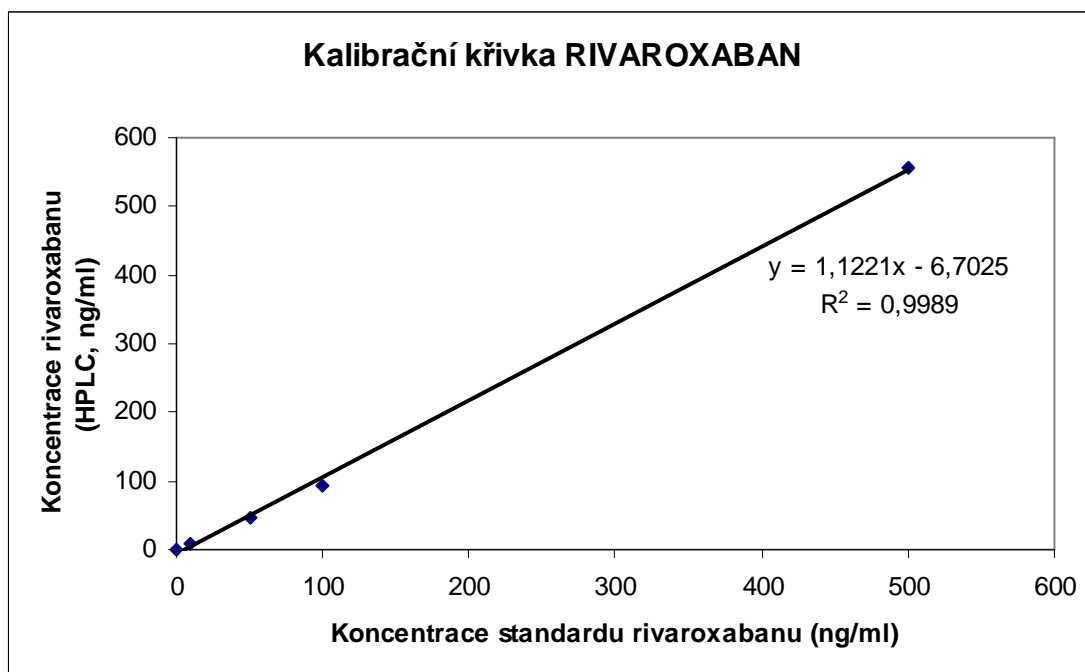
Tato část experimentální části koreluje tři metody stanovení xabanů v plazmě - jako referenční metoda byla použita HPLC-MS/MS, jejíž výsledky byly korelovány s výsledky přímého stanovení koncentrace xabanů v plazmě s využitím metody anti-Xa stanovení a nepřímého stanovení xabanů metodou TGA.

4.2.1 Rivaroxaban

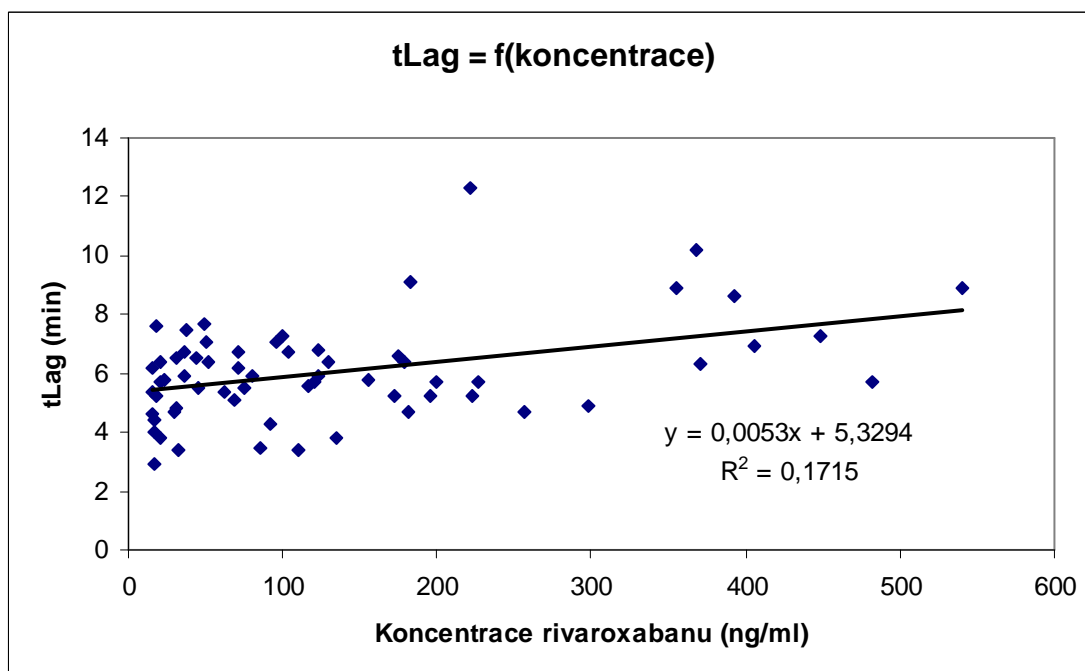
Bylo sledováno 63 pacientů s antikoagulační léčbou rivaroxabanem, z toho 20 mužů a 43 žen, nejmladší pacient byl narozen roku 1991, nejstarší 1923. Výsledky všech tří měření jsou uvedeny v Příloze I. Následující tabulka uvádí základní statistické parametry souboru.

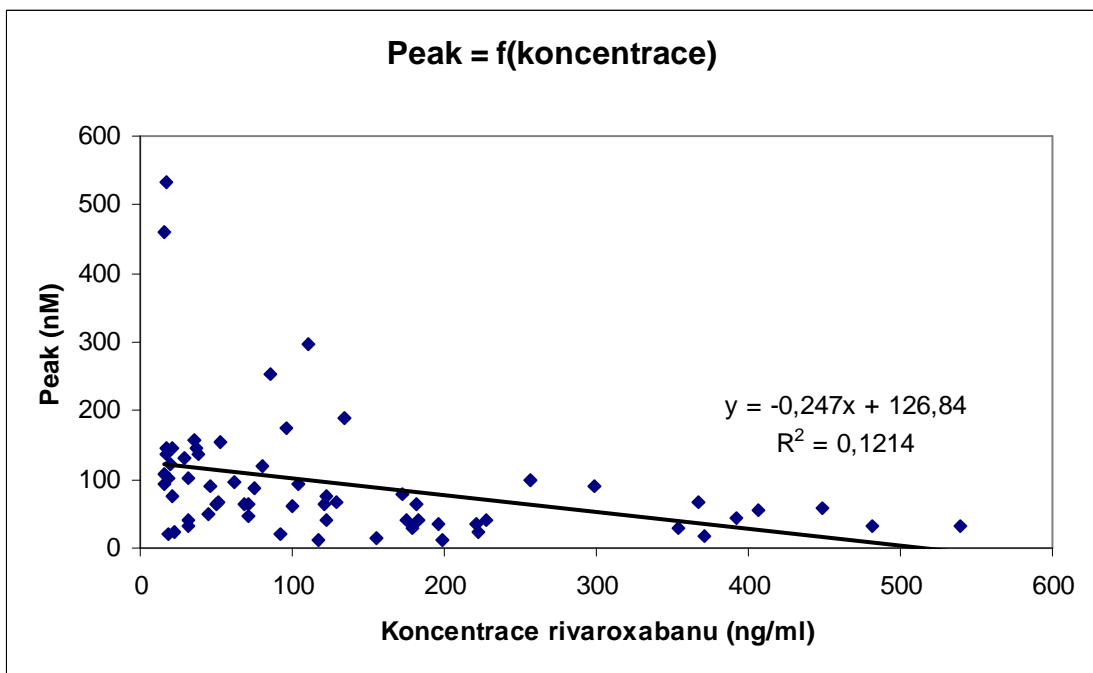
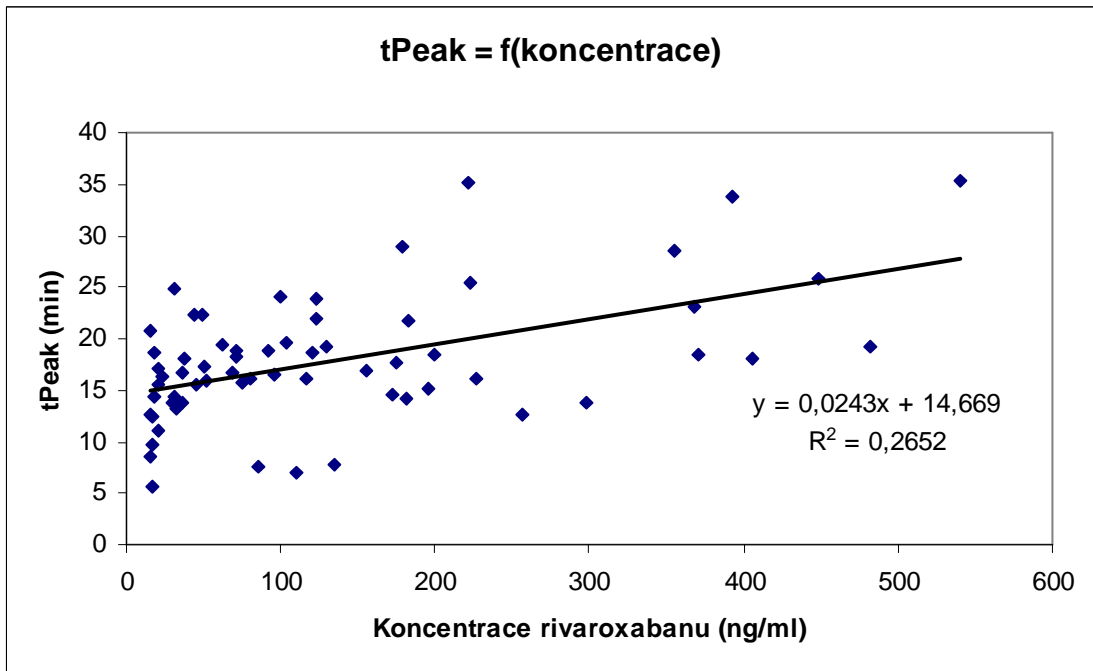
	tLag	tPeak	Peak	VI	AUC	Koncentrace (anti-Xa)	Koncentrace (HPLC)
Průměr	6,0	17,9	93,6	14,4	1553,4	124,5	134,7
Medián	5,8	17,0	66,1	5,2	1559,9	97,2	91,5
Sm.odchylka	1,7	6,2	93,1	30,3	794,9	85,3	131,4
Maximum	12,3	35,3	532,3	196,3	3310,8	445,6	540,0
Minimum	2,9	5,6	10,6	0,8	206,8	27,8	15,2

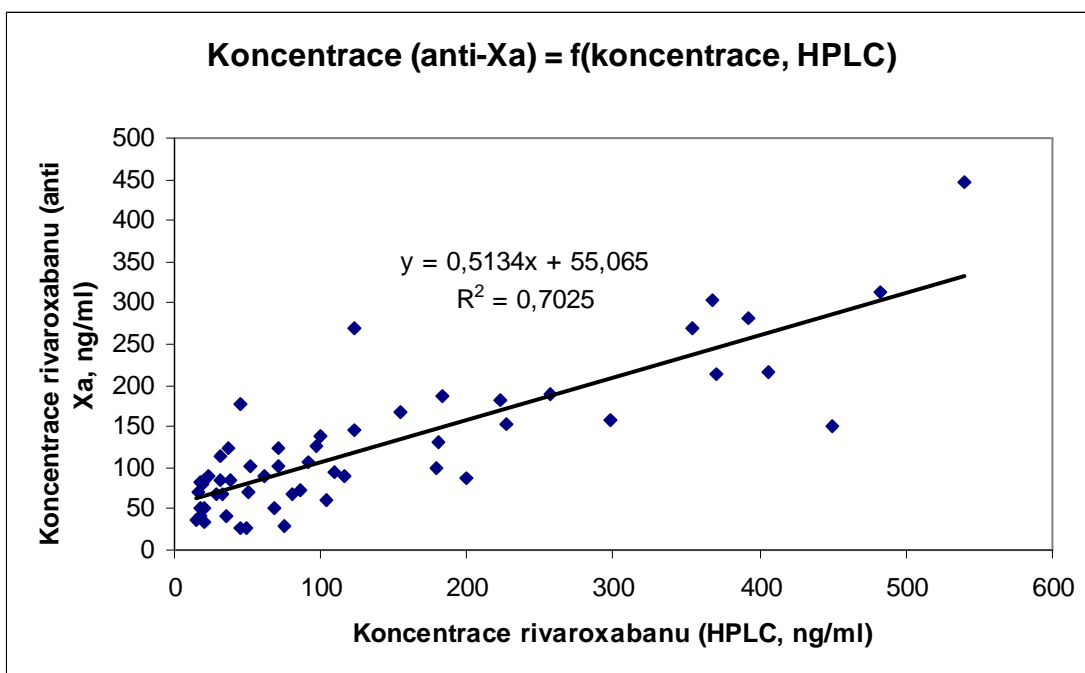
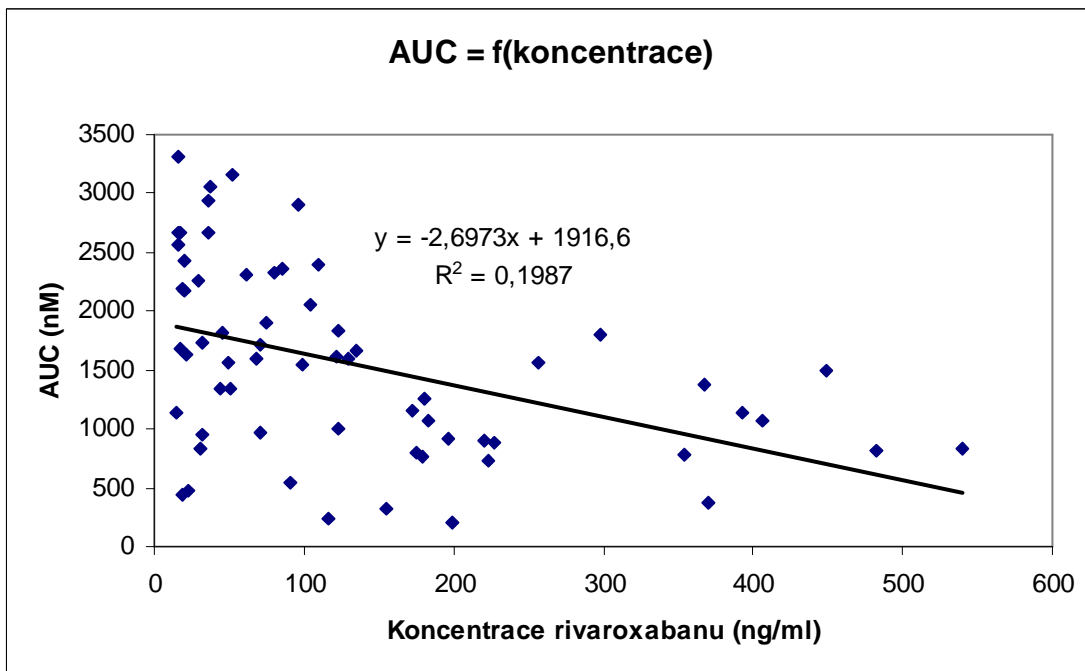
Kalibrační křivka rivaroxabanu pro HPLC-MS/MS stanovení



Korelační grafy - parametry TGA (tLag, tPeak, Peak, AUC) a koncentrace rivaroxabanu stanovená metodou anti-Xa jako funkce koncentrace rivaroxabanu stanovená HPLC-MS/MS.







Hodnoty korelačních koeficientů pro jednotlivé veličiny udává následující tabulka. Korelační koeficient r_{xy} nabývá hodnot v intervalu $\langle -1, 1 \rangle$, kdy hodnoty 1 a -1 značí funkční závislost, hodnota 0 nulovou korelaci.

	Korelační koeficient r_{xy}	Míra korelace
tLag	0,41	mírná
tPeak	0,09	žádná
Peak	-0,35	mírná
VI	-0,24	žádná
AUC	0,45	mírná
Koncentrace (Anti-Xa)	0,84	těsná

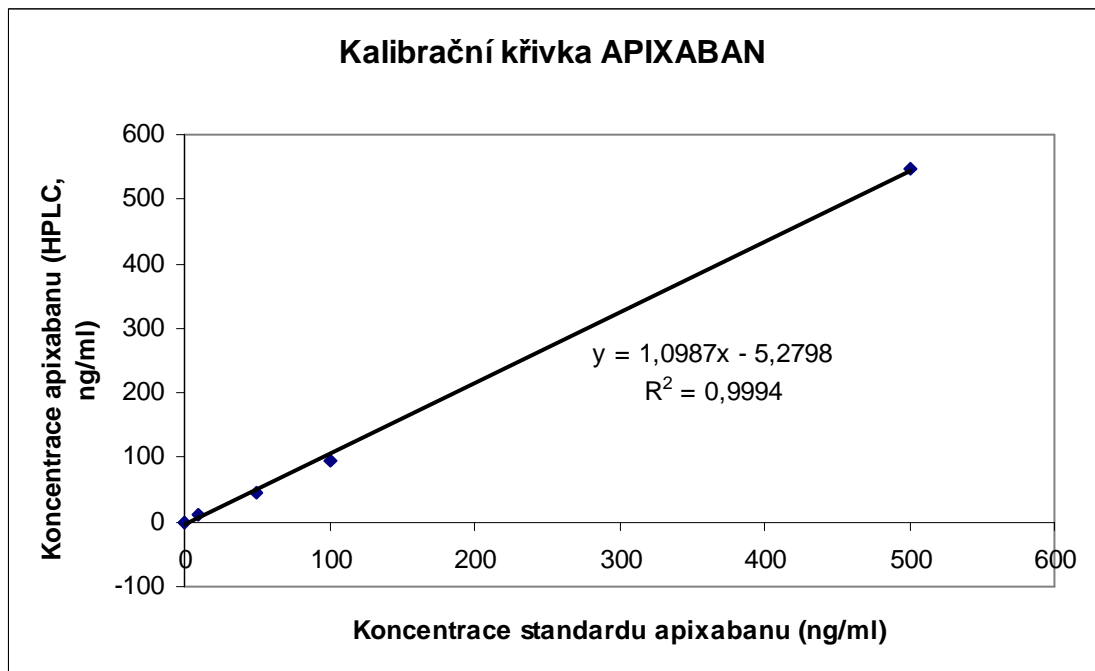
Byly korelovány metody TGA a stanovení anti-Xa aktivity vůči HPLC, která byla zvolena jako referenční metoda. Z korelační analýzy vyplývá, že významná korelace existuje pouze mezi HPLC a stanovením anti-Xa aktivity. Z parametrů TGA vykazují mírnou korelaci tLag, Peak a AUC, nicméně tyto parametry nelze využít ke kvantifikaci rivaroxabanu v plazmě, jelikož neznáme jejich počáteční hodnoty.

4.2.2 Apixaban

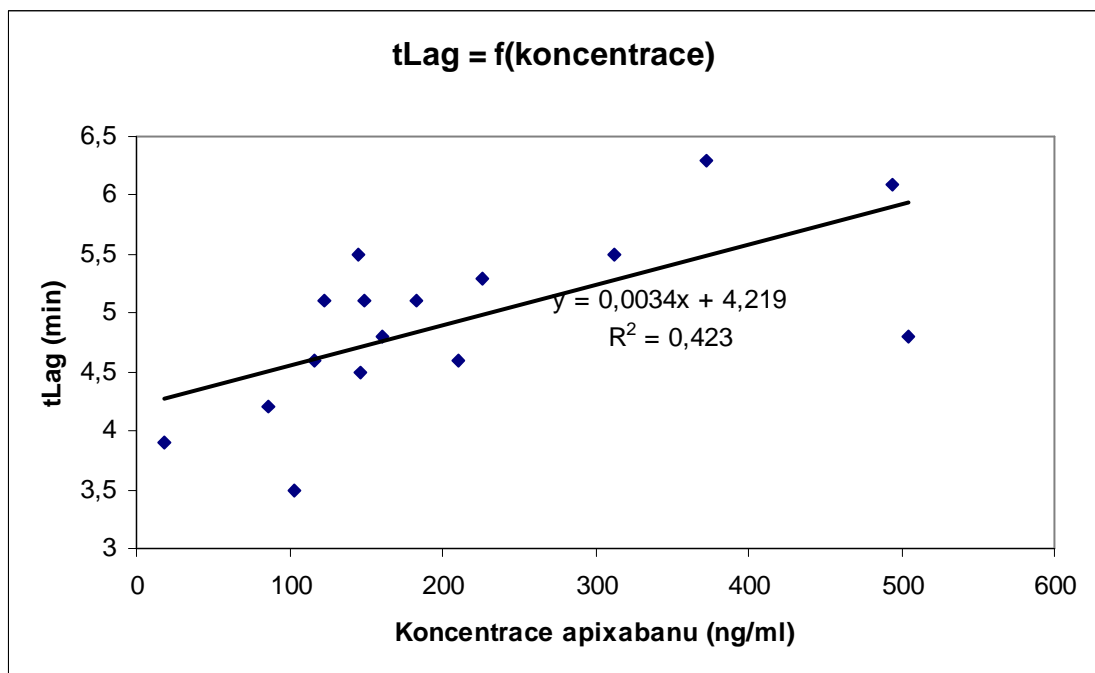
Bylo sledováno 16 pacientů s antikoagulační léčbou apixabanem, z toho 11 mužů a 5 žen, nejmladší pacient byl narozen roku 1972, nejstarší 1919. Výsledky všech tří měření jsou uvedeny v Příloze II. Následující tabulka uvádí základní statistické parametry souboru.

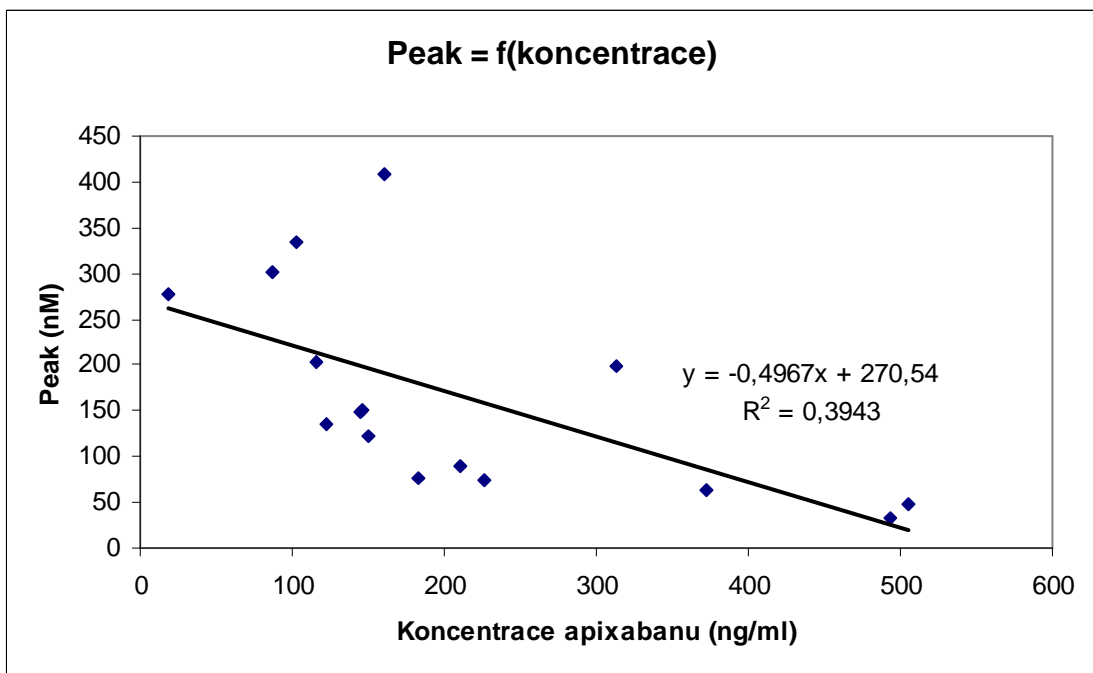
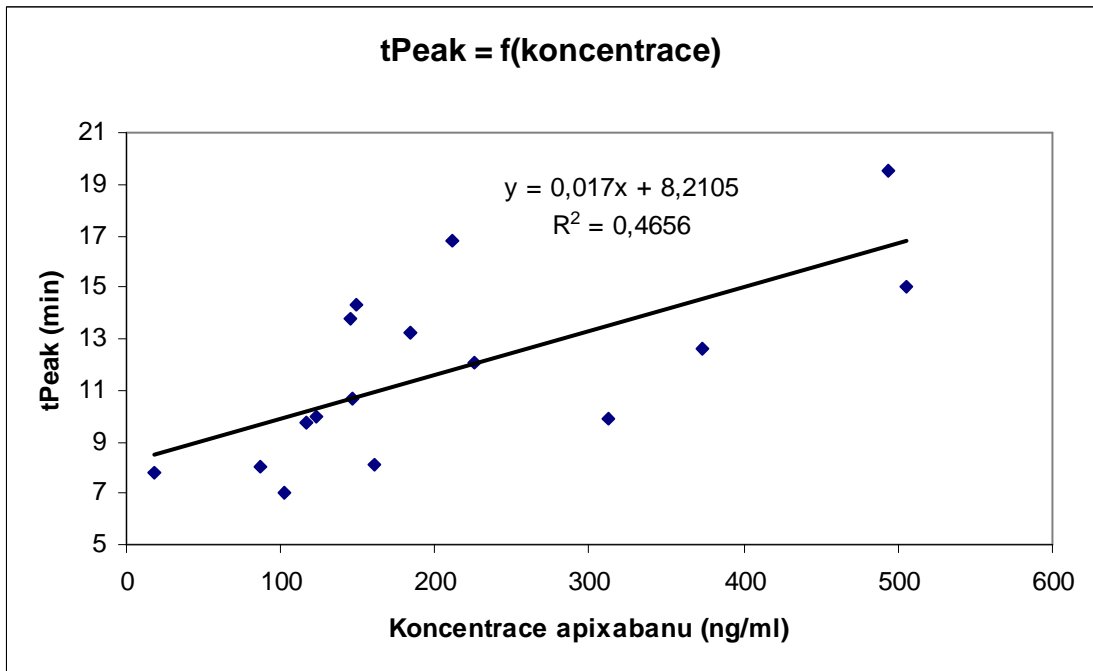
	tLag	tPeak	Peak	VI	AUC	Koncentrace (anti-Xa)	Koncentrace (HPLC)
Průměr	4,9	11,8	166,5	36,3	2005,6	176,6	209,5
Medián	5,0	11,4	141,8	21,1	2254,0	144,6	155,0
Sm.odchylka	0,7	3,5	111,8	36,7	693,4	123,6	141,4
Maximum	6,3	19,5	407,9	123,2	2998,8	519,8	505,0
Minimum	3,5	7,0	33,8	2,5	829,1	54,9	17,9

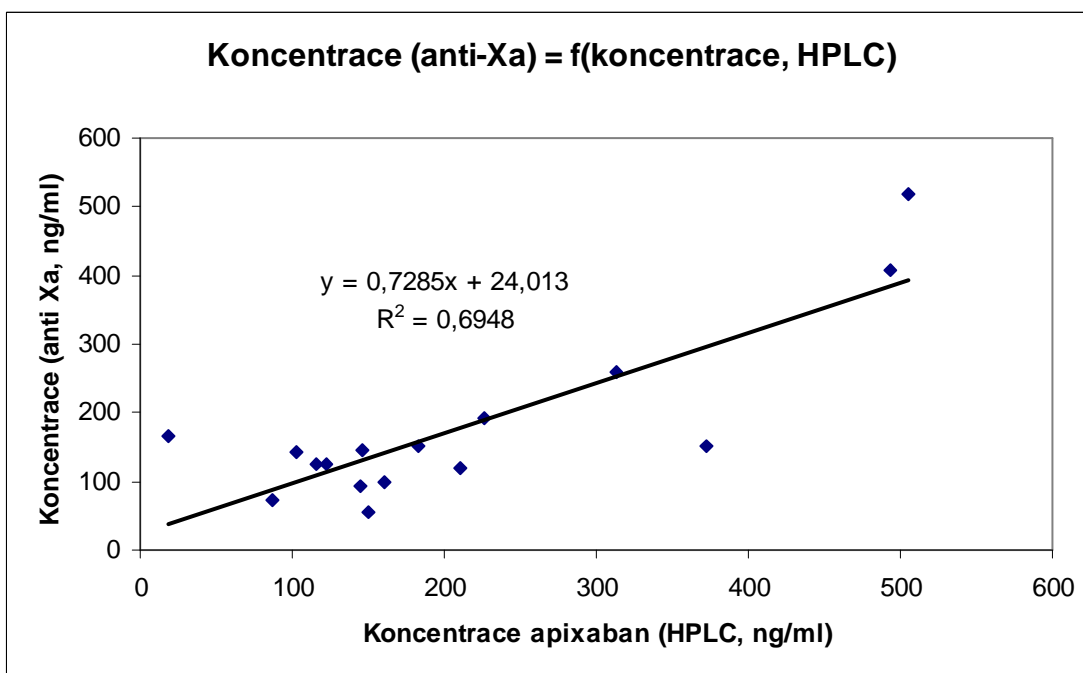
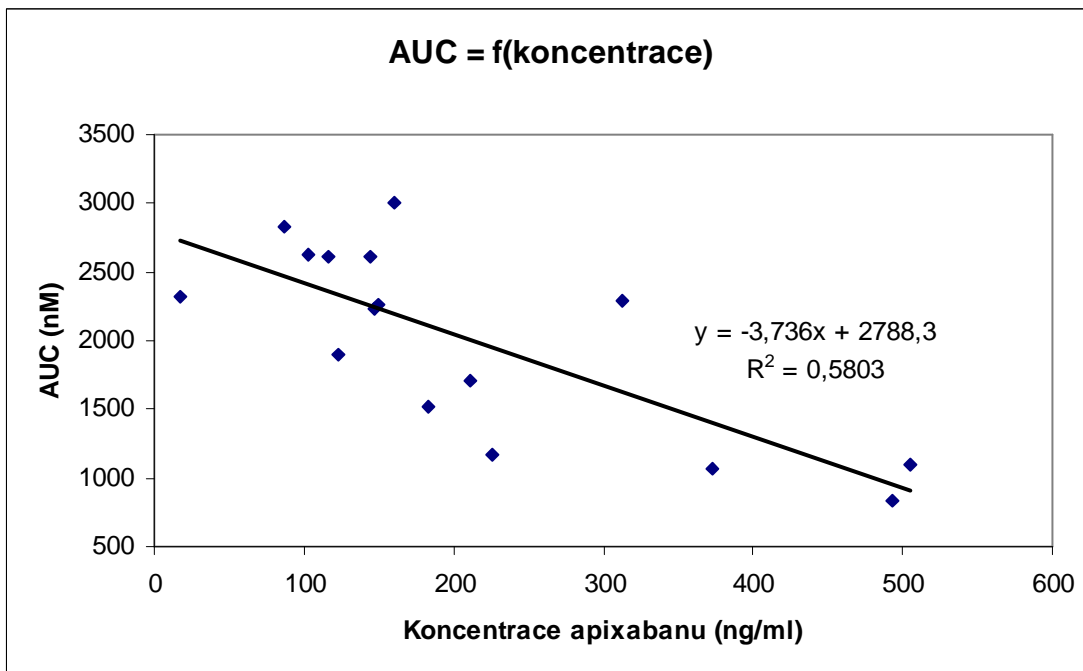
Kalibrační křivka apixabanu pro HPLC-MS/MS stanovení



Korelační grafy - parametry TGA (tLag, tPeak, Peak, AUC) a koncentrace apixabanu stanovená metodou anti-Xa jako funkce koncentrace apixabanu stanovená HPLC-MS/MS.







Hodnoty korelačních koeficientů pro jednotlivé veličiny udává následující tabulka.

	Korelační koeficient r_{xy}	Míra korelace
tLag	0,65	těsná
tPeak	0,68	těsná
Peak	-0,63	mírná
VI	-0,52	mírná
AUC	-0,76	těsná
Koncentrace (Anti-Xa)	0,83	těsná

Byly korelovány metody stanovení apixabanu - TGA a stanovení anti-Xa aktivity vůči referenční metodě HPLC. Z korelační analýzy vyplývá, že nejtěsnější shoda existuje mezi HPLC a stanovením anti-Xa aktivity. Významná korelace byla ale prokázána i mezi HPLC a třemi parametry TGA - tLag, tPeak a AUC. U zbylých parametrů TGA (VI, Peak) byla potom korelace mírná.

4.3 Vliv interferujících látek na jednotlivá stanovení

Byl sledován vliv nízkomolekulárních heparinů na výsledky TGA a stanovení anti-Xa aktivity. Ke kalibrátorům rivaroxabanu a apixabanu byl přidán LMWH s finální koncentrací 0,1IU a 0,2IU. Následně byl přidán protamin chlorid, jakožto specifické antidotum pro LMWH. Výsledky všech měření jsou shrnuty v následujících tabulkách.

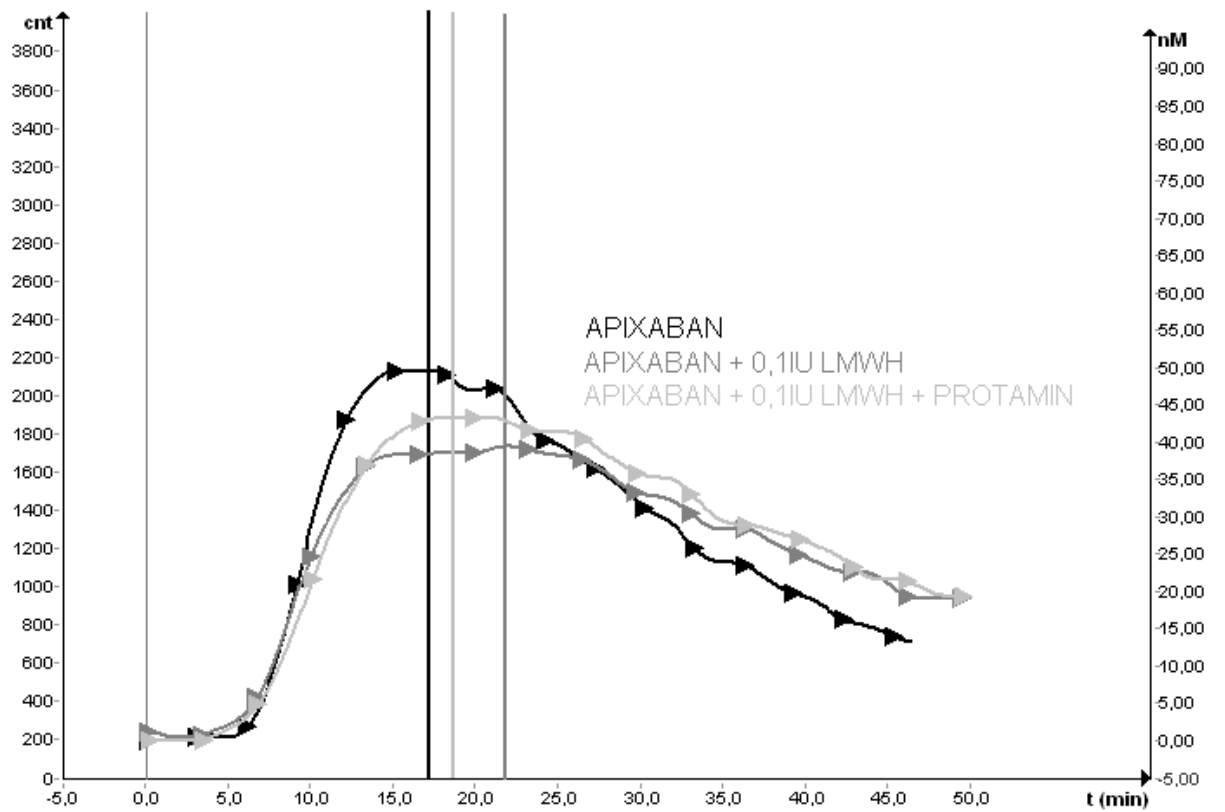
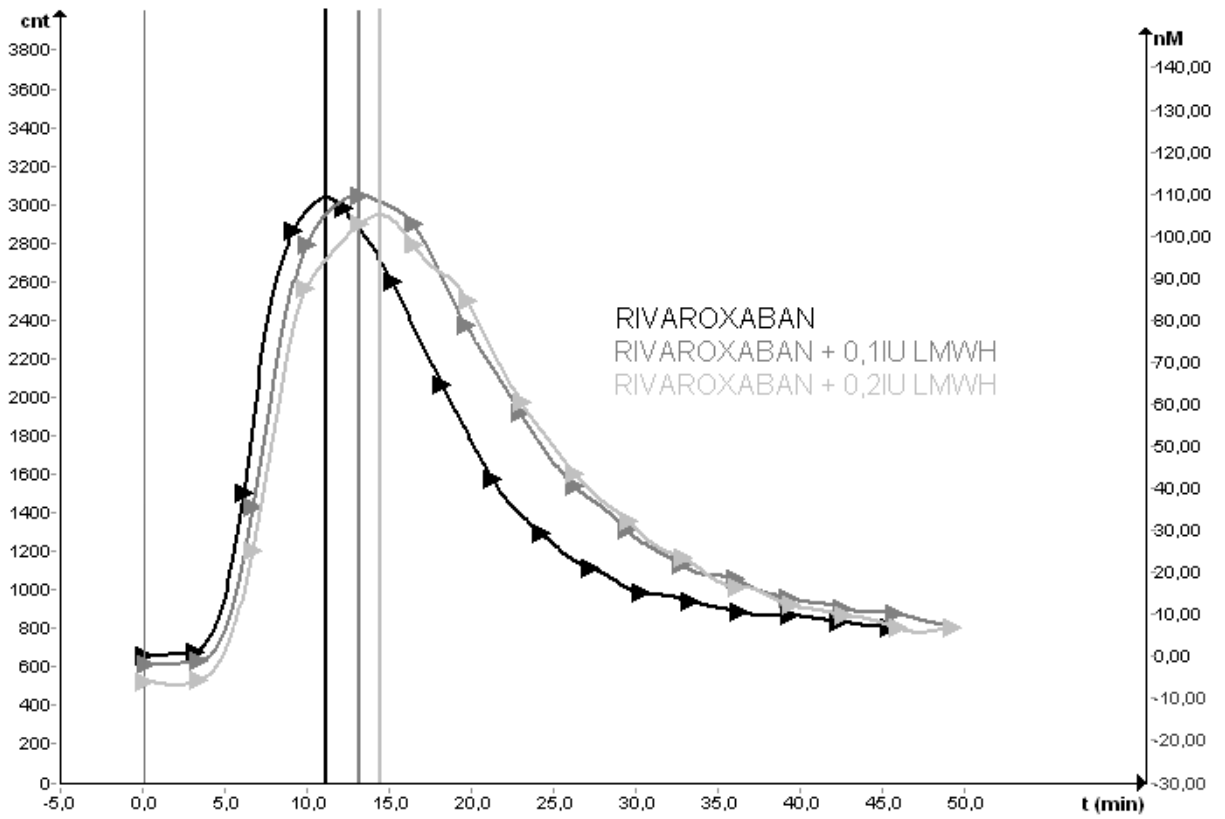
Kalibrátor RIVAROXABAN						
	tLag [min]	tPeak [min]	Peak [nM]	VI [nM/min]	AUC [nMmin]	Anti-Xa [ng/ml]
Cal1 (0ng/ml)	4,3	8,5	270,1	64,1	2212,6	77,2
Cal2 (48,3ng/ml)	5,4	11,5	134,7	22,0	1792,1	119,1
Cal3 (101,3ng/ml)	6,1	15,2	96,3	10,6	1733,7	145,1
Cal4 (199,2ng/ml)	5,9	16,7	78,5	7,2	1606,9	216,4
Cal5 (433,3ng/ml)	8,1	20,6	49,0	3,9	1158,9	495,9
Kalibrátor RIVAROXABANU + 0,1IU LMWH						
Cal1 (0ng/ml)	4,5	9,5	166,7	33,3	1724,5	133,5
Cal2 (48,3ng/ml)	5,2	12,9	83,5	10,8	1391,5	165,8
Cal3 (101,3ng/ml)	5,1	14,3	69,8	7,6	1356,0	220,2
Cal4 (199,2ng/ml)	5,1	14,8	64,2	6,6	1350,8	259,5
Cal5 (433,3ng/ml)	7,0	19,7	44,7	3,5	1052,5	503,8
Kalibrátor RIVAROXABANU + 0,1 IU LMWH + protamin chlorid						
Cal1 (0ng/ml)	4,6	8,9	250,5	58,1	2176,7	98,1
Cal2	4,9	12,2	117,5	16,1	1698,6	149,2

(48,3ng/ml)						
Cal3 (101,3ng/ml)	5,1	16,2	76,2	6,8	1520,0	198,0
Cal4 (199,2ng/ml)	5,6	15,9	70,0	6,8	1503,5	249,8
Cal5 (433,3ng/ml)	7,9	20,5	42,6	3,4	1050,8	503,1
Kalibrátor RIVAROXABANU + 0,2 IU LMWH						
Cal1 (0ng/ml)	4,0	8,0	299,3	74,7	2292,5	228,0
Cal2 (48,3ng/ml)	4,6	10,4	146,4	25,1	1861,1	299,6
Cal3 (101,3ng/ml)	5,7	14,6	116,4	13,0	1957,9	394,7
Cal4 (199,2ng/ml)	5,9	14,8	90,6	10,1	1744,3	330,7
Cal5 (433,3ng/ml)	7,4	20,6	55,3	4,2	1223,8	520,7

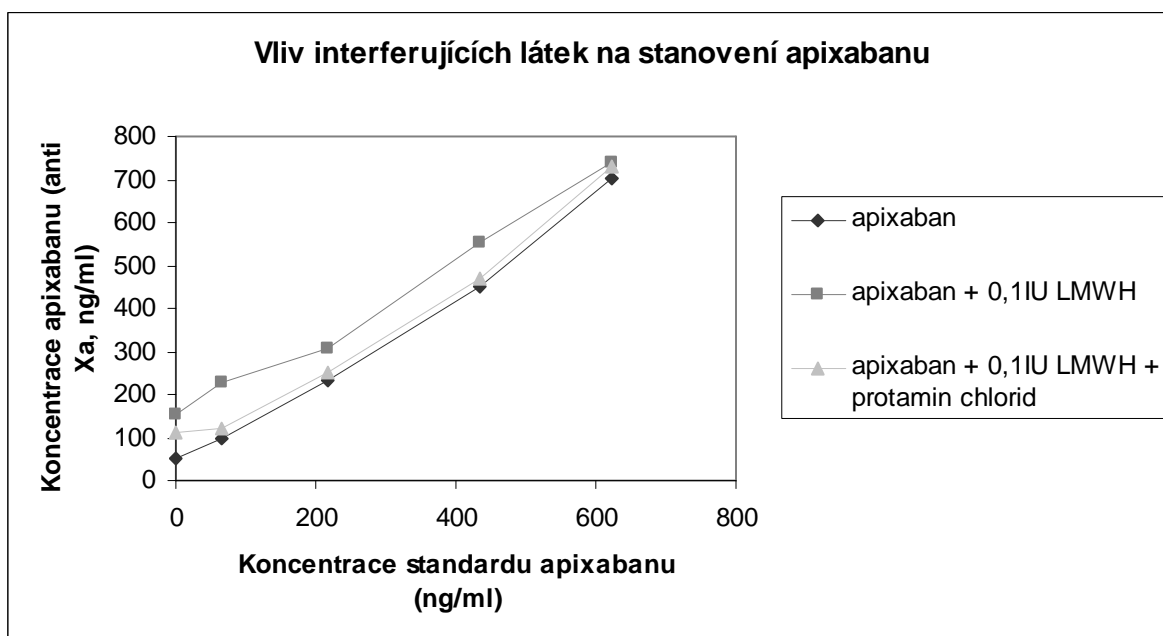
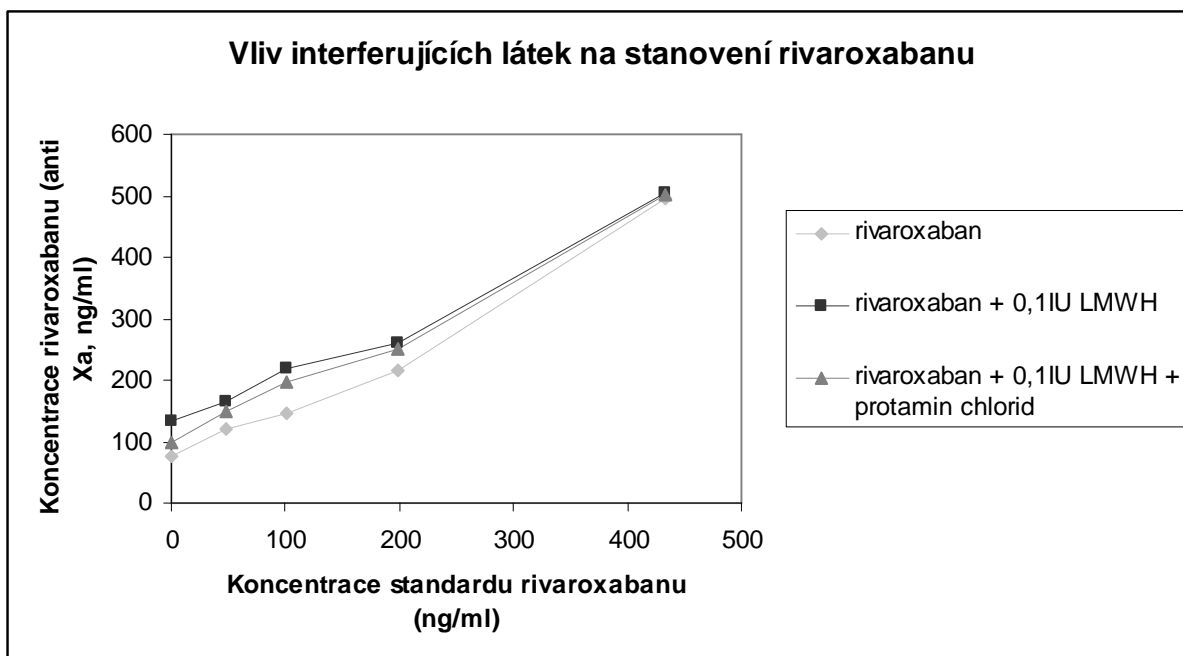
Kalibrátor APIXABANU						
	tLag [min]	tPeak [min]	Peak [nM]	VI [nM/min]	AUC [nMmin]	Anti-Xa [ng/ml]
Cal1 (0ng/mol)	5,4	12,7	137,9	18,8	1944,8	49,1
Cal2 (64,4ng/mol)	6,6	16,9	56,6	5,5	1391,2	96,8
Cal3 (215,9ng/mol)	7,8	25,5	27,5	1,5	848,4	232,2
Cal4 (433,0ng/mol)	8,4	24,3	25,5	1,6	767,4	451,3
Cal5 (623,5ng/mol)	8,5	25,8	21,1	1,2	633,9	701,2
Kalibrátor APIXABANU + 0,1IU LMWH						
Cal1 (0ng/mol)	4,6	12,1	118,8	15,8	1782,5	152,2
Cal2 (64,4ng/mol)	5,7	15,2	53,0	5,0	1335,2	227,0
Cal3 (215,9ng/mol)	5,2	24,7	27,9	1,4	868,4	307,6
Cal4 (433,0ng/mol)	7,7	23,6	21,6	1,4	662,3	553,5
Cal5 (623,5ng/mol)	8,4	29,5	19,2	0,9	567,9	737,5
Kalibrátor APIXABANU + 0,1 IU LMWH + protamin chlorid						
Cal1 (0ng/mol)	5,0	12,7	129,1	16,7	1875,5	109,5
Cal2	5,4	16,4	53,4	4,8	1325,1	121,7

(64,4ng/mol)						
Cal3 (215,9ng/mol)	5,5	24,1	27,1	1,5	819,8	250,4
Cal4 (433,0ng/mol)	7,7	21,7	21,1	1,5	636,7	469,9
Cal5 (623,5ng/mol)	8,4	29,7	17,7	0,8	511,3	728,7
Kalibrátor APIXABANU + 0,2IU LMWH						
Cal1 (0ng/mol)	5,0	13,0	47,6	5,9	998,7	170,1
Cal2 (64,4ng/mol)	2,4	23,8	20,2	0,9	614,7	246,1
Cal3 (215,9ng/mol)	3,2	42,5	9,8	0,2	254,3	374,8
Cal4 (433,0ng/mol)	7,5	37,9	12,0	0,4	297,0	475,0
Cal5 (623,5ng/mol)	5,2	39,2	5,2	0,2	97,6	722,8

S přidavkem LMWH nedošlo ani u jednoho z léků téměř k žádné změně parametrů tLag a tPeak, u parametrů Peak a AUC bylo v případě koncentrace LMWH 0,1IU možno pozorovat mírný pokles, u koncentrace 0,2IU pokles větší. Přídavek protamin chloridu ke vzorkům obsahujícím 0,1IU LMWH znamenal téměř úplnou inhibici jeho vlivu, zatímco u koncentrace 0,2IU LMWH došlo jen k částečné inhibici. Vliv přítomnosti LMWH na trombinogram xabanu znázorňují následující grafy.



V případě stanovení anti-Xa aktivity bylo možno pozorovat významný nárůst naměřené koncentrace, který bylo opět možno u koncentrace LMWH 0,1IU částečně eliminovat přidavkem protamin chloridu. Následující grafy znázorňují posun kalibračních křivek po přidavku 0,1IU LMWH a protamin chloridu.



V obou případech platilo, že nárůst způsobený přidavkem LMWH byl o to větší, čím nižší byla koncentrace NOAC v plazmě.

5. Závěr

Hlavním cílem této diplomové práce bylo porovnání a korelace tří možných metod stanovení xabanů v plazmě.

První metodou byl Trombin generační test (TGA), který je nepřímou metodou stanovení a nabízí komplexní pohled na funkci koagulační kaskády. Metodou druhou je stanovení anti-Xa aktivity. Jedná se o chromogenní metodu přímého stanovení koncentrace antikoagulantů v plazmě. Metodou třetí, která byla zvolena jako metoda referenční, je HPLC-MS/MS.

K porovnání jednotlivých metod lze přistoupit z různých hledisek. Nejdostupnější z metod je stanovení anti-Xa aktivity, jedná se o rutinní test většiny koagulačních laboratoří, který lze využít pro různá antikoagulantů (ve spojení s vhodnými kalibrátory), nejméně dostupnou metodou je potom HPLC-MS/MS, která je doménou zejména výzkumných pracovišť. Finančně nejnáročnější metodou je HPLC-MS/MS, ať už jsou uvažovány pořizovací či provozní náklady. Další je hledisko časové náročnosti. TGA měření trvá okolo jedné hodiny nezávisle na počtu vzorků, doba měření anti-Xa aktivity je řádově v minutách dle počtu vzorků, délka jedné HPLC analýzy je asi 3 minuty, nicméně zde je nutno brát v úvahu také ekvilibraci přístroje a proměření blanku. S tím spojené jsou i požadavky na přípravu vzorku - největší požadavky na předúpravu vzorku klade HPLC-MS/MS, kdy se měří deproteinovaná plazma spikovaná deuterovaným standardem, TGA a stanovení anti-Xa aktivity probíhá přímo z krevní plazmy.

	čas	cena	dostupnost	náročnost	specifita
Anti-Xa	nenáročná	přijatelná	dostupná	jednoduchá	nízká
TGA	nenáročná	přijatelná	dostupná	jednoduchá	nízká
HPLC	časově náročná	vysoká	výzkumná pracoviště	náročná	vysoká

V prvotních experimentech byly metody TGA a stanovení anti-Xa aktivity nakalibrovány pro rivaroxaban v koncentračním rozsahu 18,0-288,6 ng/ml a pro apixaban v rozsahu 38,4-307,2 ng/ml a posléze byla posuzována robustnost metod z pohledu opakovatelnosti a reprodukovatelnosti. Nižší variační koeficienty a tedy lepší robustnost vykazuje stanovení anti-Xa aktivity (do 3%). U HPLC-MS/MS nebyla opakovatelnost a reprodukovatelnost stanovována, nicméně variační koeficienty opakovatelnosti a

reprodukovatelnosti pro obdobnou analýzu (analýza imunosupresiv) prováděnou na stejném pracovišti a na stejném přístroji se pohybovali do 4%.

K posouzení korelace jednotlivých metod byly proměřeny dva soubory pacientů - jeden pro rivaroxaban (n=63), druhý pro apixaban (n=16). Jednotlivé vzorky byly proměřeny všemi třemi metodami a získané výsledky byly následně korelovány vůči HPLC-MS/MS.

Z korelační analýzy pro rivaroxaban vyplynulo, že stanovení anti-Xa aktivity je vhodnější metodou pro stanovení tohoto antikoagulantia v plazmě, jelikož korelační koeficient ($r_{xy} = 0,84$) byl dvojnásobně vyšší než korelační koeficienty jednotlivých parametrů TGA. U těchto parametrů se povedlo prokázat mírnou korelaci s koncentrací rivaroxabanu v plazmě u hodnot tLag ($r_{xy} = 0,41$), Peak ($r_{xy} = -0,35$) a AUC ($r_{xy} = 0,45$), nicméně jelikož neznáme původní hodnoty těchto parametrů, nelze je využít ke kvantifikaci rivaroxabanu. U zbylých parametrů TGA (tPeak, $r_{xy} = 0,09$; VI, $r_{xy} = -0,24$) nebyla neprokázána korelace žádná.

V případě apixabanu byla rovněž prokázána významná korelace u stanovení anti-Xa aktivity (korelační koeficient $r_{xy} = 0,83$) a tato metoda tak může být rutinně využívána pro stanovení apixabanu v plazmě. Těsná korelace byla u apixabanu prokázána i s některými parametry TGA, konkrétně tLag ($r_{xy} = 0,65$), tPeak ($r_{xy} = 0,68$) a AUC ($r_{xy} = 0,76$), se zbylými parametry byla prokázána korelace mírná (Peak, $r_{xy} = -0,63$; VI, $r_{xy} = -0,52$). Ani v tomto případě však nejsou známy hodnoty těchto parametrů před započítáním antikoagulační léčby a tak nemohou být využity pro stanovení apixabanu v plazmě.

Uvažujeme-li vhodnost jednotlivých metod z pohledu interferencí, nejlepší volbou se ukazuje HPLC-MS/MS, kdy LMWH (interferent xabanů) výsledky neovlivňuje vůbec. Porovnáme-li vliv LMWH na TGA a stanovení anti-Xa aktivity, méně byly ovlivněny výsledky TGA (vznané změny až u vyšší koncentrace LMWH).

Závěrem lze konstatovat, že v případě potřeby monitorace antikoagulační léčby xabany, lze pro jejich stanovení optimálně využít metodu chromogenního stanovení anti-Xa aktivity, která poskytuje dostatečně přesné výsledky. Z výsledků experimentu zabývajících se studiem vlivu interferujících látek (LMWH) ovšem vyplývá, že při přítomnosti nízkomolekulárních heparinů mohou být výsledky stanovení anti-Xa aktivity nadhodnoceny a neposkytnou tak přesnou informaci o koncentraci xabanu v plazmě. Vliv LMWH lze částečně eliminovat neutralizací protamin chloridem, který může být přidáván společně s reagentii k testované plazmě. V případě změny měřených parametrů po přidání protamin chloridu

můžeme konstatovat, že stanovení xabanů je ovlivněno přítomností LMWH. Bohužel protamin chlorid za běžných podmínek inhibuje vliv LMWH pouze částečně. Tudíž jej nelze použít pro plné odstranění interference LMWH.

6. Literatura

- (1) Hemostasis: Lessons 1-6, Strong Medicine, youtube.com shlédnuto 19.3.2016.
- (2) <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Hemokoagulace> staženo 20.3.2016.
- (3) https://s3.amazonaws.com/ww-article-cache-1/cs/Faktor_XII staženo 20.3.2016.
- (4) <http://content.onlinejacc.org/article.aspx?articleid=1142920> staženo 20.3.2016.
- (5) http://www.nature.com/nrd/journal/v8/n5/fig_tab/nrd2851_F1.html staženo 20.3.2016.
- (6) <http://en.wikipedia.org/wiki/Fondaparinux#/media/File:Fondaparinux.svg> staženo 20.3.2016.
- (7) Haas S.: J Thromb, 25, 52 (2008).
- (8) Schulman S.: J Intern Med, 275, 1 (2014).
- (9) Mueck W., Stampfuss J., Kubitzka D., Becka M.: Clin Pharmacokinet, 53, 1 (2014).
- (10) Nutescu E.: Am J Health-Syst Pharm, 69, 1113 (2012).
- (11) Beudel S. D., Bona R., Baker W. L.: Adv Ther, 28, 460 (2011).
- (12) http://www.practical-haemostasis.com/Miscellaneous/Miscellaneous%20Tests/isi_and_inr.html staženo 20.3.2016.
- (13) http://www.thrombosis.cz/sources/Guidelines-Monitoring_antikoagulace_STH_III062.pdf , staženo 1.4.2016.
- (14) Zhánělová M.: Bakalářská práce. Univerzita Palackého, Olomouc 2014.
- (15) Favalaro E. J., Lippi G.: Biochem Med, 22, 329 (2012).
- (16) Kern A., Várnai K., Vásárhelyi B.: Orv Hetil, 155, 851 (2014).
- (17) Fenger-Eriksen C., Munster A. M., Grove E.L.: Acta Anaesthesiol Scand, 58, 651(2014).
- (18) <http://laboratoryinfo.com/hplc/> staženo 15.4.2016
- (19) Nováková L., Douša M.: Moderní HPLC separace v teorii a praxi I, Europrint a.s., Praha, 2013.
- (20) Nováková L., Douša M.: Moderní HPLC separace v teorii a praxi II, Europrint a.s., Praha, 2013.

7. Seznam použitých zkratek a symbolů

- ACS - akutní koronární syndrom
- ACT - aktivovaný srážecí čas
- ADP - adenosindifosfát
- APCI - chemická ionizace za atmosférického tlaku
- APPI - fotoionizace za atmosférického tlaku
- APTT - aktivovaný parciální tromboplastinový čas
- AUC - area under curve (plocha pod křivkou)
- CAD - kolizní plyn
- CE - kolizní energie
- CL_{CR} - clearance kreatininu
- CXP - výstupní potenciál kolizní cely
- CYP - cytochrom P450
- DIC - diseminovaná intravaskulární koagulace
- DP - deklasterizační potenciál
- dTT - dilutovaný trombinový čas
- DVT - hluboká žilní trombóza
- ECT - ekarinový koagulační čas
- EDTA - kyselina ethylendiaminotetraoctová
- EP - vstupní potenciál
- ESI - ionizace elektrospřejem
- F__ - srážecí faktor __
- GS1 - zmlžovací plyn
- GS2 - sušící plyn
- HIT - heparinem indukovaná trombocytopenie
- HIV - virus lidské imunitní nedostatečnosti
- HPLC-MS - vysokoúčinná kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
- INR - mezinárodní normalizovaný poměr
- IS - napětí na vstupní kapiláře
- ISI - mezinárodní index citlivosti
- LMWH - nízkomolekulární hepariny
- MRM - multiple reaction monitoring

- NOAC - nová orální antikoagulancia
- PE - plicní embolismus
- PT - protrombinový čas
- TEM - teplota zmlžujícího plynu
- TF - tkáňový faktor
- TGA - trombin generační test
- TFPI - inhibitor tkáňového faktoru
- t-Pa - aktivátor tkáňového plazminogenu
- TT - trombinový čas
- UFH - nefrakcionovaný heparin
- u-Pa - aktivátor tkáňového plazminogenu urokinásového typu
- US FDA - US Food and Drug Administration (Ústav pro kontrolu potravin a léčiv)
- VI - velocity index (rychlostní index)
- VKA - antagonisté vitamínu K
- VTE - žilní tromboembolismus
- vWF - von Willebrandův faktor