

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



MOŽNOSTI DETEKCE PŘÍMÝCH INHIBITORŮ
TROMBINU

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Markéta Němcová

Studijní program: B1407- Chemie

Studijní obor: Bioorganická chemie

Typ studia: prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Luděk Slavík Ph.D.

Termín odevzdání práce: 15.5.2014

Ráda bych poděkovala vedoucímu své práce Mgr. Lud'ku Slavíkovi za rady a věnovaný čas, Dr.Mgr. Janě Zapletalové za statistiku a celému kolektivu v koagulační laboratoři Hemato-onkologické kliniky FN v Olomouci.

Já, Markéta Němcová, prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem Mgr. Lud'ka Slavíka, Ph.D. Veškeré použité informační zdroje a literaturu jsem uvedla na konci své práce.

V Olomouci dne 23.4.2014

.....

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Markéta Němcová
Název práce:	Možnosti detekce přímých inhibitorů trombinu
Typ práce:	bakalářská
Pracoviště:	Koagulační laboratoř, Hemato-onkologická klinika FN Olomouc
Vedoucí práce:	Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2014
Abstrakt:	

V současné době se do popředí zájmů dostávají nová antikoagulancia, která se používají k prevenci cévní mozkové příhody a žilní trombembolie, jež jsou onemocnění spojené se značnou morbiditou a mortalitou. V perorální léčbě se jedná především o přímé inhibitory trombinu.

Tyto látky se vážou na trombin a tím blokují jeho funkci. Trombin je klíčový enzym krevního srážení. Prvním je orálním přímým inhibitorem trombinu, který je používán k profylaxi, je dabigatran etexilát (PRADAXA). U dabigatran etexilátu dle doporučení výrobce není nutná monitorace díky předvídatelnému antikoagulačnímu účinku. Nicméně s postupem času se jeví situace, kdy je monitorace nutná (náhlé ukončení antikoagulační léčby, předávkování, krvácivá komplikace léčby). V těchto situacích se nyní používají běžné základní koagulační testy sloužící ke zhodnocení stupně rizika krvácení. Tyto testy nepostihnou aktivaci celé koagulační kaskády. Z tohoto důvodu jsme provedli zhodnocení dvou specifických koagulačních testů - diluovaný trombinový čas a trombin generační čas - pro stanovení dávky dabigatran etexilátu.

Klíčová slova:	tromboembolické příhody, trombin, dabigatran, trombin generační test, koagulační kaskáda
Počet stran:	44
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Markéta Němcová
Title: Possibilities of detection of direct thrombin inhibitors
Type of thesis: Bachelor
Department: Coagulation laboratory, Dept. of Hemato-oncology
University Hospital Olomouc
Supervisor: Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
The year of presentation: 2014
Abstract:

New anticoagulants are currently coming to the foreground in the prevention of stroke and venous thromboembolism which are diseases associated with significant morbidity and mortality. These are mainly peroral direct trombin inhibitors.

These substances bind to thrombin and thereby block its function. Thrombin is a key enzyme in blood coagulation. The first oral direct thrombin inhibitor used in prophylaxis is dabigatran etexilate (Pradaxa). Its predictable anticoagulant effects enable its use without monitoring as recommended by manufacturer. However, there appear to be situations in which the monitoring is required (abrupt termination of anticoagulant treatment, overdose, bleeding complications). In these situations, basic coagulation tests are commonly used to analyse the risk of bleeding. These tests do not affect the activation of whole coagulation cascade though. For this reason, we used two specific coagulation tests - diluted thromboplastin time and thrombin generation time - to determine the dose of dabigatran etexilate.

Keywords: thromboembolic events, thrombin, dabigatran, thrombin generation test, coagulation cascade
Number of pages: 44
Language: Czech

Obsah

1. Úvod	9
2. Teoretická část	
2.1 Hemostáza	9
2.1.1 Hemokoagulace	9
2.2 Antitrombotické léky	12
2.2.1 Antikoagulancia	13
2.3 Přímé inhibitory trombinu	14
2.4 Dabigatran	16
2.5 Laboratorní stanovení aktivity	20
2.6 Statistika	26
3. Experimentální část	
3.1 Cíle experimentu	27
3.2 Materiál a metody	27
3.3 Vlastní měření	28
4. Výsledky a diskuze	32
5. Závěr	41
Literatura	42
Použité zkratky	44

Seznam tabulek:

tabulka 1: přehled koagulačních faktorů

tabulka 2: rozdělení antikoagulancií

tabulka 3: analýza účinnosti léčby

tabulka 4: příprava reagensií na TGA

tabulka 5: příprava reagensií na DTI

tabulka 6: výsledky opakovatelnosti

tabulka 7: naměřené hodnoty vzorků

tabulka 8: základní statistické charakteristiky

tabulka 9: korelační analýza

tabulka 10: hodnoty iniciálně a po aplikaci denní dávky

Seznam grafů:

graf 1: závislost tlag na koncentraci Pradaxy- reálný soubor

graf 2: závislost tlag na koncentraci Pradaxy- ideální soubor

graf 3: závislost peak na koncentraci Pradaxy- reálný soubor

graf 4: závislost peak na koncentraci Pradaxy- ideální soubor

graf 5: závislost AUC na koncentraci Pradaxy- reálný soubor

graf 6: závislost AUC na koncentraci Pradaxy- ideální soubor

graf 7: bodový korelační graf s kalibrační přímkou

graf 8: závislost Δt_{lag} na koncentraci léčiva

graf 9: závislost $\Delta peak$ na koncentraci léčiva

graf 10: závislost ΔAUC na koncentraci léčiva

Seznam obrázků:

- obr. 1: koagulační kaskáda
- obr. 2: přeměna fibrinogenu na fibrin
- obr. 3: antikoagulancia
- obr. 4: místa působení některých antikoagulancií
- obr. 5: místa navázání inhibitorů na trombin
- obr. 6: syntéza dabigatranu
- obr. 7: farmakokinetika léku
- obr. 8: komplex dabigatran - trombin
- obr. 9: závislost koagulačních parametrů na clearance 200 mg dávky dabigatranu
- obr. 10: prodloužení ECT, PT, TT a aPTT na plazmatické koncentraci dabigatranu
- obr. 11: lineární vztah mezi Hemoclot testem a koncentrací dabigatranu ve vzorku
- obr. 12: průchod paprsku kyvetou
- obr. 13: trombinogram
- obr. 14: analyzátor Ceveron® Alpha, Technoclone
- obr. 15: trombinogram opakovatelnosti u jednoho pacienta
- obr. 16: vliv dávky dabigatran etexilátu v plazmě

1. Úvod

Hemostáza je soubor reakcí zajišťujících odpověď organismu na poranění cévy, která vedou k uzavření místa poškození krevní sraženinou. Toto uzavření poškozeného místa nás chrání před krevní ztrátou. Hlavními složkami hemostázy jsou cévní stěna, aktivující tkáňový faktor, trombocyty, které jsou zdrojem fosfolipidů v koagulačních dějích, a plazmatický koagulační systém. Skládá se z několika navazujících dějů - reakce cév, činnosti krevních destiček a hemokoagulace. Klíčovou roli v procesu krevního srážení hraje trombin.

2. Teoretická část

2.1 Hemostáza

Hemostáza zahrnuje řadu regulovaných procesů, které směřují k zástavě krvácení vytvořením trombinu a fibrinového koagula a posléze k rozpuštění (lýze) fibrinového koagula. (Šlechtová, 2007)

Pro homeostázu je nezbytné zachování krve v krevním řečišti v nativním stavu. Při poškození cévy nastupují okamžitě hemostatické procesy, které vedou k uzavření cévní stěny. Tekutá krev se pomocí hemostatických dějů přemění na krevní sraženinu, která je po určité době rozpouštěna fibrinolytickým systémem, což vede až k obnovení cévního řečiště v původním stavu.

Z časového hlediska rozdělujeme hemostázu:

1. Primární hemostáza

- vazokonstrikce
- adheze a aktivace trombocytů
- agregace trombocytů a vytvoření primární fibrinové zátky

2. Sekundární hemostáza (hemokoagulace)

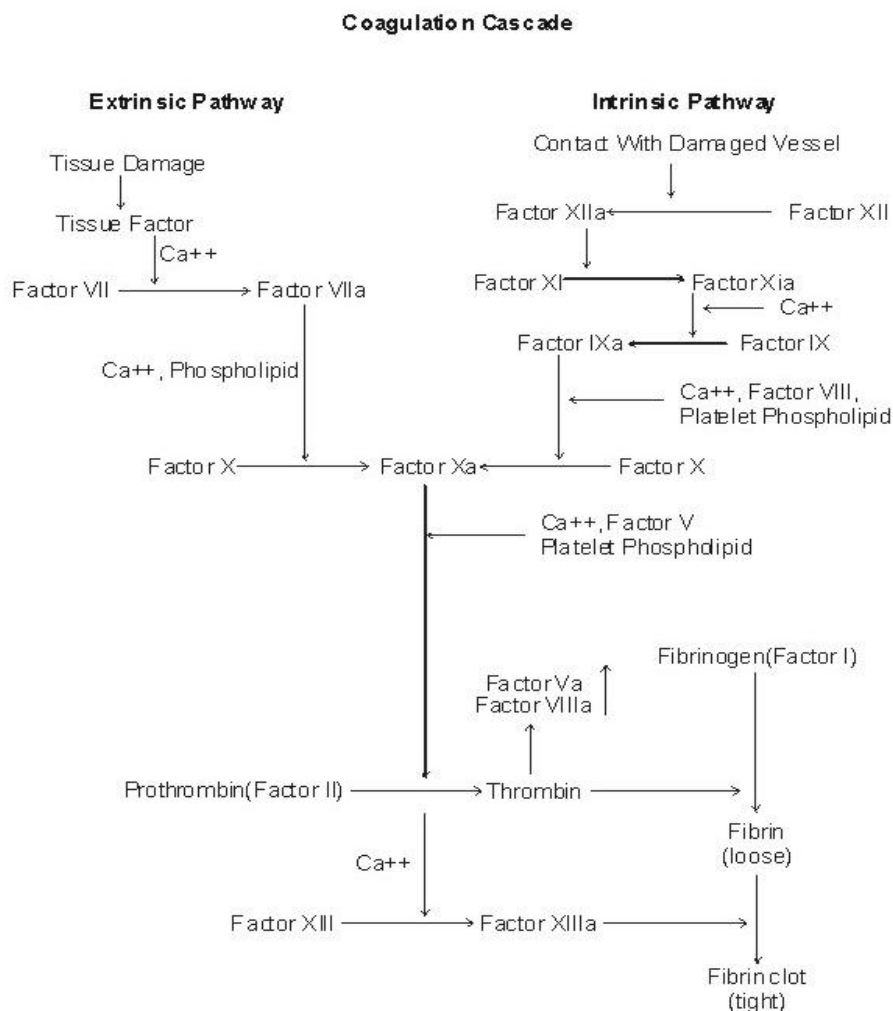
- aktivace srážecích faktorů a vytvoření pevného fibrinového koagula

3. Fibrinolýza

- aktivace fibrinolýzy
- rozpuštění fibrinového koagula (Šlechtová, 2007)

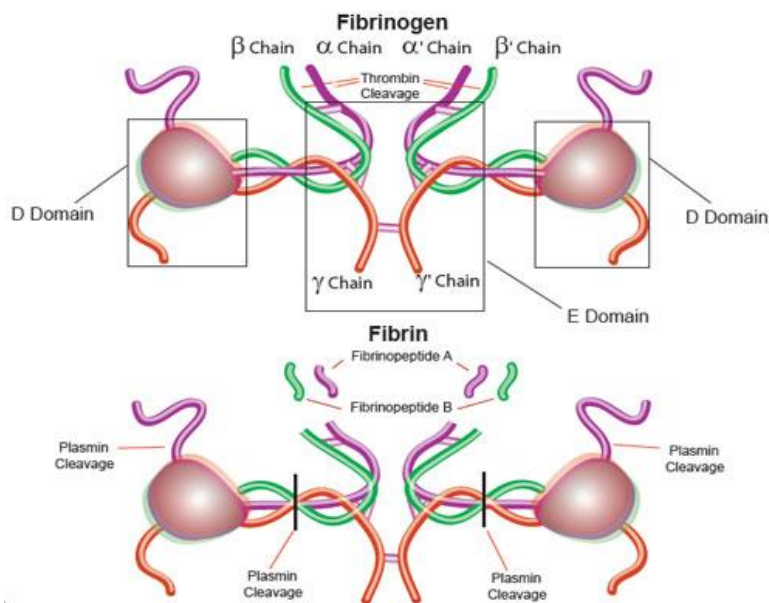
2.1.1 Hemokoagulace

Termín hemokoagulace znamená srážení krve způsobené postupnou aktivací koagulačních faktorů. Je součástí hemostázy, která brání ztrátám krve při poškození cévy. Klíčovou událostí hemokoagulace je tvorba nerozpustného fibrinu působením trombinu, který vzniká přeměnou fibrinogenu. Vytvořený fibrin spojuje dohromady agregované destičky a vytváří sraženinu. Látky, které se uplatňují v této kaskádě, se nazývají koagulační faktory.



obr.1: koagulační kaskáda

Katalyzátorem reakce přeměny fibrinogenu na fibrin je trombin. Dochází k odštěpení fibrinopeptidů (A+B) a vzniká monomerní fibrin, který polymerizuje a vytváří se fibrinová síť.



obr. 2: přeměna fibrinogenu na fibrin

Koagulační kaskáda je dělena na primární systém aktivace (dříve zvaný vnější systém) a přídatný systém aktivace koagulace (dříve zvaný vnitřní systém).

Primární systém aktivace se spouští po vazbě faktoru VIIa s TF. Vytvořený komplex se aktivuje za účasti fosfolipidů a Ca^{2+} iontů za vzniku tetramerního komplexu zvaného vnější tenáza. Faktor Xa vstupuje spolu se svým kofaktorem, FVa, destičkovými fosfolipidy a Ca^{2+} do komplexu protrombinázy. Protrombináza přeměňuje malé množství protrombinu na trombin.

Přídatný systém aktivace koagulace se spouští zpětnými mechanismy. FXa společně se svým kofaktorem FVa konvertuje v komplexu protrombinázy dostatečné množství protrombinu na trombin. (Šlechtová, 2007)

Faktor	Název
Faktor I	Fibrinogen
Faktor II	Protrombin
Faktor III	tkáňový tromboplastin
Faktor IV	Ca^{2+} ionty
Faktor V	Proakcelerin
Faktor VII	Prokonvertin
Faktor VIII	hemofilický faktor
Faktor IX	Christmas faktor
Faktor X	Stuartův-Prower faktor

Faktor XI	Plasma Tromboplastin Antecedent
Faktor XII	Hageman faktor
Faktor XIII	fibrin stabilizující faktor
Faktor XIV	protein C

tabulka 1: přehled koagulačních faktorů (Matýšková e. al., 1999)

2.1.1.1 Cílené ovlivnění hemokoagulace

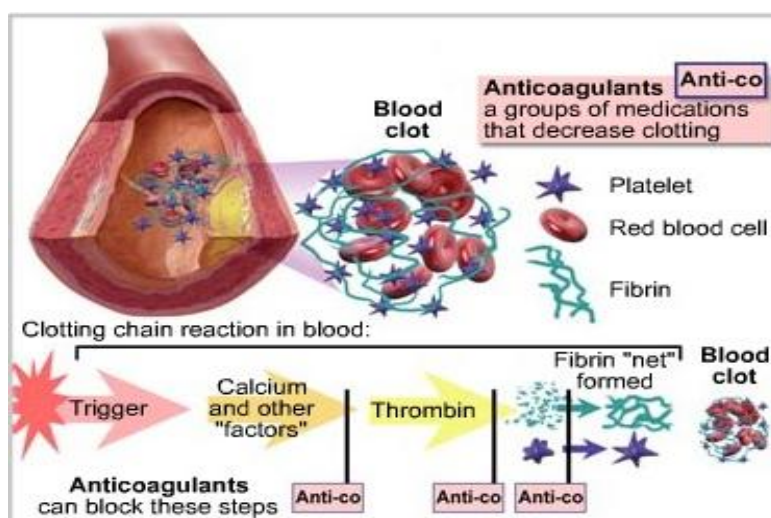
Snížení hemokoagulace se navozuje při poruchách koagulačního systému a při prevenci tromboembolické nemoci dolních končetin před chirurgickými výkony. V této situaci se využívají antikoagulantia - nejčastěji jsou to látky potencující přirozené inhibitory (heparin, rivaroxaban), antagonisté vitamínu K (warfarin) nebo přímé inhibitory (dabigatran).

Zvýšení hemokoagulace je žádoucí při deficitech koagulačních faktorů, kdy se musí podávat chybějící faktory nebo plazma. (wikiskripta.eu)

2.2 Antitrombotické léky

Antitrombotika jsou látky, které ovlivňují hemostázu. Antitrombotické léky souvisí s hyperkoagulačními stavy, které patří mezi nejčastější příčiny morbidit a mortality v průmyslově rozvinutých zemích. Této problematice je věnována zvýšená pozornost. Antitrombotika se indikují pacientům s akutní trombotickou komplikací nebo jako prevence po prodělané resp. očekávané trombotické komplikaci. Rozdělují se do několika skupin podle mechanismu působení: (Novotný, 2007)

1. antikoagulantia (obr.č.3)
2. protidestičkové léky
3. trombolýtika



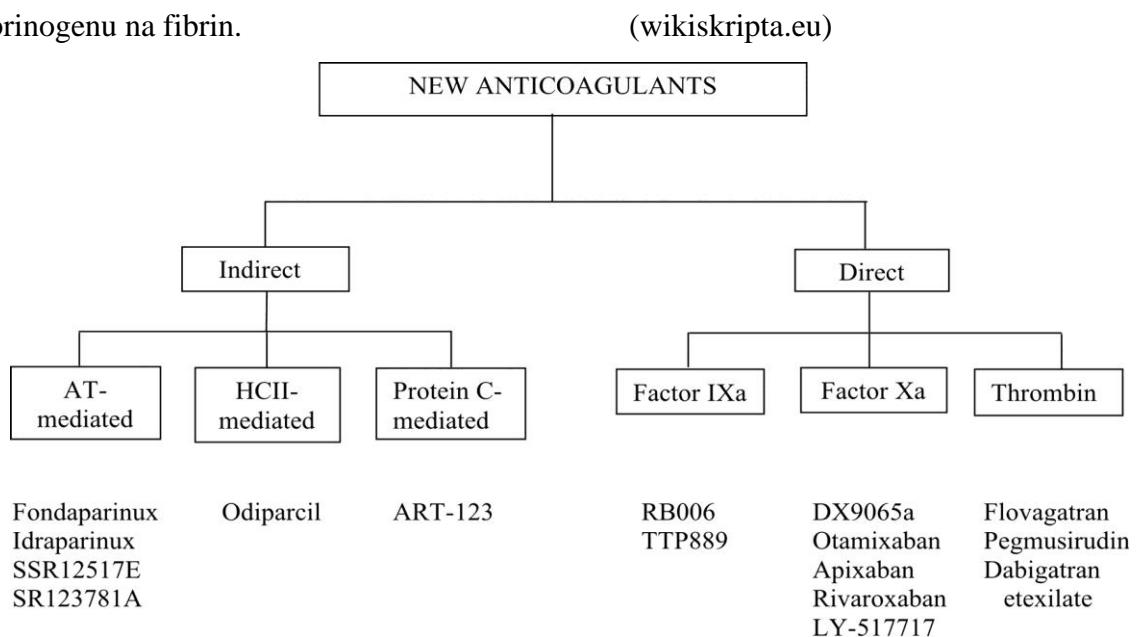
obr. 3: antikoagulancia

2.2.1 Antikoagulancia

Antikoagulancia jsou léčiva, které snižují srážlivost krve. Používají se k profylaxi žilní a nitrosrdeční trombózy a následné embolie. Svým působením blokují koagulační faktory. Lze je rozdělit podle mechanismu účinku na:

1. přímá antikoagulancia - inaktivují samotné koagulační faktory přítomné v plazmě
2. nepřímá antikoagulancia - ovlivňují koagulační faktory snížením jejich tvorby v játrech

Přímá antikoagulancia inhibují především trombin anebo faktor Xa. Trombin je důležitý protein v koagulační kaskádě, neboť aktivuje řadu koagulačních faktorů a katalyzuje přeměnu fibrinogenu na fibrin.



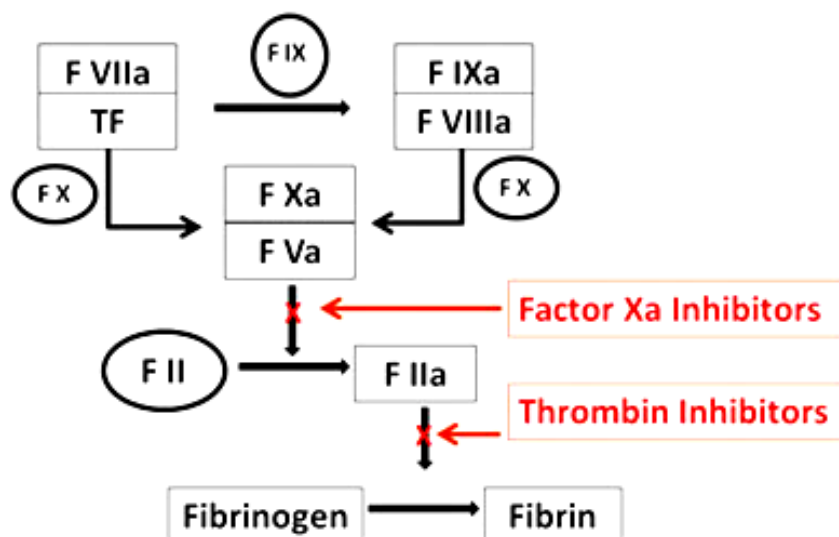
tabulka 2: rozdělení antikoagulancií

Po řadu let byly podávány hepariny, antagonisté vitamínu K(warfarin) a jiné léky.

V poslední dekádě byla postupně do praxe zaváděna nová antikoagulancia. Jde především o přímé inhibitory trombinu (dabigatran) a inhibitory faktoru Xa (rivaroxaban, apixaban). Nová antikoagulancia se zavádí z důvodu mnoha rizikových faktorů. Mezi tyto faktory patří interakce warfarinu s jinými léky, délka antikoagulační léčby a individuální vlastnosti pacienta. Riziko krvácení je větší u věku nad 65 let. Warfarin interaguje s řadou látek (např. barbituráty, benzodiazepiny). Dalšími nevýhodami jsou nedostatečný terapeutický index a neschopnost převést hepariny na perorální formu.

Tyto látky byly hodnoceny v klinických studiích u profylaxe VTE (žilní tromboembolie) u pacientů s vysokým rizikem, v prevenci cévní mozkové příhody u fibrilace síní a léčby akutních koronárních syndromů.

V České republice jsou běžně používány 2 léčiva, dabigatran etexilát (PRADAXA), rivaroxaban (XARELTO) v profylaxi tromboembolické příhody při náhradách kyčelních a kolenních kloubů. (J. Gumulec, 2005 ;Interní medicína pro praxi, 2012)



obr. 4: místa působení některých antikoagulancií

2.3 Přímé inhibitory trombinu

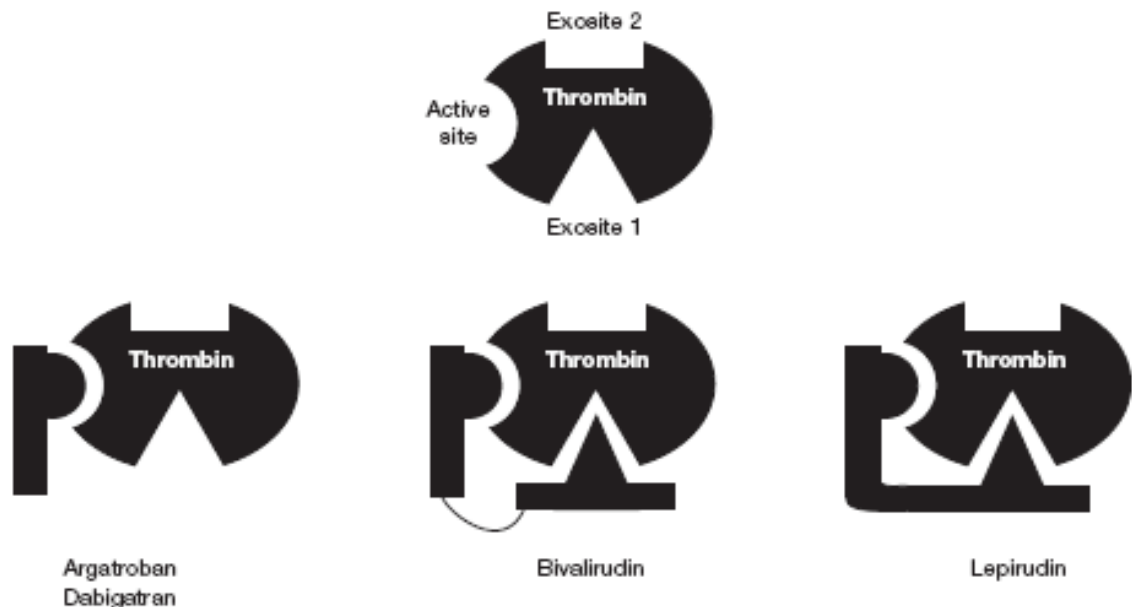
Přímé inhibitory trombinu (DTI) řadíme mezi přímá antikoagulancia. Jedná se o látky inhibující trombin, který je klíčovým enzymem závěrečných kroků koagulační kaskády. Tyto inhibitory nevyžadují jako kofaktor antitrombin. Jsou schopny inaktivovat jak volný, tak i vázaný trombin ve sraženině, čímž se zabrání přeměně fibrinogenu na fibrin.

DTI můžeme rozdělit do několika skupin dle:

- původu:
 - přirozené - hirudin
 - syntetické - peptidomimetika napodobující sekvenci fibrinogenu, která reagují s aktivním místem trombinu
- typu vazby:
 - reverzibilní - dabigatran
 - ireverzibilní
- velikosti molekuly:

- polypeptidy - hirudin
 - nízkomolekulární inhibitory - argatroban, melagatran, dabigatran
- toho, kde vážou inhibitory trombin
- jednomocné
 - bivaletní
- (Postgraduální medicína 2009)

Trombin má 3 vazebná místa: exosite 1 (vazebné místo pro fibrinogen), exosite 2 (vazebné místo pro heparin) a aktivní místo. Pro navázání na trombin nepotřebují jako kofaktor antitrombin, jako je to u běžných antikoagulancií (nefrakcinovaný heparin UFH a LMWH). Jednomocné DTI se vážou pouze na aktivní místo a sem patří dabigatran a argatroban. Bivalentní (bivalirudinum a lepirudin), se vážou jak na aktivní místo, tak na exosite 1 trombinu.



obr. 5: místa navázání inhibitorů na trombin

U pacientů užívajících antikoagulancia se provádí monitorace účinku koagulačními testy, jako součást klinického hodnocení nebo při mimořádné události (selhání léčby). Mezi indikace patří primární prevence žilní tromboembolie u pacientů po totální náhradě kyčelního nebo kolenního kloubu, léčba akutní žilní tromboembolie (VTE), prevence cévních mozkových příhod u pacientů s FS, prevence tromboembolie po náhradách srdečních chlopní. Konkrétně u fibrilace síní je 5x větší riziko cévní mozkové příhody. Právě těmto cévním příhodám lze předcházet vhodnou antikoagulační léčbou, u které se osvědčil nový perorální lék - dabigatran. Právě přímý inhibitor trombinu prokázal skvělé výsledky ve srovnání s dobře

kontrolovaným warfarinem v prevenci TEN (trombembolická nemoc). Pacienti užívající dabigatran také mohli podstoupit zákrok do 48 hodin po ukončení léčby, což umožnilo kratší přerušení ochrany před tromboembolickými komplikacemi, než je tomu u warfarinu.

(Boehringer Ingelheim 2012)

U prováděných testů může být výrazně ovlivněna hladina fibrinogenu, protrombinový čas (PT), aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT), trombinový čas (TT). Pacienti užívající přímé inhibitory trombinu mohou mít prodloužený aPTT anebo PT a nízkou hladinu fibrinogenu.

2.4 Dabigatran

Patří mezi nová antikoagulantia, která jsou indikována v prevenci VTE po elektivní náhradě kolenního a kyčelního kloubu. V EU byl schválen již v roce 2008. Dabigatran (PRADAXA) je perorální reverzibilní přímý inhibitor trombinu.

2.4.1 Sloučenina chemicky

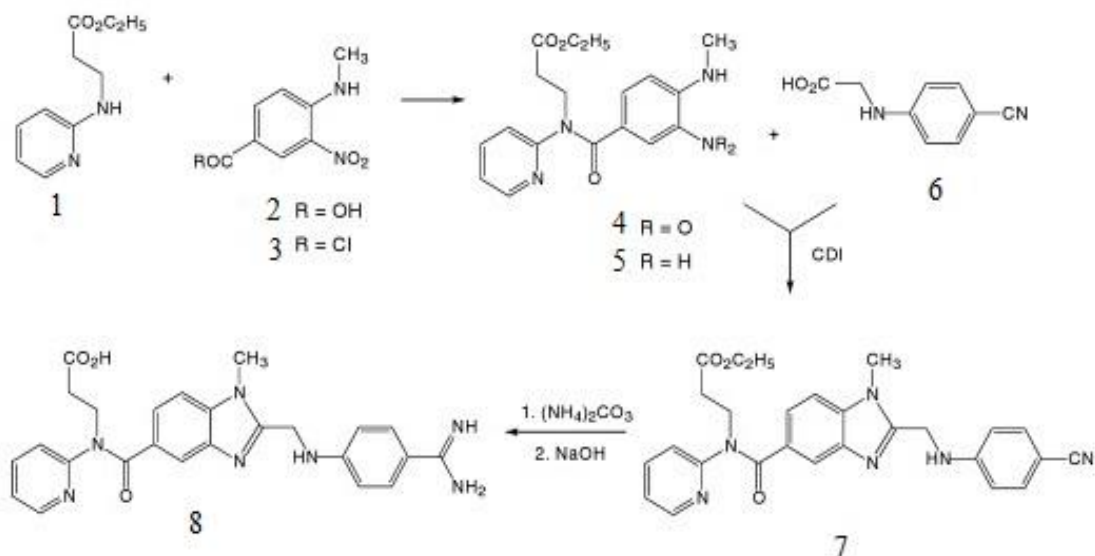
Dabigatran je trisubstituovaný derivát benzimidazolu s benzamidovou skupinou tvořící solný můstek s karboxylem aspartátového zbytku enzymu Asp 189 a obsahuje také karboxylovou kyselinu.

Dvojitě proléčivo, dabigatran etexilát, bylo vytvořeno derivatizací z amidinového zbytku na karbamátový ester a z karboxylátu na esterovou skupinu. Obě polární skupiny jsou obnoveny in vivo hydrolytickým štěpením.

2.4.1.1 Syntéza

Reakcí karboxylové kyseliny (**2**) s thionylchloridem se získá odpovídající chlorid kyseliny (**3**). Úprava tohoto meziprojektu se substituovaným pyridinylaminem (**1**) vede k amidu (**4**). Katalytickou hydrogenací produktu se zredukuje nitro skupina na primární amin(**5**). Kondenzací ortho diaminu s karboxylovou kyselinou (**6**) v přítomnosti karbonyldiimidazolu se vytvoří imidazolový kruh (**7**). Tato reakce probíhá přes amid vytvořený z primárního aminu následným nahrazením amidového karbonylového kyslíku sousedního aminu. Reakce produktu s uhličitanem amonným vede k přidání amoniaku na nitril za vzniku amidinu. Zmýdelněním postranního řetězce kyseliny se získá inhibitor trombinu, dabigatran (**8**).

(The Organic Chemistry of Drug Synthesis, 2007)



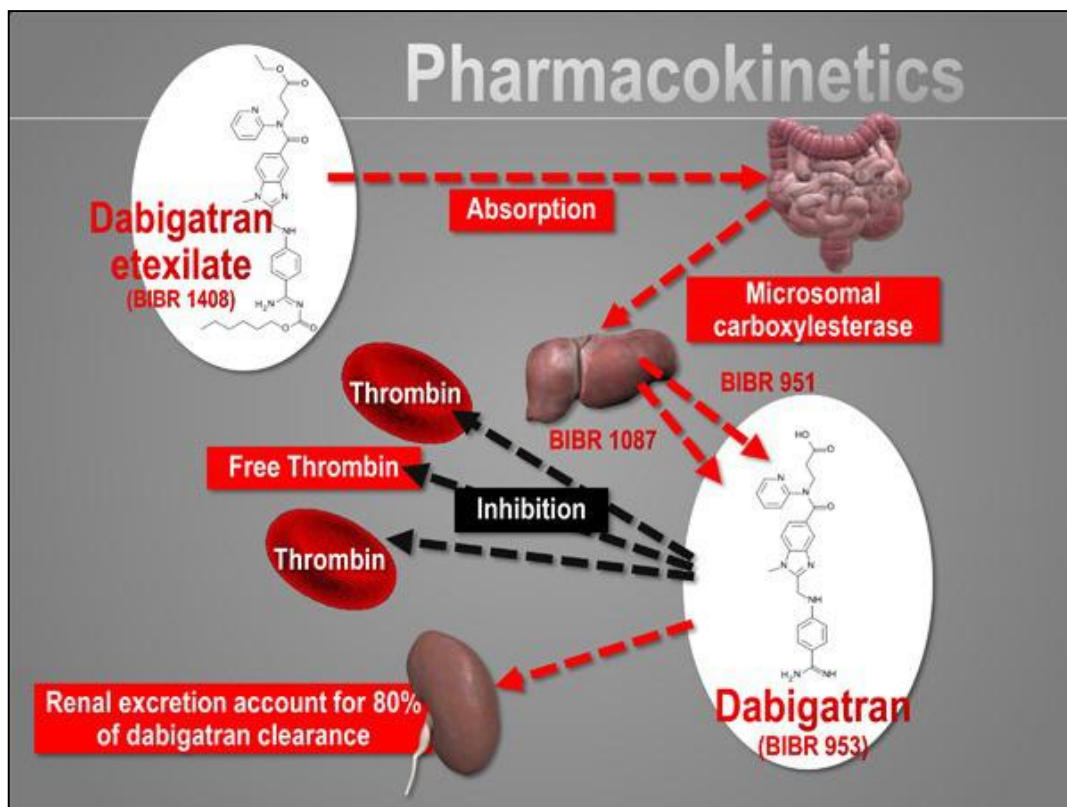
obr. 6: syntéza dabigatranu

2.4.2 Farmakokinetika

Dabigatran je podáván jako prolečivo - dabigatran etexilát, který se enzymatickou přeměnou (hydrolytické štěpení katalyzované esterázou) po absorpci v gastrointestinálním traktu mění na aktivní metabolit. Biologická přeměna začíná ve střevě, do portální žíly vstupuje prolečivo i účinná látka. V játrech je přeměna dokončena. Přeměna na dabigatran zahrnuje hydrolyzu 2 funkčních skupin: ethylester a etexilát skupiny. K dispozici jsou 2 přechodné metabolity v závislosti na tom, která ze skupin je dříve hydrolyzována. Biologická dostupnost dabigatranu (etexilátu) je kolem 4%. (Malý 2008)

Maximální koncentrace v plazmě je dosahována do 2 hodin. Nejčastěji je vylučován ledvinami, přičemž asi 80% z intravenózní dávky se vylučuje v nezměněné podobě močí a zbytek (acylglukoronidy) je vylučován žlučí. Poločas léčiva je 12-17 hodin.

(Bendel et al., 2011)



obr. 7: farmakokinetika léku

Výhodou je, že není metabolizován isoenzymy cytochromového systému ani transferázami, z tohoto důvodu výsledné riziko lékových a potravinových interakcí je relativně malé. Dabigatran podléhá konjugaci s kyselinou glukuronovou, která se v těle nachází jako endogenní substrát. Konjugací dochází ke vzniku 4 farmakologicky účinných acyl glukuronidů, které jsou polárnější než samotný dabigatran. Vznikají 4 polohové isomery, 1-O, O-2, 3-O-a 4-O-acylglukuronid, každému z nich připadá méně než 10% z celkového množství dabigatranu v plazmě. (AusPAR 2011)

Nevýhodou u přímého inhibitoru trombinu je nedostupnost antidota, při výskytu krvácení je nutno vyčkat odeznění účinku, poté provést substituci plazmy či podat rekombinantní koagulační faktor VIIa (NOVOSEVEN inj.). (Farmakoterapeutické informace 2011)

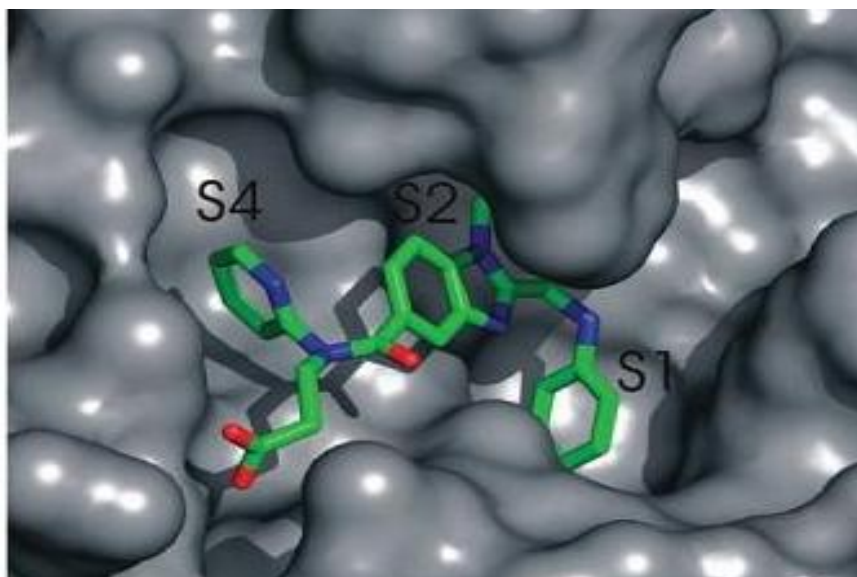
2.4.3 Mechanismus účinku

Cílem dabigatranu je trombin (serinová proteáza), který katalyzuje v koagulační kaskádě tvorbu fibrinu z fibrinogenu. Specifická a cílená inhibice má za následek zabránění tvorby krevní sraženiny. Dabigatran inhibuje jak volný trombin, tak trombin navázaný na fibrin a trombinem navozenou agregaci krevních destiček.

Dabigatran je malá molekula, která se váže reverzibilně na aktivní enzymatické místo trombinu.

Pomocí X-ray konstrukce se určil model navázání dabigatranu do komplexu s trombinem. Amidinová skupina interaguje s Asp189 přes dvojvazný solný můstek, centrální templát je vázán na trombin hydrofobní interakcí s S2 kapsou, pyridinový kruh je umístěn mezi Leu99 a Ile174 v S4 kapse. Dá se předpokládat, že nejsou žádné interakce mezi enzymem a karboxylovou skupinou, která směřuje ven z vazebného místa k rozpouštědлу. Jedna z nejpozoruhodnějších vlastností inhibitoru je, že dávka nevyužívá vodíkové vazby s enzymem. Kromě solného můstku s Asp189, vazebná energie hydrofobní interakce podtrhuje celkový význam v interakcích léčivo-receptor.

(Analogue-based Drug Discovery, 2013)



obr 8: komplex dabigatran - trombin

2.4.4 Studie

Dabigatran byl prověřen mnoha studiemi. Kombinace studií RE-MODEL, RE-SONATE, RE-MOBILIZE sledovala účinnost a bezpečnost dabigatranu v prevenci VTE u dospělých pacientů, kteří podstoupili elektivní operativní náhradu kyčelního nebo kolenního kloubu. U této kombinace studií nebyl prokázán zvýšený výskyt VTE a mortality spojené s VTE.

Kombinovaná analýza účinnosti léčby dabigatranem po velkých ortopedických operacích ve studiích RE-MODEL, RE-SONATE a RE-MOBILIZE			
sledované cíle	dabigatran 220 mg (%)	dabigatran 150 mg (%)	enoxaparin 40 mg (%)
významný VTE a VTE spojený s úmrtím	3,0	3,8	3,3
významné krvácení	1,4	1,1	1,4

tabulka 3: analýza účinnosti léčby

Účinnost a bezpečnost dabigatranu byla dokumentována ve studii RE-COVER v léčbě akutních tromboembolických příhod u lokalizovaných flebotrombóz a ve studii RE-LY profylaxe tromboembolických mozkových příhod při fibrilaci síní ve srovnání s warfarinem. V dávce 2x denně 110 mg byl dabigatran stejně účinný v profylaxi tromboembolie, léčba byla avšak zatížena menším výskytem krvácení. Dávka 2x 150 mg byla účinnější v prevenci tromboembolických příhod při stejném riziku krvácení ve srovnání s warfarinem.

(Farmakoterapeutické informace, 2011)

2.4.5 Monitorace

Dabigatran ani jiná nová antikoagulancia nevyžadují v běžné klinické praxi rutinní monitoraci parametrů koagulace díky svému předvídatelnému antikoagulačnímu účinku, pokud se používají v doporučených dávkách. V případě pacientů léčených přípravkem PRADAXA může být ve specifických situacích monitorace účinku vhodná, tj. např. při předávkování, při zvýšeném riziku krvácení nebo při poruše ledvin, kdy se prodlužuje eliminace přípravku.

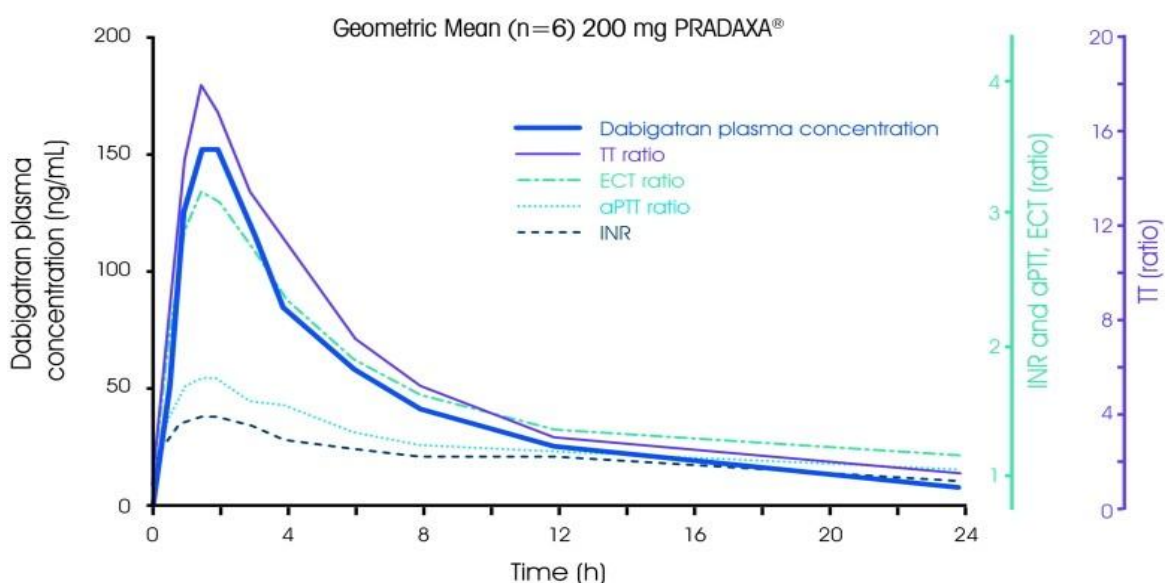
(Interní medicína pro praxi, 2012)

2.5 Laboratorní stanovení aktivity

V laboratorní praxi se používají jen základní laboratorní testy - aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas), TT (trombinový čas), PT (protrombinový čas). Existuje řada koagulačních testů prováděných různými metodami a reagenciemi, které mají různou interpretaci. Různé testy se chovají odlišně s rostoucí koncentrací dabigatranu.

Důležité pro hodnocení testů je doba odběru krve. Antikoagulační odpověď závisí na vztahu mezi časem odběru vzorku krve a časem, kdy byla podána poslední dávka léku (2

hodiny po požití bude průměrná maximální koncentrace a před užitím další dávky za 10-16 hodin bude minimální koncentrace). (Interní medicína pro praxi, 2012)



obr. 9: závislost koagulačních parametrů na clearance 200 mg dávky dabigatranu

Testy můžeme rozdělit na 2 skupiny:

- semikvantitativní - aPTT, TT, ECT
- kvantitativní - dTT (Hemoclot®), TGT

2.5.1 Aktivovaný parciální tromboplastinový čas

Test aPTT se zaměřuje na vnitřní systém koagulační kaskády. K testované plazmě se přidává kefalin (parciální tromboplastin), k urychlení reakce se přidá kaolin přestavuje negativně nabitý povrch (aktivátor) a jako startovací reagentie CaCl_2 . Měří se čas do vzniku fibrinového vlákna. Udává se v sekundách.

aPTT může poskytovat kvalitativní údaj na antikoagulační aktivitu dabigatranu, stejně jako ostatní přímé inhibitory trombinu, ale není vhodný pro přesné stanovení antikoagulačního účinku, zejména při vysoké plazmatické koncentraci dabigatranu.

U pacientů, kteří podstoupili dlouhodobou léčbu dabigatranem 150 mg 2x denně, je střední vrchol aPTT přibližně dvojnásobný oproti kontrole. K prodloužení aPTT dochází s rostoucí koncentrací léčiva v plazmě.

Hodnoty:

- normální aPTT - není klinicky významný antikoagulační účinek dabigatranu
- hladiny < 50ng/ml

- lehké prodloužení aPTT (typicky 1,5x) - účinná hladina dabigatranu
- aPTT > 70-90 s - vysoká koncentrace dabigatranu
- aPTT > 90 s - předávkování dabigatranem

(cmp-manual.wbs.cz ; Edgar Faber a kolektiv ; van Ryn et al)

2.5.2 Protrombinový čas

Protrombinový čas též Quickův test je základní koagulační test měřící funkčnost primárního systému aktivace koagulačního systému. Udává rychlost přeměny protrombinu na trombin v důsledku působení tkáňového tromboplastinu. Měří se čas do vytvoření fibrinového vlákna. K citrátové plazmě se přidá startovací reagentie- kalciový tromboplastin. Výsledek testu se udává v sekundách.

Není dostatečně citlivý k dabigatranu a užívání se nedoporučuje.

(Edgar Faber a kolektiv)

2.5.3 Aktivovaný koagulační čas

ACT je kvantitativní test založený na podobném principu testu na aPTT. V testu se používá kontaktních látek(kaolin, silica) bez přidání fosfolipidů a iontů Ca^{2+} .

Test se nedoporučuje.

(Edgar Faber a kolektiv)

2.5.4 Ecarinový test

ECT poskytuje přímé měření aktivity přímých inhibitorů trombinu. Aktivátor testu, ecarin, je hadí jed, který specificky aktivuje protrombin na trombin. Při reakci se tvoří mezotrombin, který je inaktivován ecarinem na mezotrombin-des-F1, jež přechází spontánně na α trombin. Poté dochází k přeměně fibrinogenu na fibrin.

Prodloužení ECT na přibližně 3-4 násobek v porovnání s normálními hladinami (v okamžiku minimální koncentrace) je spojeno se zvýšeným rizikem krvácení.

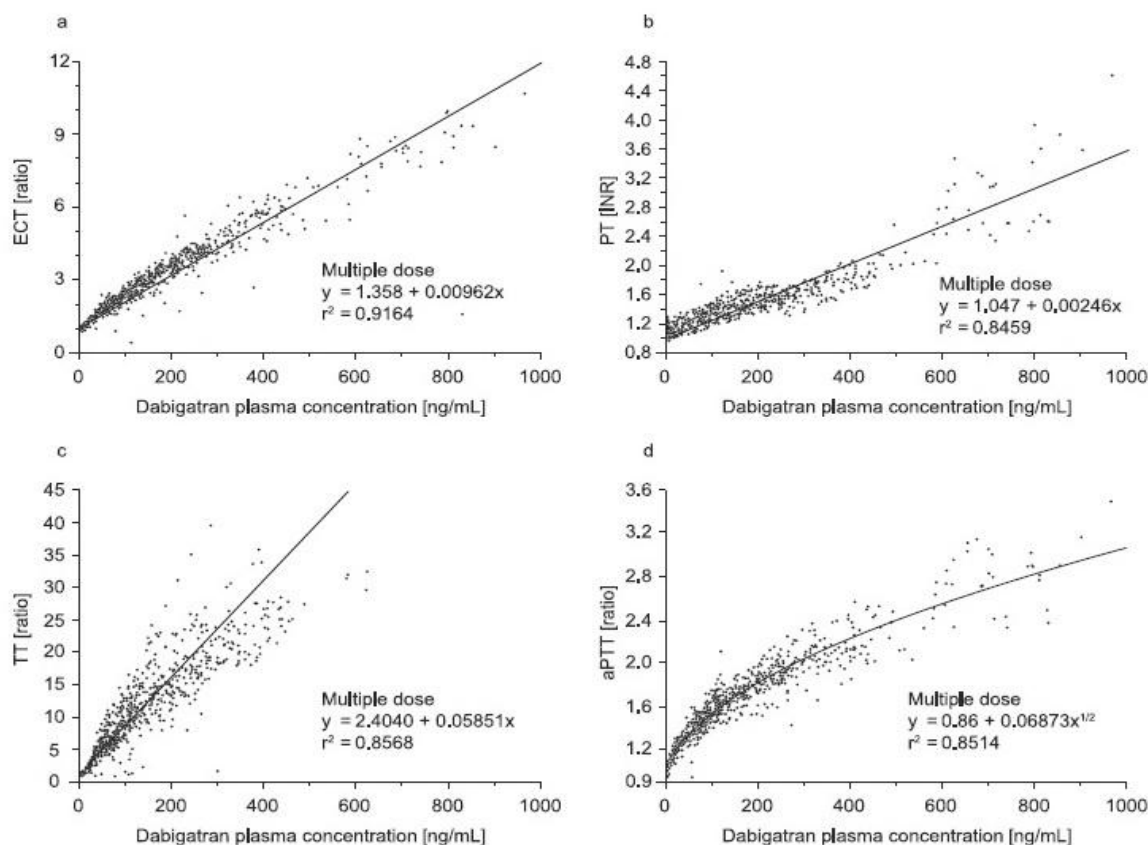
2.5.5 Trombinový test

Trombinový test postihuje 3. fázi koagulace, tj. štěpení fibrinogenu trombinem. Přidáním enzymu trombinu k plazmě dochází k přeměně fibrinogenu na fibrin. Výsledky se opět vyjadřují v sekundách.

Tento test je zvláště citlivý na účinky dabigatranu a zobrazuje lineární odpovědi na dávce na terapeutické koncentraci.

Metoda je velmi užitečná jako citlivá metoda pro určení přítomnosti dabigatranu. Prodloužení časů je nejčastěji u kvalitativních a kvantitativních poruch fibrinogenu, přítomnosti inhibitoru trombinu (dabigatran) a přítomnosti heparinu.

(imalab.cz; Edgar Faber a kolektiv)



obr. 10: prodloužení ECT, PT, TT a aPTT na plazmatické koncentraci dabigatranu

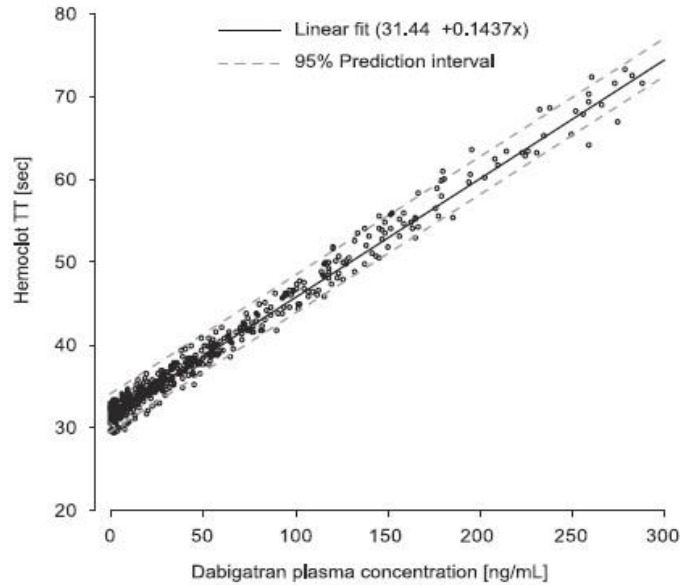
2.5.6 Hemoclot (direct trombin inhibitor assay)

Hemoclot je citlivý zředěný TT test, který umožňuje kvantitativní měření aktivity DTI v plazmě na základě inhibice a definované koncentrace trombinu.

Test je doporučovaný k monitoraci dabigatranu. Test lze použít při klinickém podezření na nadměrnou antikoagulační aktivitu léku, při krvácení a ke zhodnocení antikoagulační aktivity před akutními výkony.

Existuje přímý lineární vztah mezi koncentrací dabigatranu a časem srážení (od 30 do 75 sekund). Je kalibrován pro hladiny 50-500 ng/ml.

(cmp-manual.wbs.cz ; Interní medicína pro praxi, 2012)



obr. 11: lineární vztah mezi Hemoclot® testem a koncentrací dabigatranu ve vzorku

2.5.7 Trombin generační test

Trombin generační test postihuje aktivaci celé koagulační kaskády. Je založen na měření kinetiky generace trombinu a umožňuje komplexní posouzení funkce koagulace.

TGA je test, který monitoruje tvorbu trombinu prostřednictvím fluorogenního substrátu. Fluorogenní substrát je štěpen vytvořeným trombinem na fluorofor, jehož signál je zachycen detektorem a následně vyhodnocen příslušným softwarem.

Fluorogenní trombin generační test zahrnuje 3 roztoky (vzorek plazmy, aktivované činidlo, fluorogenní substrát) a roztok chloridu vápenatého (CaCl_2) pro start reakce. Je-li přidán pouze pufr jako aktivační činidlo, zahájení tvorby trombinu závisí na prokoagulantech přítomných v plazmě. Fluorogenní metody mohou být prováděny v plazmě obohacené krevními destičkami anebo používá se plazma chudá na krevní destičky.

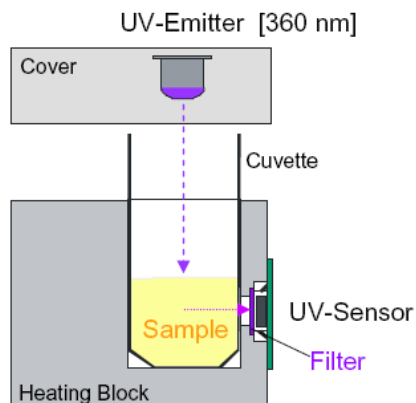
TGA je široce používán v klinickém výzkumu k měření globálního hemostatického potenciálu při poruchách srážlivosti krve buď pro diagnostické účely nebo jako prostředek k monitorování léčby. (Interní medicína pro praxi, 2012; Liang et al., 2013)

2.5.8 Principy použitých metody

1. Ceveron® Alpha

Pro praktickou část byl použit analyzátor Ceveron® Alpha a k němu vyšetřovací kit TECHNOTHROMBIN® TGA. Aktivace koagulační kaskády je dosaženo směsí tkáňového

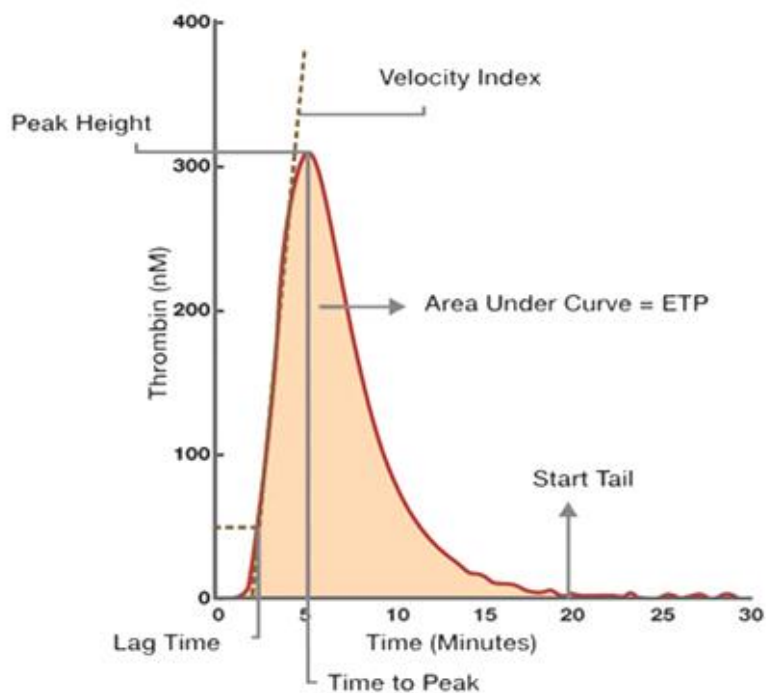
faktoru a fosfolipidů (TGA reagentie), ke kterým se přidá CaCl_2 . Vzniklý trombin štěpí fluorogenní substrát na fluorofor, jehož signál je zaznamenán fluorescenčním detektorem.



obr. 12: průchod paprsku kyvetou

Výsledkem testu je trombinogram- křivka závislosti koncentrace trombinu na čase a je charakterizována několika parametry:

- lag time- čas do začátku generace trombinu
- peak height (vrchol píku)- maximální vytvořená koncentrace trombinu
- ETP- plocha pod křivkou charakterizující celkové množství generovaného trombinu
- time to peak- čas do vytvoření maximální koncentrace trombinu
- start tail- čas, kdy končí generace trombinu
- velocity index- rychlost nárůstu generace trombinu



obr. 13: trombinogram

2. ACL-TOP - chromogenní (absorbanční) měření

Chromogenní měření mohou být přímé nebo nepřímé.

Při přímých zkouškách působí hledaná analyzovaná složka (např. protein C, plasminogen) přímo na specifický syntetický substrát.

Nepřímé zkoušky jsou zkoušky, v nichž analyzované složky (antitrombin, plasminový inhibitor) reagují s pevným množstvím enzymu a vytvářejí neaktivní komplexy. Za podmínek optimalizovaných podmínek zkoušky je následně měřena aktivita zbytkového enzymu s použitím specifických umělých substrátů.

Ve většině případů je reakce monitorována při 405 nm pomocí kontinuálního uvolňování paranitroanilinu (pNA) ze syntetického substrátu.

Chromogenní kanály používají princip měření absorpance v kyvetě. Optické čidlo načítá světlo (405 nm), které prochází kyvetou. Světlo je absorbováno v přímém poměru ke koncentraci pNA. Množství světla, které projde až do fotodetektoru, se převádí na elektrický signál, který je úměrný aktivitě enzymu.

2.6 Statistika

Matematická statistika je vědní disciplína, která je na pomezí popisné statistiky a aplikované matematiky. Zabývá se teoretickým rozbohem metod získávání a analýzy empirických dat.

2.6.1 Základní statistické charakteristiky měřených parametrů

Aritmetický průměr (Mean) je úhrn hodnot znaku v souboru dělený rozsahem celého souboru. Je důležitou charakteristikou ve skupině nazývaná jako míry polohy. Další charakteristika, jež patří do této skupiny, je medián, což je prostřední hodnota variační řady (tzn. řada hodnot uspořádaných podle velikosti).

Směrodatná odchylka (Std. Deviation) je druhá odmocnina rozptylu. Rozptyl je aritmetický průměr čtverců odchylek jednotlivých hodnot souboru od jejich aritmetického průměru. Směrodatná odchylka patří do skupiny- míry variability.

2.6.2 Neparametrická Spearmanova korelační analýza

Spearmanův korelační koeficient pořadové korelace (r) je neparametrická statistická charakteristika udávající těsnost vztahu mezi 2 proměnnými. Nabývá hodnot od -1 do +1.

3 .Experimentální část

3.1. Cíle experimentu

Cílem mé bakalářské práce bylo porovnat metody přímého a nepřímého stanovení léku dabigatran etexilátu a zjistit jejich výhody a nevýhody.

Stanovení hladiny dabigatran etexilátu lze provést přímo stanovením aktivity vůči externě přidanému alfa trombinu (dTT) nebo stanovením inhibičního potenciálu pro generaci trombinu (TGA).

Porovnat metody na souboru pacientů léčených dabigatranem a současně na vzorcích s in vitro přídatkem dabigatranu pro zjištění individuální variability působení léku.

3.2. Materiál a metody

3.2.1 Materiál

- plazma chudá na krevní destičky
- vyšetřovací kit TECHNOTHROMBIN[®] TGA- je soubor reagensů pro fluorescenční měření generace trombinu v plazmě po aktivaci koagulační kaskády prostřednictvím směsi fosfolipidů a tkáňového faktoru
 - REACTION BUF TECHNOTROMBIN TGA- reakční pufr
 - LOW RC TECHNOTROMBIN TGA- tkáňový faktor s negativně nabitými fosfolipidy
 - SUB TECHNOTROMBIN TGA- fluorogenní substrát
 - kalibrátor TGA
 - DABIGATRAN PLASMA CALIBRATOR- soubor kalibračních plasem na měření dabigatranu
- destilovaná voda
- CaCl₂
- reagensie na DTI stanovení hladiny dabigatranu
 - NORMAL POOL PLASMA
 - LIDSKÝ KALCIUM THROMBIN
 - DABIGATRAN CONTROL PLASMA

3.2.2 Přístrojové vybavení

- přístroj ACL-TOP- analyzátor používající na provádění různých typů zkoušek tj. koagulometrické (turbidimetrické), chromogenní (absorbanční), imunologické
- automatické pipety Eppendorf AG, Hamburk, Německo
- koagulační analyzátor Ceveron® Alpha Technoclone- tento analyzátor je plně automatizovaný moderní přístroj, na kterém je možno provádět koagulační, chromogenní, turbidimetrické a fluorimetrické měření. Integrovaný fluorescenční reader pracuje s excitační vlnovou délkou 360 nm a emisní vlnovou délkou 465 nm.



obr. 14: analyzátor Ceveron® Alpha, Technoclone

3.3 Vlastní měření

3.3.1 Příprava reagensů a kalibrátorů

Reagencie byly rozpuštěny v požadovaném množství vody. Po dokonalém rozpuštění byly reagencie přečteny čtečkou analyzátoru přes čárový kód a vloženy na vybrané pozice.

Reagencie v analyzátoru byly následně temperovány na 12-15°C a připraveny k použití.

reagencie	množství vody (ml)
SUB TECHNOTROMBIN TGA	3
REACTION BUF TECHNOTROMBIN TGA	1
LOW RC TECHNOTROMBIN TGA	1
DABIGATRAN PLASMA CALIBRATOR	1

tabulka 4: příprava reagensů na TGA

Příprava reagensí na DTI stanovení hladiny dabigatran

reagencie	množství vody (ml)
NORMAL POOL PLASMA	2,5
LIDSKÝ KALCIUM THROMBIN	2,5
DABIGATRAN CONTROL PLASMA	1

tabulka 5: příprava reagensí na DTI

3.3.2 Příprava vzorků

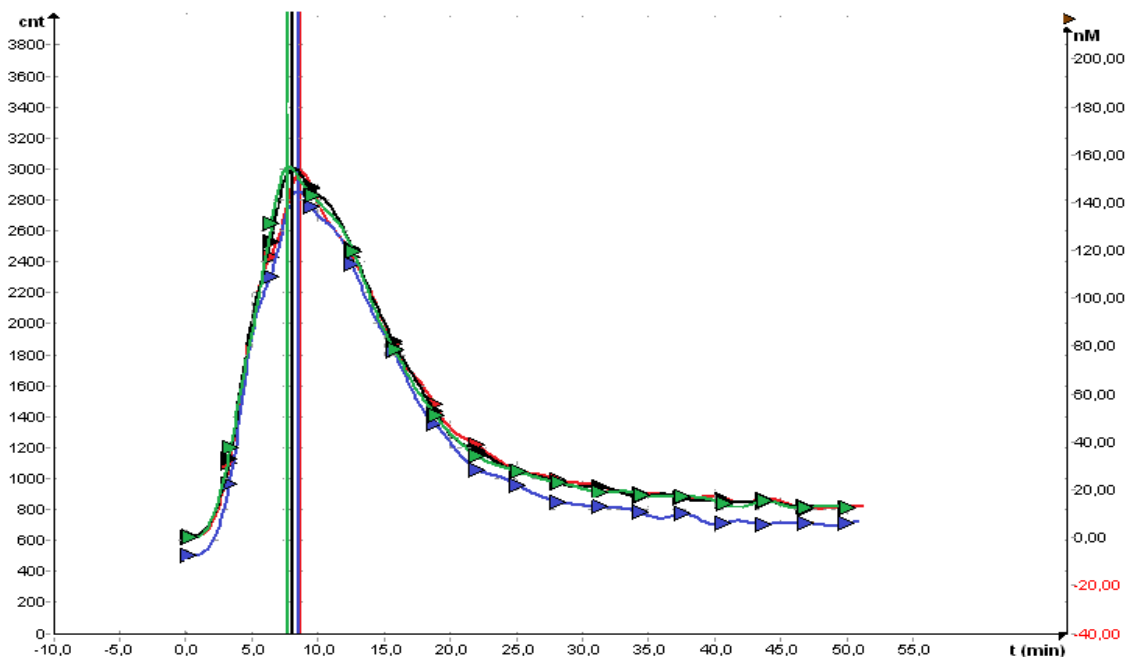
Vzorky krve byly odebrány do zkumavky, ve které je umístěno nesrážlivé činidlo. Jednotlivé vzorky od pacientů byly zcentrifugovány, aby se odstranily krevní buňky od plazmy. Centrifugací 15-20 minut při 2500-3000 g se získala plazma chudá na krevní destičky. Plazma byla zmrazena a uchovávána při -20°C. Před vyšetřením byl vzorek vytemperován v termostatu při teplotě 37°C a následně použit k vyšetření.

3.3.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla stanovena na náhodně vybraných 4 vzorcích, které byly proměřeny vždy 4x, kdy požadovaná přesnost neměla vykazovat větší variační koeficient než 5 %.

	vzorek	t _{lag} (min)	t _{peak} (min)	peak (nM)	VI (nM/min)	AUC (nM)
pacient 1	1	2,3	8,8	147	22,9	2313,9
	2	2,3	8,4	150,3	24,8	2312,5
	3	2,5	8	155,7	28	2345,2
	4	2,4	7,8	151,8	28,3	2306,5
průměr		2,375	8,25	151,2	26	2319,525
směrod. odchylka		0,083	0,384	3,125	2,255	15,082
variační koeficient		0,035	0,047	0,021	0,087	0,007
pacient 2	1	2,7	7,8	140,3	27,4	2228,5
	2	2,4	9,9	133,1	17,6	2176,1
	3	2,5	9,2	142,7	21,1	2203,5
	4	2,6	9,5	137,5	19,9	2156,9
průměr		2,55	9,1	138,4	21,5	2191,25
směrod. odchylka		0,112	0,791	3,571	3,631	27,144
variační koeficient		0,044	0,087	0,026	0,169	0,012

tabulka 6: výsledky opakovatelnosti



obr. 15: trombinogram opakovatelnosti u jednoho pacienta

3.3.4 Soubor pacientů

3.3.4.1 Pacienti na léčbě dabigatran etexilátem

Soubor složený z 48 pacientů byl vybrán z pacientů kardiochirurgického oddělení. Pacienti byli vybráni do zaslepené studie s dabigatran etexilátem z důvodu jejich predispozice k vážným trombotickým komplikacím.

3.3.4.2 Plazma s in vitro přidávkem dabigatranu

Druhý soubor byl tvořen pacienty s různou predispozicí pro vznik tromboembolické nemoci. Jejich vzorky plazmy byly spikovány vypočítanou denní léčebnou dávkou dabigatran etexilátu. Požadovaná hladina léčiva v plazmě byla 250 ng/ml. Výpočet požadovaného ředění na výslednou koncentraci 250 ng/ml dabigatranu v plazmě vychází z 200 μ l plazmy a přidavku 98 μ l kalibrátoru o nejvyšší koncentraci, která činí 510 ng/ml.

Výpočet denní dávky:

$$\frac{510 \text{ ng/ml (nejvyšší konc. kalibrátoru)} \cdot 200 \text{ } \mu\text{l plazmy}}{250 \text{ ng/ml}} = x \text{ } \mu\text{l kalibrátoru}$$

$$x = 98 \text{ } \mu\text{l kalibrátoru}$$

Vzorky byly děleny na 3 skupiny podle množství denní dávky:

1. skupina: 200 μ l plazmy + 98 μ l kalibrátoru dabigatranu \Rightarrow 250 ng/ml
2. skupina: 200 μ l plazmy + 196 μ l kalibrátoru dabigatranu \Rightarrow 500 ng/ml
3. skupina: 200 μ l plazmy + 294 μ l kalibrátoru dabigatranu \Rightarrow 750 ng/ml

Po přípravě byly vzorky opět vyšetřovány pomocí trombin generačního testu.

3.3.5 Měření

Vlastní měření vzorků probíhalo následovně: po start-up proceduře přístroje Ceveron® Alpha byly vyšetřovány vzorky plazmy chudé na krevní destičky.

Přístroj provedl analýzu dle následujícího protokolu:

vzorek měřené plasmy	40 μ l
REACTION BUF TECHNOTROMBIN TGA	20 μ l
LOW RC TECHNOTROMBIN TGA	15 μ l
SUB TECHNOTROMBIN TGA	40 μ l
CaCl ₂	35 μ l

detekce fluorescence (360/460 nm) probíhá v 1 min. intervalech po dobu 45 min.

Fluorescenční signál byl zachycen detektorem, který převádí naměřené hodnoty do počítače. Zde jsou pomocí softwaru Ceveron PC-SW ver. 1.4 převedeny na aktuální koncentraci (vytvořeného množství) trombinu ve vzorku. Výsledkem vyhodnocení jednotlivých parametrů trombin generačního testu byla naměřená křivka- trombinogram.

4. Výsledky a diskuze

4.1 Naměřené hodnoty

4.1.1 Pacienti na léčbě dabigatran etexilátem

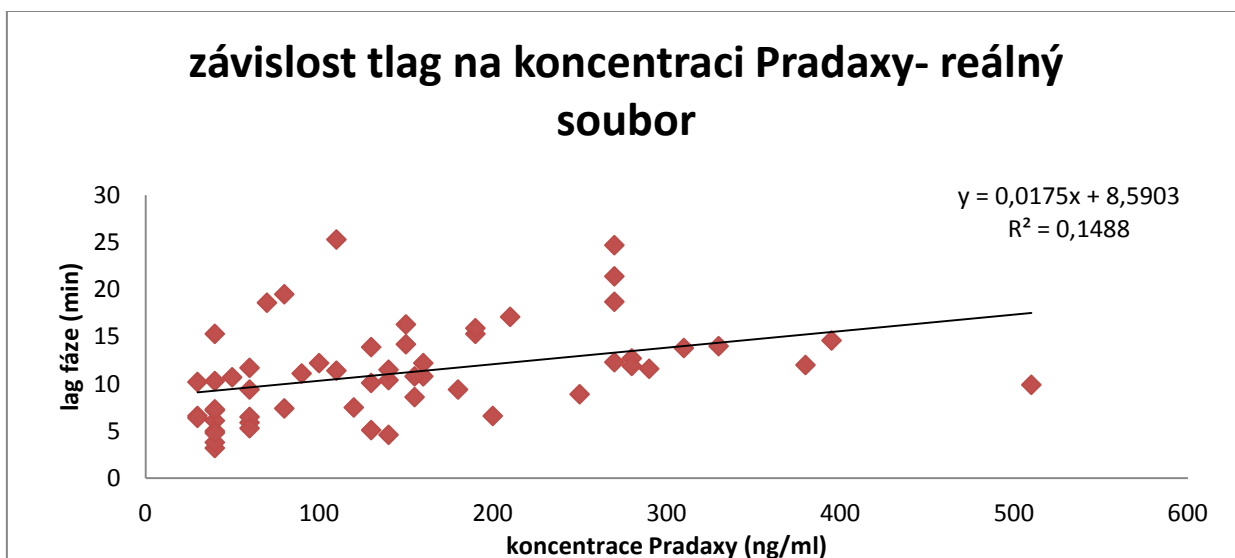
Soubor 48 pacientů byl vyšetřován pomocí trombin generačního testu. Naměřené hodnoty z testu byly dány do tabulky. Sledovaly se hlavní parametry testu, což je čas do začátku generace trombinu (t_{lag}), maximální vytvořená koncentrace trombinu (peak) a posledním důležitým parametrem je plocha pod křivkou, která charakterizuje celkové množství vytvořeného trombinu (AUC). Poslední sloupec tabulky je věnován koncentraci léčiva dabigatranu ve vzorcích pacientů, která byla stanovována pomocí dTT testu.

vzorek	č. pacienta	t _{lag} (min)	t _{peak} (min)	peak (nM)	VI (nM/min)	AUC (nM)	Pradaxa (ng/ml)
1	500113	17,1	9,5	180,7	19,2	1161,6	210
2	500108	10,7	16,1	176,1	15,5	1702	50
3	500114	13,8	7,9	148,6	23,6	1298,6	310
4	500106	3,2	18,4	110,1	31,6	1758,2	40
5	500108	11,7	17,7	109,1	40,3	1964,8	60
6	500110	3,8	22,1	95,9	31,9	2227,9	40
7	500113	11,6	15,2	193	54,2	1803,8	290
8	500103	10,4	15,1	123,1	26,4	1393	140
9	500103	10,8	16	110,3	21,2	1341,9	160
10	500110	7,4	11	188,7	52,2	1671,9	80
11	500106	5,9	10	177,7	43,2	1792,3	60
12	500106	6,5	10,9	139,3	31,5	1552,7	60
13	500113	18,7	23,9	114,5	22	1310,5	270
14	500105	21,4	28,1	66,6	10,1	916,5	270
15	500105	14,2	18,8	145,9	32	1587,9	150
16	500113	12,2	16,3	178,2	43,8	1806,1	100
17	500103	9,4	12,7	128,7	38,9	1131,1	60
18	500110	19,5	26,5	70	10,1	1053,1	80

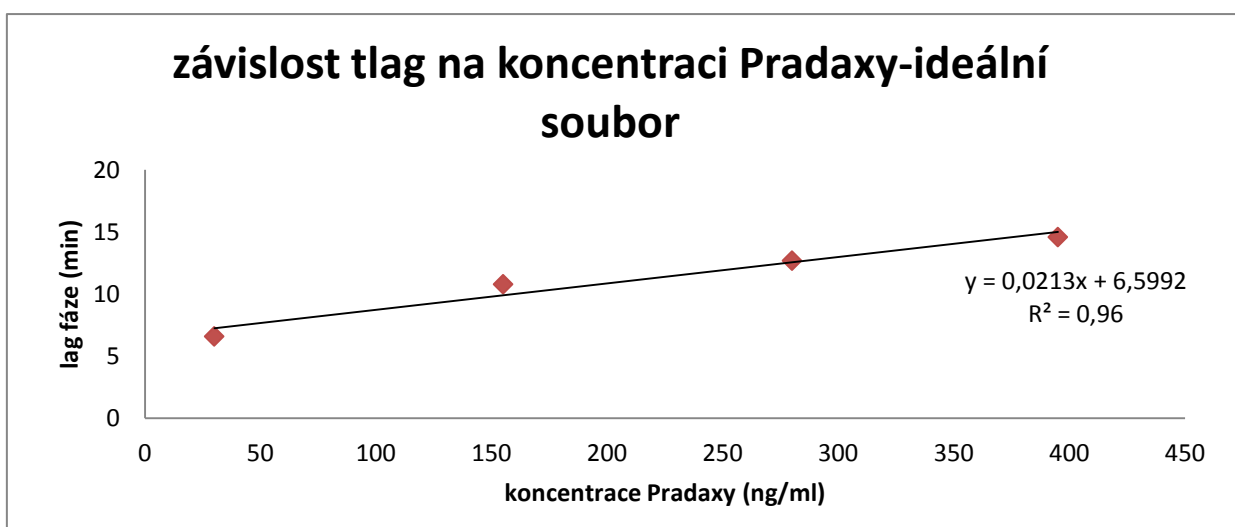
vzorek	č. pacienta	t _{lag} (min)	t _{peak} (min)	peak (nM)	VI (nM/min)	AUC (nM)	Pradaxa (ng/ml)
19	500105	25,3	32,9	60,2	8	872,1	110
20	500105	18,6	24,6	93	15,6	1214,5	70
21	500106	15,3	20,8	60,1	10,9	806	190
22	500114	15,9	21,2	62,7	11,8	770,2	190
23	500114	12,2	16	121,3	31,8	1162,3	160
24	500110	11,4	16,9	97,6	17,7	1345,5	110
25	500103	6,1	14,4	40,8	4,9	907,2	40
26	500102	7,2	14,1	74,9	11	1381,6	40
27	500108	24,7	31,5	68,2	10,1	840,6	270
28	500103	13,9	19,7	79,4	13,7	1003,2	130
29	500103	7,5	10,8	153,1	47	1223,7	120
30	500108	10,3	30,3	7,2	0,4	160,3	40
31	500106	6,6	11,4	141,2	29	1649,3	200
32	500113	15,3	28,1	9,9	0,8	187,2	40
33	500105	11,5	16,2	113	23,7	1253,9	140
34	500114	7,3	14,4	17,2	2,4	298	40
35	500108	11,1	16,5	96,4	17,8	1365,9	90
36	500114	9,4	13	107,6	29,4	1073,6	180
37	500106	5,1	8,9	138,2	36,2	1399,4	130
38	500108	5	11,8	70,5	10,4	1306,6	40
39	500110	14	18,8	75,2	15,6	917,2	330
40	5001	4,8	11,6	54,7	8,1	1127,2	40
41	500106	4,6	7,7	182,6	57,8	1303,5	140
42	500108	10,2	17,2	90,2	13	1438,7	30
43	500105	16,3	21,9	83,1	15,1	1097,9	150
44	500114	10,1	14,2	95,2	23,7	1056,2	130
45	500113	12,3	16	127,9	34,1	1209,7	270
46	500114	8,9	12,4	118,8	33,4	1095,3	250
47	500113	12	16,1	132,4	32,2	1323,4	380
48	500110	5,3	8,6	213,6	65,5	1687,1	60

tabulka7: naměřené hodnoty pacientů

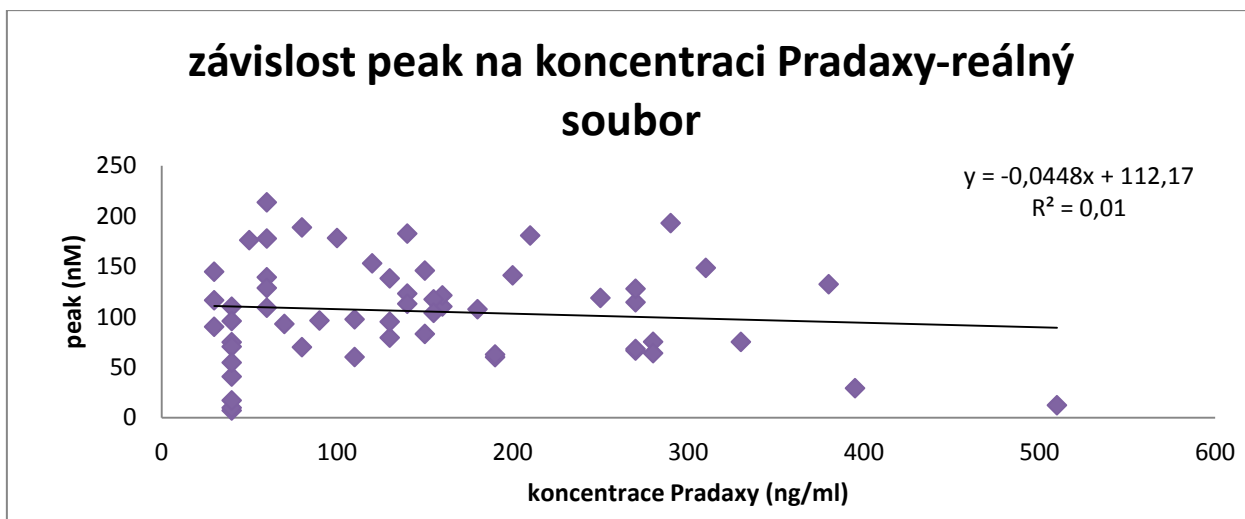
Z naměřených hodnot vybraných parametrů (tlag, AUC a peak) byly sestaveny grafy závislostí daných hodnot na koncentraci Pradaxy a byly srovnány s kalibračními křivkami, které představovaly ideální soubory.



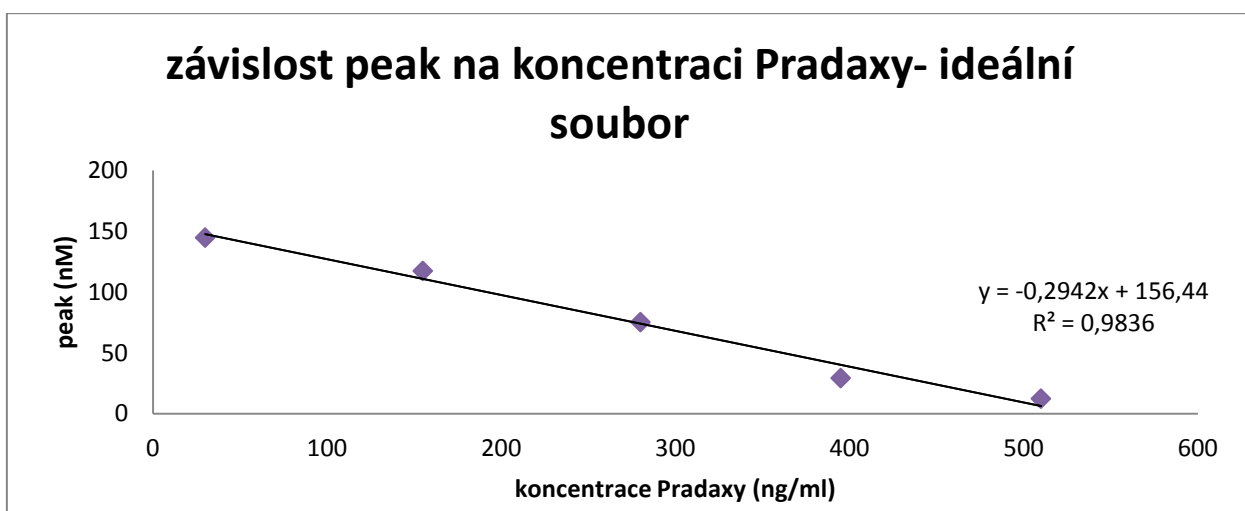
graf 1: závislost tlag na koncentraci Pradaxy- reálný soubor



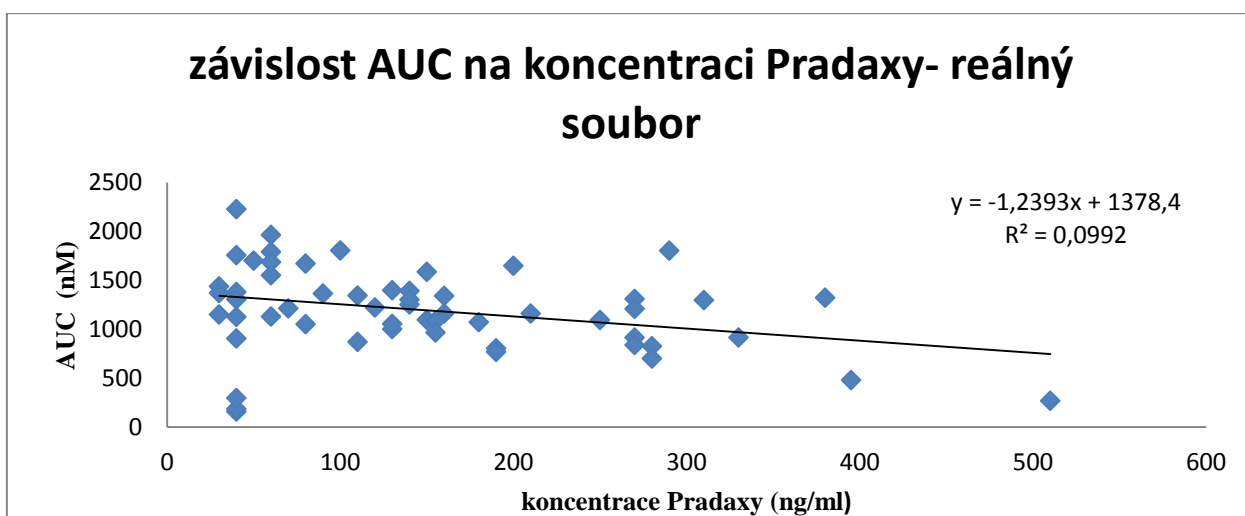
graf 2: závislost tlag na koncentraci Pradaxy- ideální soubor



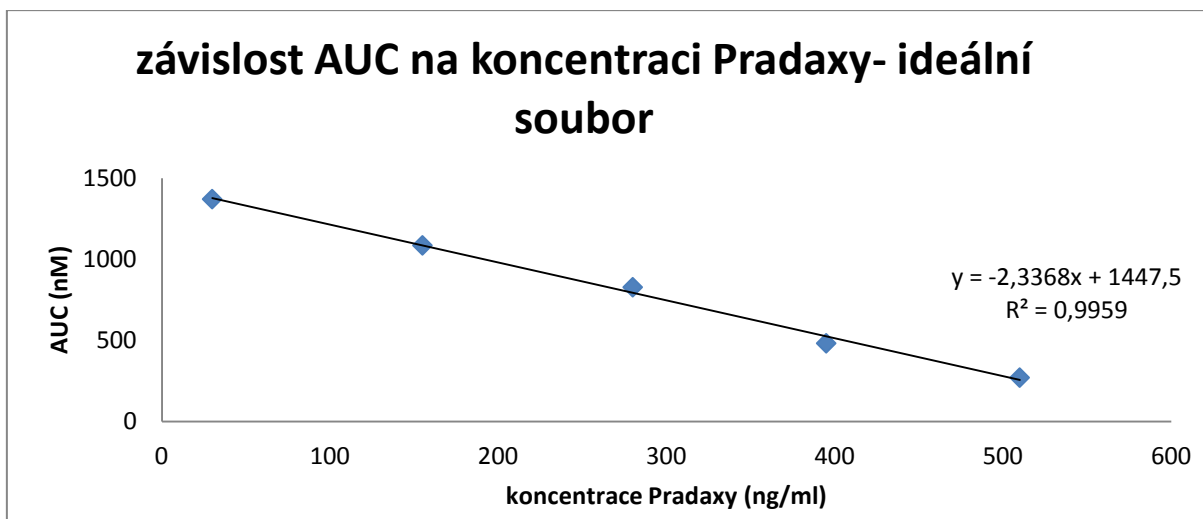
graf 3: závislost peak na koncentraci Pradaxy- reálný soubor



graf 4: závislost peak na koncentraci Pradaxy- ideální soubor



graf 5: závislost AUC na koncentraci Pradaxy- reálný soubor



graf 6: závislost AUC na koncentraci Pradaxy- ideální soubor

4.2 Statistické zpracování dat

4.2.1 Základní statistické charakteristiky měřených parametrů

Soubor 48 pacientů byl statisticky zpracován a výsledky byly zaznamenány do tabulky.

statické parametry	koncentrace (ng/ml)	tlag (min)	peak (nM)	AUC (nM)
průměr	136,3	11,4	109,2	1249,0
medián	125,0	11,0	190,6	1276,3
směr. odchylka	92,4	5,3	49,1	419,8
minimum	30	3,2	7,2	160,3
maximum	380	25,3	213,6	2227,9

tabulka 8: základní statistické charakteristiky

4.2.2 Neparametrická Spearmanova korelační analýza

Spearmanova korelace	tlag (min)	peak (nM)	AUC (nM)
korelační koeficient	0,528	0,277	-0,165
sig. (2-tailed)	0,001	0,057	0,263
počet v souboru - N	48	48	48

tabulka 9: korelační analýza

Spearmanova korelační analýza prokázala signifikantní středně silnou pozitivní závislost mezi koncentrací Pradaxy a hodnotami parametru tLag ($r = 0,528$; $p = 0,0001$). Mezi

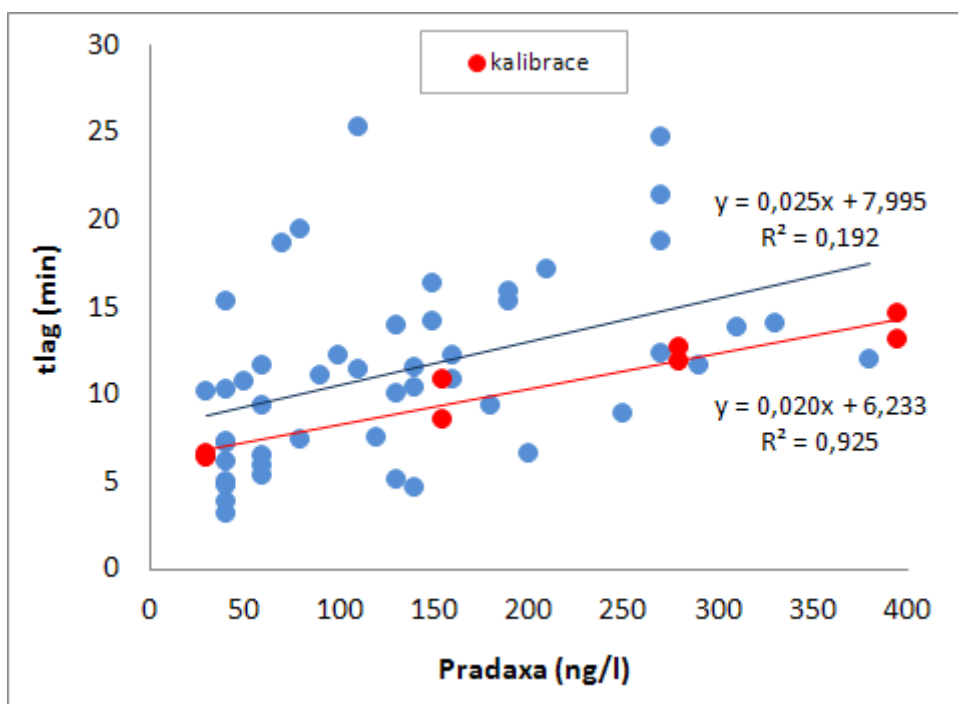
koncentrací Pradaxy a hodnotami parametrů peak a AUC nebyla prokázána statisticky významná závislost.

4.2.3 Test rovnoběžnosti a test shody regresních přímek

Test rovnoběžnosti: přímky mají stejný sklon a liší se posunutím.

Test shody: přímky jsou k sobě totožné.

U závislosti koncentrace Pradaxy na hodnotách peak a AUC nebyla prokázána korelace.



graf 7: bodový korelační graf s kalibrační přímkou

4.3 Diskuze

Nejprve se zjistily základní statistické charakteristiky souboru jako je průměr hodnot, směrodatná odchylka, medián a jiné. Poté jsme se zaměřili na vyhodnocení jednotlivých závislostí a porovnání je s ideálními soubory, což v našem případě byly sestaveny kalibrační křivky pomocí komerčně dodávané plazmy obohacené léčivem (DABIGATRAN PLASMA CALIBRATOR). Po vyhodnocení statistickým softwarem SPSS verzi 15 se ukázalo, že závislost času do začátku generace trombinu na koncentraci dabigatranu jako jediná prokázala korelaci. Je to z důvodu, že čas výrazně závisí na podání léku. Pomocí testu rovnoběžnosti se zjistilo, že přímky jak kalibrační, tak i přímka lineární zhotovená z naměřených dat mají

stejný sklon a liší se od sebe pouze posunutím. Podle testu shody se ukázalo, že přímky jsou k sobě totožné.

U závislosti peak a AUC na koncentraci léčiva dabigatran etexilátu se na počátku neprokázala žádná významná korelace, proto nemělo smysl závislosti dále porovnávat statistickým testem regresních modelů. Korelace se neprojevila, protože parametry peak a AUC jsou ovlivněny individuálními parametry pacienta. Pacienti byli vybíráni s vysokým rizikem tromboembolických komplikací.

Podle ideálních modelů by u těchto pacientů u závislosti peak na koncentraci měla křivka klesat se zvyšující koncentrací. Jelikož soubor 48 pacientů není ideální, musíme počítat s tím, že závislost reálného souboru nebude tak prudce klesat jak je tomu u ideální závislosti.

Parametr AUC je podobný se svou grafickou závislostí k závislosti peaku. Jak v jednom, tak v druhém případě hraje velkou roli individualita pacienta.

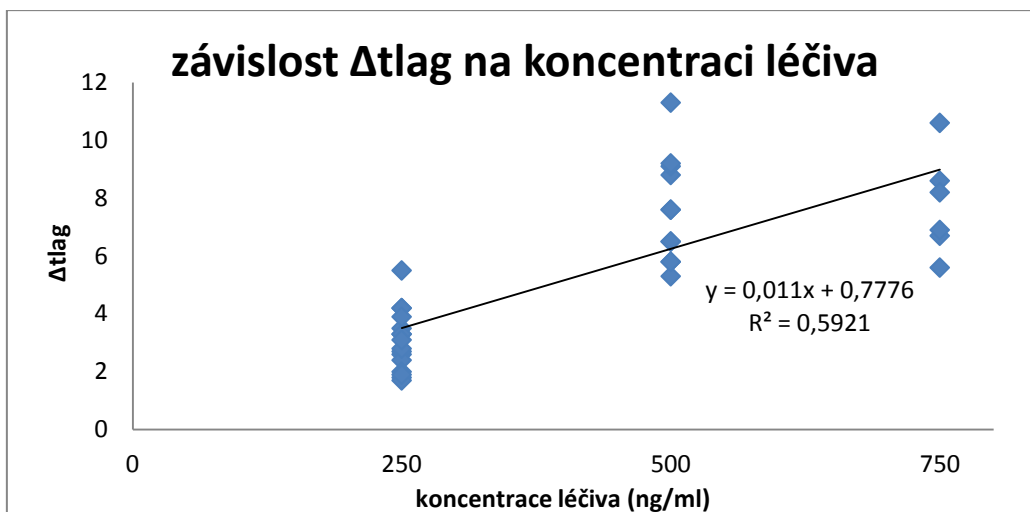
4.4 Plazma s in vitro přídatkem dabigatranu

Ke vzorkům pacientů s různými předpoklady pro vznik tromboembolické nemoci byl přidán dabigatran etexilát v koncentraci 250 ng/ml, 500 ng/ml a 750 ng/ml.

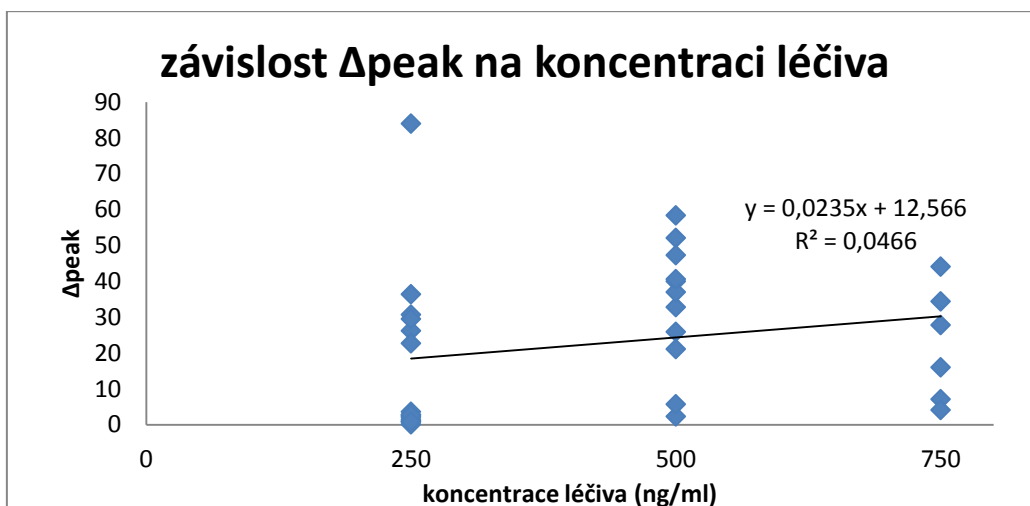
Výsledky byly zaznamenány do tabulky a ke zvýrazněným parametrům byly zpracovány grafy závislostí tohoto parametru na koncentraci léku.

	tlag (min)	tpeak (min)	peak (nM)	VI (nM/min)	AUC (nM)	koncentrace Pradaxy (ng/ml)
iniciálně	2,9	8,2	100,8	19	1366,9	0
po aplikaci 250ng/ml	6,8	11,3	130,3	29,6	1356,8	250
po aplikaci 500ng/ml	8,7	12,7	133,6	33,7	1291	500
po aplikaci 750ng/ml	9,8	13,8	128,6	32,1	1191,4	750

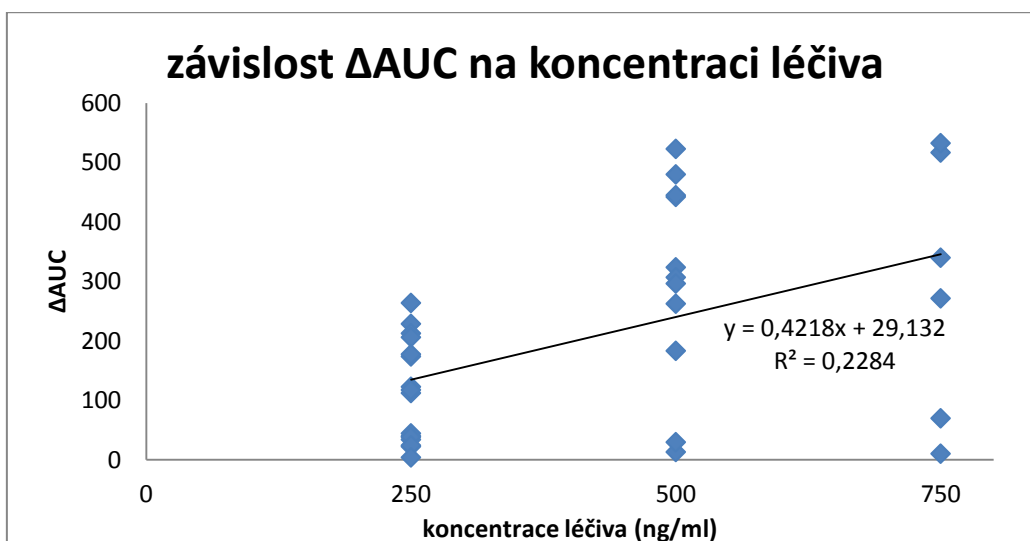
tabulka 10: hodnoty iniciálně a po aplikaci denní dávky



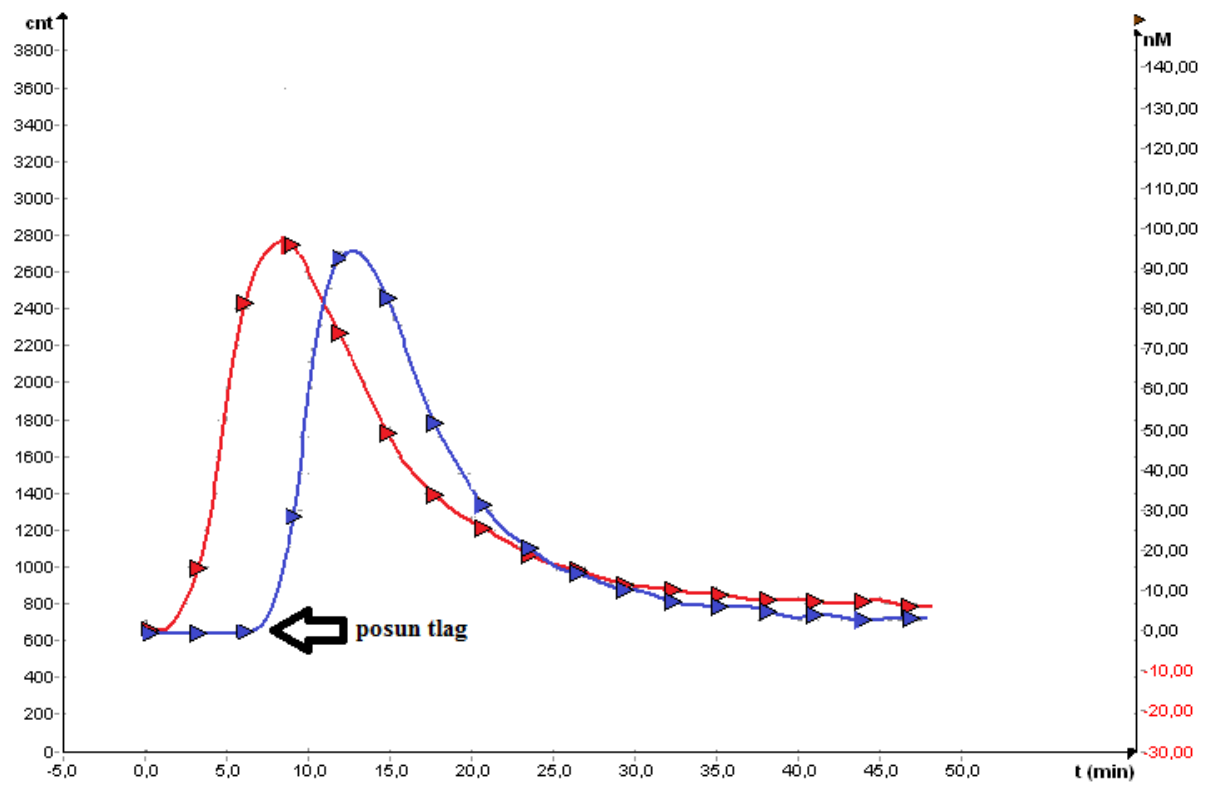
graf 8: závislost Δt_{lag} na koncentraci dabigatran etexilátu



graf 9: závislost $\Delta peak$ na koncentraci dabigatran etexilátu



graf 10: závislost ΔAUC na koncentraci dabigatran etexilátu



obr.16: vliv dávky dabigatran etexilátu v plazmě (červená- plazma; modrá- plazma s $C_{dabigatranu}$ 250ng/ml)

5. Závěr

Cílem bylo porovnat metody stanovení dabigatran etexilátu. V experimentální části bylo potvrzeno, že vybrané metody stanovení jsou vhodné pro monitoraci léčiva dabigatran etexilátu. Tyto metodiky poskytují dostatečnou odezvu, jak je patrné na grafu č.7, kdy rovnice regresní přímky je: $y = 0,020x + 6,233$; $R^2 = 0,925$.

Přesná koncentrace léčiva dabigatranu v našem souboru pacientů byla zjištěna stanovením DTI (direct thrombin inhibitors) a výsledná hladina inhibovaného produktu trombinu byla stanovena pomocí TGA. V souboru 48 pacientů s vysokým rizikem tromboembolických komplikací byly následně korelovány 3 zásadní parametry TGA (t_{lag}, peak a AUC) v závislosti na zjištěné koncentraci léčiva v plazmě. Pomocí statistiky byla zjištěna statisticky významná závislost t_{lag} na koncentraci dabigatranu. U zbývajících 2 parametrů se nepotvrdila závislost z důvodu, že AUC a peak vykazují vysokou intraindividuální variabilitu. Pacienti s tromboembolickými komplikacemi byli vybráni záměrně, jelikož nejvíce profitují z této moderní léčby. Pokud by se studie prováděla na zdravých pacientech, lze předpokládat, že budou výsledky lépe korelovat s kalibračními křivkami.

Metoda generace trombinu nám tedy poskytuje informaci o konečném produktu inhibice dabigatranu tj. trombinu. Interpretace výsledků je komplikovanější, neboť u jednotlivých pacientů lze předpokládat velmi rozdílné počáteční hladiny trombinu. Pro ověření této teorie bylo přistoupeno k experimentu s in vitro podáním dabigatran etexilátu ke vzorkům s různým trombogenním potenciálem.

Druhá vyšetřovaná skupina byla tvořena pacienty, kterým byl přidáván do plazmy dabigatran etexilát. Tímto způsobem bylo vyšetřeno 18 pacientů a zhodnoceny opět 3 zásadní parametry TGA. Ke vzorkům plazmy pacientů byl přidán dabigatran etexilát o koncentraci 250 ng/ml, 500 ng/ml a 750 ng/ml. U výsledků bylo zpozorováno výrazné prodlužování času do začátku nástupu generace trombinu (t_{lag}) a snižování plochy pod křivkou (AUC) jak je patrné na grafech č. 8 a 10, kde regresní přímka závislosti Δt_{lag} je $y = 0,011x + 0,7776$; $R^2 = 0,5921$ a přímka závislosti ΔAUC je $y = 0,4218x + 29,132$; $R^2 = 0,2284$.

Jak metoda TGA, tak i DTI stanovení nám poskytují různé pohledy na monitoraci léku resp. přímo inhibovaného enzymu a vzhledem k individualitě každého pacienta 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.

Literatura

- AusPAR Pradaxa Dabigatran etexilate mesilate Boehringer Ingelheim Pty Ltd PM-2010-00120-3-3 Final 24 May 2011
- Bendel S.D., Bona R., Baker W.L., Dabigatran: an Oral Direct Thrombin Inhibitor for Use in Atrial Fibrillation, 2011
- Edgar Faber a kolektiv, Základy hematologické diagnostiky, 2012
- Harenberg J., Giese Ch., Marx S., Math M., Krämer R., Determination of Dabigatran in Human Plasma Samples, Semin Thromb Hemost 2012; 38: 16-22
- Krčová V., Hluší A., Palová M., Slavík L., Úlehlová J., Nová antikoagulancia- možnosti monitorování antikoagulačního účinku (dabigatran), Interní Med. 2012; 14 (8 a 9): 318-321
- Liang et al., Correction of microplate location effects improves performance of the thrombin generation test, Thrombosis Journal 2013; 11: 12
- Malý R., Dabigatran, Remedia 2008; 18: 331-336
- Simon Michaelis et al., Dabigatran and Dabigatran Ethyl Ester: Potent Inhibitors of Ribosyldihydronicotinamide Dehydrogenase (NQO2), J. Med. Chem., 2012, 55 (8), pp 3934–3944
- Novotný J., Nové antitrombotické léky, Ambulantná terapia, 2007, roč.5 (1): 18-20
- Šlechtová J., Hemostáza- jak ji možná neznáme, Klin. Biochem. Metab., 15 (36), 2007, No.2, p.97-101
- van Ryn et al., Effect of dabigatran on coagulation assays and reversal strategies, Thrombosis and Haemostasis 2010; 103: 1116-1127
- J. Gumulec a kolektiv, Krvácivé komplikace při léčbě warfarinem, 2005
- D. Lednicer, The Organic Chemistry of Drug Synthesis, 2007, p. 156
- J. Fischer, C. R. Ganellin, D. P. Rotella, Analogue-based Drug Discovery III, p. 252-253
- http://www.boehringer-ingelheim.cz/news/news_releases/archiv/pacienti_pradaxa.html. Přečteno 3.10.2013
- <http://cmp-manual.wbs.cz/8103-Dabigatran2.html#hemoclot>. Přečteno 3.10.2013
- <http://www.imalab.cz>. Přečteno 14.9.2013

- <http://www.sukl.cz/sukl/farmakoterapeuticke-informace>. Přečteno 14.9.2013
- <http://www.technoclone.com>. Přečteno 25.2.2014
- <http://www.wikiskripta.eu>. Přečteno 12.9.2013
- <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/nova-antitrombotika-413546>.
Přečteno 3.10.2013
- Vojtěch Gajda, Základy statistiky v příkladech, Ostravská univerzita 2006

Zkratky

VTE- žilní tromboembolie

aPTT- aktivovaný parciální trombinový čas

TT- trombinový čas

PT- protrombinový čas

ECT- ekarinový srážecí čas

CYP-450 – systém cytochromu P-450

UFH- nefrakcinovaný heparin

LMWH- nízkomolekulární heparin

INR- mezinárodní normalizovaný poměr

ACT- aktivovaný koagulační čas

DTI- přímý inhibitor trombinu

dTT- diluovaný trombinový čas (Hemoclot®)

TGA- trombin generační test

ETP- endogenní trombinový potenciál

pNA- paranitroanilin

DTI- direct thrombin inhibitors